



POLITECHNIKA WROCŁAWSKA

Instytut Chemii Nieorganicznej i Metalurgii

Pierwiastków Rzadkich

Anna Leśniewicz

**Zastosowanie atomowej spektrometrii emisyjnej
z argonową plazmą wzbudzoną indukcyjnie i technik
ekstrakcyjnych w pierwiastkowej analizie śladowej
igliwia różnych gatunków drzew**

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. inż. Wiesław Żyrmicki

Wrocław 2000

Profesorowi Wiesławowi Żyrnickiemu dziękuję za opiekę naukową i pomoc w realizacji tego projektu badawczego. Promotorowi, współpracownikom oraz bliskim jestem wdzięczna za życzliwość, wyrozumiałość i cierpliwość.

Anna Leśniewicz

Spis treści

	<i>Strony</i>
1. Cele pracy i zakres badań	1
2. Część teoretyczna – przegląd literatury	2
2.1. Analiza wybranych materiałów roślinnych w badaniach środowiskowych	2
2.2. Przygotowanie materiału roślinnego do analizy	6
2.3. Metody analizy próbek roślinnych	12
2.4. Statystyczna ocena wyników pomiarów analitycznych	15
2.5. Ekstrakcja jako metoda przygotowania próbek do pomiaru	19
3. Część eksperymentalna	27
3.1. Materiał badawczy	27
3.2. Próbkowanie	27
3.3. Procedury przegotowania materiału badawczego do analizy	28
3.3.1. Przygotowanie igliwia	28
3.3.2. Stosowane odczynniki chemiczne	29
3.3.3. Procedury mineralizacji i roztwarzania	29
3.3.4. Procedury ekstrakcji	31
3.4. Metody pomiarowe	32
4. Wyniki badań i dyskusja	34
4.1. Analiza śladowa igliwia świerka, sosny i cisu z zastosowaniem atomowej spektrometrii emisyjnej z plazmą sprzężoną indukcyjnie	34
4.1.1. Wpływ sposobu przygotowania próbek na uzyskiwane wyniki	34
4.1.2. Porównanie procedur mycia	34
4.1.3. Homogeniczność próbki	37
4.1.4. Porównanie metod mineralizacji próbek	38
4.1.5. Wybór linii analitycznych	42
4.1.6. Analiza materiału referencyjnego	44
4.1.7. Porównanie zawartości pierwiastków w igłach z różnych miejsc próbkowania	46
4.1.7.1. Analiza igliwia świerka pospolitego (<i>Picea abies</i>)	46
4.1.7.2. Analiza igliwia sosny zwyczajnej (<i>Pinus sylvestris</i>)	51

4.1.8. Analiza próbek świerka pospolitego, świerka białego i cisu pospolitego rosnących na tym samym stanowisku	57
4.1.9. Zawartość wybranych pierwiastków w igliwiu cisu z różnych stanowisk	58
4.1.10. Porównanie zawartości wybranych pierwiastków w badanych próbkach z danymi literaturowymi	59
4.1.11. Międzypierwiastkowe korelacje w igliwiu	61
4.2. Zastosowanie metody proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej w badaniach igliwia	65
4.3. Zastosowanie ekstrakcji w układzie ciało stałe – ciecz w procesie przygotowania próbek igliwia do analizy i w analizie specjacyjnej	69
4.3.1. Ekstrakcja konwencjonalna	69
4.3.1.1. Porównanie efektywności ekstrakcji przy użyciu różnych ekstrahentów	69
4.3.1.2. Wpływ stężenia ekstrahenta na efektywność ekstrakcji	73
4.3.1.3. Wpływ matrycy ekstrahenta na sygnał pomiarowy	75
4.3.1.4. Badanie wpływu stosunku faz na proces ekstrakcji	77
4.3.1.5. Wpływ temperatury na wydajność procesu ekstrakcji	77
4.3.1.5. Badanie zależności między czasem wytrząsania a wydajnością ekstrakcji	80
4.3.2. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami	82
4.3.3. Ekstrakcja wspomagana mikrofalowo	90
4.3.4. Porównanie efektywności ekstrakcji konwencjonalnej (z wytrząsaniem) oraz wspomaganej ultradźwiękami i mikrofalowo	96
5. Podsumowanie	101
6. Literatura	104

1. Cele pracy i zakres badań

Materiał roślinny jest bardzo często przedmiotem analiz zwłaszcza wykonywanych przez specjalistów z dziedziny ochrony środowiska. W badaniach środowiska naturalnego wykorzystywane często niektóre z rodzajów drzew iglastych. Sporo uwagi poświęca się, w tego typu pracach, oznaczeniom pierwiastków, natomiast niewiele badań dotyczy zagadnienia przygotowania próbek. Z reguły w próbkach środowiskowych oznaczane są całkowite koncentracje pierwiastków. Nieliczne publikacje relacjonują badania wiążące się z analizą specjacyjną.

Celem pracy było:

- ⇒ oznaczenie pierwiastków głównych (stanowiących matrycę nieorganiczną) i śladowych w próbkach igliwia różnych gatunków drzew za pomocą atomowej spektrometrii emisyjnej z argonową plazmą wzbudzoną indukcyjnie;
- ⇒ zbadanie i porównanie procedur i metod stosowanych do przygotowania próbek do pomiaru.

Zakres badań obejmował oznaczenie pierwiastków w próbkach igliwia z drzew rosnących na terenach miejskich: dwóch obszarów w Polsce (Wrocław, Oława i okolice) oraz jednego w Norwegii (Trondheim). Materiał badań stanowi igliwie świerka pospolitego (*Picea abies*) i sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*) oraz cisu pospolitego (*Taxus baccata*), który został zbadany po raz pierwszy w tej pracy.

Prace badawcze związane z porównaniem metod mineralizacji obejmowały mineralizację na mokro w układzie otwartym, mineralizację pod zwiększonym ciśnieniem (wspomagana mikrofalowo) i spopielenie.

Celem prac nad zastosowaniem różnych procedur ekstrakcji w układzie ciało stałe – ciecz (igliwie – ekstrahent) jako metody przygotowania próbek do analizy śladów przy użyciu ICP-AES było:

- porównanie i ocena technik wspomagania procesu ekstrakcji (konwencjonalnego wytrząsania, ultradźwięków i promieniowania mikrofalowego),
- zbadanie wydajności ługowania pierwiastków w różnych warunkach,
- możliwość zastąpienia procesu całkowitej mineralizacji procesem selektywnej ekstrakcji,
- ocena możliwości zastosowania ekstrakcji w analizie specjacyjnej igliwia.

2. Część teoretyczna

2.1. Analiza wybranych materiałów roślinnych w badaniach środowiskowych

Uważa się, że w organizmach żywych powinno występować co najmniej 29 pierwiastków [1]. Trzynastą z nich to niemetale (C, H, O, N, S, P, Cl, Br, I, F, B, Si i As), a pozostałe tzn. Ca, Mg, K, Fe, Cu, Zn, Ni, Co, Mn, Al, Pb, Sn, Mo, V i Ti są metalami. W zależności od ilości niezbędnych do funkcjonowania organizmów pierwiastki te można podzielić na :

1. makroskładniki – tj. C, O, N, H, Na, K, Ca, Mg, Cl i P;
2. mikroskładniki (pierwiastki śladowe) – niezbędne w mniejszych ilościach (do nich należą pozostałe z wymienionych pierwiastków).

Sole mineralne występują w organizmach żywych w formie rozpuszczonej w soku komórkowym lub w cieczach pozakomórkowych, bądź w postaci nierozpuszczalnych składników strukturalnych. Do ich najważniejszych funkcji należą [1]:

1. udział w procesach biochemicznych, (bezpośredni udział jonów w reakcjach biochemicznych takich jak: fotosynteza, oddychanie oraz jako składniki enzymów);
2. funkcje osmotyczna i buforująca – polegająca na udziale soli mineralnych w utrzymywaniu określonych właściwości fizykochemicznych roztworów komórkowych i międzykomórkowych np. utrzymywanie odpowiedniego ciśnienia osmotycznego oraz zachowanie właściwego dla działania enzymów stężenia jonów wodorowych;
3. rola strukturalna lub podporowa (np. dwutlenek krzemu buduje ściany komórkowe glonów).

Dokładny mechanizm dezaktywacji metali ciężkich w roślinach nie jest całkowicie znany. Wiadomo, że istnieje kilka mechanizmów adaptacji roślin do obecności nadmiaru metali ciężkich, takich jak: wydalenie (glony *Chlorella vulgais* wydalają miedź), wiązanie przy ściankach komórkowych (u niektórych gatunków miedź unieruchamiana jest na ściankach komórkowych, a ołów w ekotypach tolerancyjnych zawsze nieodwracalnie wiązany jest do ścian), kompleksowanie z fitochelatynami (w komórkach roślinnych stwierdzono obecność szeregu peptydów zdolnych do chelatowania kationów metali ciężkich), kompleksowanie z kwasami organicznymi (badania wskazują, że cynk akumulowany jest w wakuolach w postaci kompleksów

cytrynianowych, a w cytoplazmie w postaci kompleksów jabłczanowych, nikiel znaleziono w postaci cytrynianów, natomiast chrom może występować w postaci trójszczawianów). Akumulacja pierwiastków i tolerancyjność roślin na ich obecność są procesami specyficznymi dla poszczególnych metali, i każdy kation stanowi oddzielny problem dla organizmu. Jednakże może też występować w roślinach zjawisko współtolerancji, co oznacza, że można zaobserwować tolerancję na cynk i miedź lub na kilka innych metali. Wskazuje to na istnienie takich samych mechanizmów obronnych dla kilku metali [2].

Wrażliwość roślin na zmiany w środowisku często jest wykorzystywana do oceny stanu jego przekształcenia przez człowieka i do przewidywań przyszłych zagrożeń dla egzystencji tych roślin. Roślina pełni wówczas funkcję bioindykatora zmian zachodzących w środowisku, a niekiedy pozwala ocenić jak długo trwają te zmiany. Bioindykatorem może być każdy gatunek, którego obecność (lub nieobecność) lub reakcja (pojedynczych osobników, czy też całej populacji) wskazują na zaistnienie w danym miejscu pewnego typu czynnika ekologicznego o ściśle określonym, mieszczącym się w wąskim przedziale, natężeniu lub o odpowiedniej wartości progowej [3]. Jedną z właściwości odróżniających istoty żywe od materii nieożywionej jest zdolność organizmów do przystosowywania się do zmian zachodzących w otaczającym je środowisku. Wszystkie zmiany, np. temperatury, odczynu środowiska wodnego, dopływu pożywienia lub tlenu, wpływają na istoty żywe, jednakże większość organizmów wykształciła w procesie ewolucji mechanizmy neutralizujące te zmiany lub umożliwiające reagowanie na nie w ten sposób, że środowisko wewnętrzne organizmu zmienia się w mniejszym stopniu niż środowisko zewnętrzne. Tę zdolność żywego organizmu do utrzymywania stałych warunków środowiska wewnętrznego (stanu równowagi) określa się jako homeostazę [4]. Zmiany chemicznego składu środowiska powodują zaburzenia homeostazy ekosystemów. Ze względu na brak rozwiniętego mechanizmu utrzymującego homeostazę rośliny reagują najszybciej na zmiany chemizmu środowiska. Słabe działanie bariery fizjologicznej w roślinach przy pobieraniu składników chemicznych z otoczenia stwarza ryzyko szybkiego włączenia pierwiastków w system łańcuchów pokarmowych. Nadmiar makroskładników i pierwiastków śladowych wpływa bezpośrednio na rozwój roślin. Głównymi źródłami pierwiastków dla roślin są powietrze, woda i gleba. Skład chemiczny roślin odzwierciedla elementarny skład gleby, a skażenie ich powierzchni wskazuje na obecność w powietrzu szkodliwych

dla środowiska zanieczyszczeń. Dlatego też, na całym świecie, szerokie praktyczne zastosowanie do monitorowania zmian chemizmu środowiska znalazły metody bioindykacyjne [5].

Analiza pierwiastkowa jest przeprowadzana na materiałach pochodzenia roślinnego w badaniach jakości produktów żywnościowych oraz dotyczących określenia ilości pierwiastków pobieranych z żywnością przez ludzi. Analizom poddawane były: grzyby [6, 7], orzeszki ziemne [8], mąka sojowa [9], brązowy ryż [10], cytryny [11], warzywa (ponad 20 gatunków, np. ziemniaki, marchewka, buraczki, cebula, itp.) [12, 13, 14, 15], kawa [16, 17], herbata [18, 19, 20], mąka ryżowa [21], oliwki, orzechy laskowe [22], orzechy (włoskie, ziemne, pistacje, migdały) i ziarna jadalne (np. słonecznik, dynia, mak) [23], zioła i przyprawy [24].

Jedną z metod monitorowania zanieczyszczeń środowiska jest ocenianie stopnia zanieczyszczenia na podstawie chemicznego składu roślin. W biomonitoringu zastosowanie znalazły: mchy [25-30], porosty [26, 27, 31], grzyby [26], trawy, rośliny uprawne [32], drzewa liściaste np. oliwkowe [27], brzozy [33], kasztanowce [34], klony [31], buki [31], dęby [35] i iglaste. Analizowane były różne tkanki i organy drzew takie jak: drewno [36], kora [37], pędy [38], pąki [38], szyszki [38] i liście. Kilka publikacji poświęconych jest analizie wosków [39-41], a nawet rosy z powierzchni igieł [42]. Spośród drzew iglastych najczęściej badane były świerk pospolity (*Picea abies* Karst.) i sosna zwyczajna (pospolita) (*Pinus sylvestris* L.). Analizom poddawano także tkanki [43]: świerka czerwonego (*Picea rubens* Sarg.) [31, 44, 45], świerka czarnego (*Picea mariana* B.S.P.) [46, 47], świerka białego (*Picea glauca* Voss.) [28, 48-50], sosny czarnej (*Pinus nigra* Arnold) [51], jodły pospolitej (białej) (*Abies alba* Mill.) [52], jodły Frasera (*Abies Fraser* Poir.) [43, 53], jodły balsamicznej (*Abies balsamea* Mill.) [31], jodły wonnej (*Abies amabilis* Dougl.) [54]. Badania prowadzone były dla:

1. pojedynczych emitatorów (takich jak: zakłady chemiczne, elektrownie, fabryki nawozów, rafinerie, huty – aluminium, cynku, ołowiu, miedzi i żelaza [30, 46, 55]) oraz miast (Saarbrücken i Dübener [38], Bonn, Braunschweig, Gießen, Munch i Speyer [56], Zagrzeb i okolice [57], Meksyk [58]);
2. okręgów przemysłowych, jednostek administracyjnych i parków narodowych (na przykład: Vosges we Francji [59], Pensylwania [60] i południowa [61, 62] i północna [44] Karolina, Appalachy [49, 53] oraz zachodnia Wirginia [45] dystrykt

Waszyngton [54]w USA, las w okolicach Poznania [63], lasy w Brunszwiku [46], Alaska [28], Quebec [31] i centralna Kanada [48, 50], półwysep Kola [64],);

3. całych państw (Szwajcaria i południowe Niemcy [32, 65], północna Austria [66], południowo-wschodnie Niemcy [52], Słowacja [67], zachodnia Finlandia i południowo-zachodnia Szwecja [68], Niemcy [37], Wielka Brytania [69], Polska [70] i kontynentów (Europa [71])).

Najczęściej w igliwiu analizowana jest zawartość pierwiastków głównych (Ca, Mg, K, P, Na, S i N) i metali (Al, B, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sr, Ti, V i Zn). Od czasu do czasu pojawiają się też prace, w których oznaczane są niemetalale (As, Br i I). Badania te prowadzone są w celu określenia naturalnej zawartości pierwiastków w ekosystemach lub stopnia zanieczyszczenia środowiska. Czasem oznaczenia prowadzone są po to, aby określić zależność między koncentracjami pierwiastków w igliwiu a: zanieczyszczeniem środowiska pyłami, na przykład z cementowni [72], podwyższeniem poziomu ozonu [73] i azotu [51] w atmosferze, opadami kwaśnych deszczów [74], a nawet wpływ osadów komunalnych w ściółce leśnej na wzrost lasów i kondycję drzew [75].

2.2. Przygotowanie materiału roślinnego do analizy

Każda procedura analizy pierwiastkowej może być podzielona na następujące etapy: planowanie eksperymentu, pobieranie reprezentatywnych próbek, przygotowanie próbek do pomiaru, pomiary instrumentalne oraz opracowanie i ocena uzyskanych wyników. Każdy z tych etapów może być źródłem błędów. Przygotowanie próbek i ich przeprowadzenie do roztworu jest nadal najdłuższym i najbardziej pracochłonnym etapem analizy. Wybór procedury próbkowania materiałów roślinnych w znacznym stopniu zależy od celu i zakresu badań. Należy pamiętać, że skład chemiczny roślin jest uzależniony od gatunku rośliny, jej wieku, rodzaju analizowanej tkanki lub organu, transportu składników odżywczych, może być modyfikowany przez wpływ innych organizmów i warunki klimatyczne i zmienia się w zależności od pory roku [76]. Tak więc w celu umożliwienia porównań wyników badań środowiskowych dotyczących różnych regionów czy państw, niezbędnym okazuje się stosowanie standardowych procedur pobierania próbek (strategia próbkowania i jego czas) oraz zamieszczanie w publikacjach dokładnych opisów próbkowanego materiału (tj. gatunku, stanu próbki i jej otoczenia). W badaniach środowiskowych analizy przeprowadzane są na próbkach o małych masach, a uzyskiwane wyniki służą do opisu stosunkowo dużych terenów, dlatego ogromne znaczenie ma pobór i przygotowanie próbki reprezentatywnej. Przyjmuje się, że chcąc uzyskać dane umożliwiające określenie zanieczyszczenia dużego terenu i wykreślenia map zanieczyszczenia pierwiastkami próbki o minimalnej masie 100 g należy pobrać według nieregularnego szablonu (20 x 5g) z obszaru dwuhektarowego [77]. W zależności od celu i zakresu badań próbkowanie igliwia prowadzone jest na różnej wielkości obszarach, począwszy od małych – takich jak okolice zakładów przemysłowych, hut [47], itp., miasta [63], okręgi przemysłowe [38, 59, 57] – poprzez tereny dużych parków krajobrazowych [53] czy części lub całych państw [28, 30, 39, 66-68, 78], aż do całych kontynentów [71]. Wielkości obszaru próbkowania determinuje liczbę siedlisk, z których pobierane są próbki. Na każdym z siedlisk igliwie pobierane jest, w zależności od ilości dostępnych drzew, z trzech [45, 61] do trzydziestu [61] drzew. Z każdego drzewa gałęzie lub pędy obcinane są z trzeciego [39, 78] lub siódmego [66, 67, 71] konaru bądź ze środka korony. Z każdego drzewa próbkowane są dwie [60] lub trzy gałęzie [39, 78] albo ponad 200 pędów [38], czasem zaś 100 gram igliwia [44]. Zazwyczaj igliwie próbkowane jest po zakończeniu okresu wegetacji - w naszej strefie klimatycznej od listopada do marca [79].

W przypadku materiałów pochodzenia roślinnego zanieczyszczenia z powierzchni próbki (np. kurz i osady, cząstki gleby) mogą być usunięte przez mycie. Niezbędne ono jest zwłaszcza, gdy chce się określić ilość pierwiastka, które roślina pobrała za pośrednictwem korzeni. Na przebieg procesu mycia mają wpływ: zastosowanie różnych roztworów myjących, struktura powierzchni tkanki roślinnej, czas kontaktu próbki z cieczą, a także czas pomiędzy próbkowaniem a myciem. Na przykład porównanie wyników oznaczeń w mytym (CH_3Cl) i niemytym igliwiu sosny pospolitej jasno ukazuje jakim problemem mogą być zanieczyszczenia powierzchni badanego materiału [80]. Najczęściej do mycia próbek roślinnych stosowana jest woda dejonizowana (bądź destylowana) [46, 62, 81]. Do mycia liści (bożodrzew gruczołkowaty) stosowane były także: 0,01 M HCl, 0,01 M EDTA, 1 % roztwór Alconox™ oraz ich mieszaniny [82]. Porównanie zawartości ołowiu w niemytych i mytych liściach o nierównej (brzoza) i gładkiej (klon) powierzchni w czasie okresu wegetacyjnego wskazuje, na najniższą zawartość Pb w umytych liściach brzozy [83]. Jednak w przypadku próbek, których powierzchnia pokryta jest warstwą kutykuli, np. szpilkowate liście, stosowane są także roztwory organiczne (chloroform [31, 71], czy mieszanina toluenu i czterohydrofuranu [71, 78]) w celu usunięcia grubej, woskowej warstwy ochronnej. Badania przeprowadzone przez grupę naukowców pod kierunkiem Wytttenbacha obejmujące jakościowe i ilościowe analizy igliwia świerka wskazują na zanieczyszczenie powierzchni igliwia Zn, As, Cl, Br, Sb i W [84]. Najczęściej analizie poddawane jest igliwie nie myte [28, 35, 48, 53, 57, 64, 66, 67]. Rzadko na miejscu próbkowania zbierane jest samo igliwie, najczęściej z gałęzi obcinane są całe pędy – wtedy igliwie jest myte razem z gałązkami, a obrywane dopiero po wysuszeniu.

Zielone części roślin zawierają do 90 % wody. Kolejnym etapem przygotowania próbek do analizy jest suszenie. Ma ono na celu ochronę próbki przed działaniem bakterii gnilnych w czasie przechowywania i uzyskanie stałej wartości odniesienia przez oznaczenie zawartości wody (określenie suchej masy). Suszenie próbek roślinnych może być przeprowadzane w temperaturze pokojowej w przewiewnych pomieszczeniach bądź w podwyższonej temperaturze w piecach lub suszarkach. Najczęściej jest ono prowadzone w temperaturze 40 – 50 °C przez 24 – 48 godzin, choć gdy nie są w badanym materiale oznaczane lotne pierwiastki lub związki rośliny mogą być suszone w wyższych temperaturach np. 80 °C (24 h) [85], 90 °C (24 h) [86], 105 °C (12 h) [87] i 102 °C (2 h – w przypadku wcześniej już wysuszonych sproszkowanych próbek roślinnych) [88].

Igliwie suszone jest zazwyczaj w temperaturze 60-65 °C przez 48 h [35, 48, 78], a nawet 10 dni [68] albo w 80 °C przez 24 godziny [67], czy 48 h [31], lub w 105 °C przez 12 h [66, 71], czy 24 godziny [63]. Pojawiają się też prace, w których listowie drzew szpilkowych suszone jest w przewiewnych pomieszczeniach w temperaturze pokojowej [55, 61, 62].

Chcąc przygotować reprezentatywną próbkę należy ją zhomogenizować. Wybór techniki rozdrabniania zależy od: wielkości i ilości próbek, rozmiaru cząstek próbki, fizyko-chemicznych właściwości badanego materiału oraz dostępnego sprzętu a także twardości materiału, który ma być zmielony oraz naszych potrzeb co do mialkości próbki. Zastosowanie znalazły: łamacze szczękowe, młynki tnące, młynki z wibrującym dyskiem, młynki młóździerzowe, młynki kulowe i urządzenia umożliwiające rozdrabnianie materiałów zamrożonych (chłodzone suchym lodem, bądź ciekłym azotem) [89]. Mielenie w młóździerzach lub młynkach może prowadzić do strat składników próbki lub zanieczyszczeń innymi. Badania wskazują na zanieczyszczenie podczas mielenia próbek jęczmienia, ziarna pszenicy i lucerny chromem, żelazem i manganem [90]. We wszystkich dostępnych publikacjach igliwie jest mielone przed analizami. Igliwie różnych gatunków drzew szpilkowych najczęściej mielone jest w młynkach kulowych [38, 55, 56, 63, 91]. W pojedynczych pracach pojawiają się doniesienia o zastosowaniu urządzeń umożliwiających homogenizację materiału rozdrobnionego [72].

Badania przeprowadzone na różnych roślinnych certyfikowanych materiałach odniesienia wskazują jednoznacznie na brak zależności między zawartością pierwiastków a czasem magazynowania próbek – bez względu na sposób przechowywania [92]. W 1993 roku analizowano próbki roślin bawełny, eukaliptusa, oliwek, pomarańcz i winogron przechowywane od roku 1973 w plastikowych butelkach w temperaturze pokojowej, w roku 1991 przeprowadzono oznaczenia zawartości pierwiastków w lucernie przechowywanej cztery lata w torbach papierowych w normalnych warunkach laboratoryjnych – w obu przypadkach uzyskano wyniki zbieżne z poprzednimi. Podobnie nie zauważono znaczących zmian w składzie chemicznym ziarna jęczmienia magazynowanego w zapieczętowanych butelkach szklanych przez 13 lat w temperaturze pokojowej i 4 lata w temperaturze – 20 °C oraz liści herbaty przetrzymywanej w analogiczny sposób odpowiednio 8 i 2 lata. Również comiesięczne analizy próbek szpinaku i lucerny przechowywanych w warunkach typowych dla laboratorium

analitycznego przez cztery lata (1990-1994) potwierdzają brak zmian składu chemicznego suchych próbek roślinnych w czasie przechowywania. We wszystkich rozpatrywanych przykładach zaobserwowano jedynie zmianę rozrzutów uzyskiwanych wyników – dane z roku 1974 były znacznie mniej dokładne od tych z roku 1993.

Tylko nieliczne metody instrumentalne pozwalają na badanie próbek w postaci stałej. Większość z nich wymaga rozkładu matrycy organicznej próbki i jej przeprowadzenia do roztworu. Celem tego etapu przygotowania próbek środowiskowych do analizy pierwiastkowej jest całkowita mineralizacja bez strat analitu.

Szerokie zastosowanie znajduje konwencjonalna technika mineralizacji na mokro. Większość procedur utleniania na mokro wymaga użycia kombinacji kwasu (bądź kwasów) i utleniacza (czy utleniaczy). Najczęściej stosowane są: kwas azotowy, kwas siarkowy, kwas solny, kwas nadchlorowy i woda utleniona. Kwas nadchlorowy jest bardzo wydajnym reagentem, ale jego użycie pociąga za sobą niebezpieczeństwo wybuchów. Chcąc uniknąć takiej możliwości trzeba przedsięwziąć szereg środków ostrożności. Kwas siarkowy najczęściej stosowany jest w mieszaninach z innymi składnikami w celu przyspieszenia reakcji utleniania i zwiększenia ich wydajności. Kolejną zaletą stosowania H_2SO_4 jest wzrost temperatury wrzenia co poprawia działanie innych utleniaczy. Wadą stosowania kwasu siarkowego jest możliwość powstawania trudno rozpuszczalnych składników, ale obecność kwasu azotowego w mieszaninie do mineralizacji pozwala uniknąć współstrącania pierwiastków śladowych z siarczanami głównych składników próbki [93].

Igliwie, podobnie jak inne materiały roślinne, zazwyczaj poddawane jest konwencjonalnej mineralizacji na mokro z zastosowaniem mieszanin kwasów i utleniaczy. W tym celu stosowane są najczęściej: mieszanina kwasu azotowego i nadchlorowego [40, 55, 61, 66, 94], kwas nadchlorowy [69], kwas azotowy [95], kwas azotowy z dodatkiem nadtlenku wodoru [68], kwas azotowy w mieszaninie z kwasem solnym [96], mieszanina kwasu azotowego z kwasem siarkowym (z dodatkiem wody utlenionej) [44] oraz kwas siarkowy z dodatkiem wody utlenionej [71]. Nie pojawiły się dotąd prace, w których porównywano by wydajność różnych mieszanin stosowanych w procesie roztwarzania igieł.

Potrzeba zastąpienia roztwarzania na mokro i spopielenia metodą szybszą i dającą bardziej powtarzalne wyniki powoduje wzrost zainteresowania roztwarzaniem wspomaganym mikrofalowo. Stwierdzono, że skrócenie czasu roztwarzania roślin przy użyciu HClO_4 dzięki zastosowaniu wspomaganie mikrofalowego redukuje straty lotnych związków chromu [97]. Zastosowano zamknięte ampule i kwas azotowy do roztwarzania materiałów środowiskowych w celu oznaczenia zawartości rtęci [98]. Podobnie jak w przypadku klasycznego roztwarzania na mokro, do roztwarzania mikrofalowego stosowano: HNO_3 [59], $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ [63, 99, 100, 101], czy mieszanina $\text{HF-HClO}_4\text{-HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ [102]. Należy jednak zaznaczyć, że nie jest to technika bardzo popularna wśród badaczy igliwia.

Wiele prac poświęconych jest zastosowaniu w analizie materiału roślinnego roztwarzania wspomaganego mikrofalowo i porównaniu go z innymi, konwencjonalnymi technikami. Na przykład roztwarzanie mikrofalowe z kwasem azotowym dało wyniki oznaczeń Cd, Cu, Pb i Zn porównywalne z ekstrakcją pierwiastków przy użyciu HNO_3 z materiału spopielenego konwencjonalnie i w atmosferze gazów utleniających [103]. Porównywalne wyniki oznaczeń pierwiastków ziem rzadkich w mące pszennej, herbacie i gałęziach uzyskano stosując konwencjonalne stapianie, spopielenie i wspomaganą mikrofalowo mineralizację w mieszaninie $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ i HClO_4 [104]. Przy użyciu certyfikowanych materiałów odniesienia (odchard leaves - SRM-1571 i apple leaves - SRM-1515) porównano wyniki oznaczeń lantanowców i aktynowców w próbkach spopielenych i roztworzonych na mokro w układzie otwartym i zamkniętym (odpowiednio: bez i z udziałem grzania mikrofalowego) [105]. Jednak porównanie różnych procedur roztwarzania porostów na mokro (także z grzaniem mikrofalowym) wskazuje, że dopiero zastosowanie kwasu fluorowodorowego umożliwia uzyskanie zadowalającego odzysku [106]. Podobnie w przypadku liści dębu do roztwarzania wspomaganego mikrofalowo użyto HF w celu usunięcia krzemionki [107]. Także Madeddu i Rivoldini potwierdzają potrzebę zastosowania HF do roztwarzania roślin [108].

W przypadku konwencjonalnego spopielenia najistotniejszy jest wybór temperatury – takiej by materia organiczna została całkowicie wyeliminowana bez jakichkolwiek strat składników analitu: w wyniku ulatniania czy wbudowywania w trudno rozpuszczalny osad. Przyjmuje się, że temperatura $\sim 450^\circ\text{C}$ jest wystarczająca

do całkowitego utlenienia materii organicznej, przy minimalnych stratach składników lotnych. Jednak lotność składników zależy nie tylko od ciśnienia par, ale także od tempa dochodzenia do temperatury [109]. Przykłady pokazują, że gdy zaprogramowany gradient temperatury jest wystarczająco niski, nawet temperatura $\sim 520\text{ }^{\circ}\text{C}$ nie powoduje strat pierwiastków takich jak Pb, Zn i Cd [110]. Użycie kwasu solnego lub azotowego do ługowania popiołu nie powoduje rozpuszczania krzemionki ani pierwiastków z nią związanych. Studia przeprowadzone na wielu rodzajach materiałów pochodzenia roślinnego pokazują, że spopielenie w temperaturze $\sim 450\text{ }^{\circ}\text{C}$ nie powoduje żadnych lub tylko minimalne straty badanych pierwiastków, ale część pierwiastków wbudowanych w nierozpuszczalny osad, nie może być odzyskana przez rozpuszczanie czy roztwarzania w kwasach. Straty mogą osiągnąć nawet 20 % ołowiu, 15 % kadmu, 10 % miedzi, 8 % cynku i 5 % manganu [111]. W takich wypadkach skuteczne okazuje się ponowne spopielenie osadu i usunięcie krzemionki przy użyciu kwasu fluorowodorowego. Technika spopielenia próbki i ługowania pierwiastków z popiołu roztworem kwasu azotowego została zastosowana w analizie szpinaku przy użyciu ICP-MS [112]. Podobną procedurę zastosowano przed oznaczeniem zawartości srebra w grzybach metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej (FAAS). Próbki spopieleno w temperaturze $420\text{ }^{\circ}\text{C}$, zwilżano kwasem azotowym, ponownie spopieleno, popiół ekstrahowano 6 M HNO_3 [113]. Jednomolowy kwas azotowy użyto w celu wyekstrahowania pierwiastków z popiołu z warzyw korzeniowych i liściastych [114, 115]. Również warzywa zwęglano w temperaturze $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, spopieleno ($550\text{ }^{\circ}\text{C}$) i zimny popiół rozpuszczano w 50 % HNO_3 przed analizą pierwiastkową przy użyciu ICP-AES [116]. Igliwie różnych gatunków świerka, jodły czy sosny spopielenie jest w temperaturze: $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ [28, 44, 46, 53, 62], $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ [35] albo $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ [54]. Pozostałości po spopieleniu rozpuszczane są w: kwasie solnym [46], kwasie solnym i wodzie utlenionej [41], stężonych kwasach solnym i fluorowodorowym [53] lub mieszaninie stężonych kwasów azotowego i nadchlorowego [35].

Alternatywą procesu całkowitego roztwarzania, lecz tylko w przypadku instrumentalnych metod pomiarowych, które umożliwiają wprowadzanie zawiesin, jest przygotowanie zawiesin sproszkowanych materiałów roślinnych w zakwaszonej wodzie dejonizowanej (albo rozcieńczonych kwasach, gdy chce się rozpuścić część próbki). Jednorodną zawiesinę sporządza bezpośrednio przed wprowadzeniem do autosamplera się przez mieszanie: przy użyciu mieszadełka magnetycznego [117] lub ultradźwięków

[118], co zapobiega sedymentacji cząstek i analizie próbki nie reprezentatywnej. Nie pojawiły dotychczas się publikacje opisujące analizy igliwia z zastosowaniem zawiesin.

2.3. Metody analizy próbek środowiskowych

Istnieje szereg instrumentalnych metod analitycznych zastosowanych w analizie pierwiastkowej roślin wykorzystanych również w badaniach związanych z monitorowaniem zanieczyszczenia środowiska. Zastosowanie znalazły głównie: atomowa spektrometria absorpcyjna, atomowa spektrometria emisyjna, spektrometria mas, chromatografia jonowa i metody elektroanalityczne jak np. elektrody jonoselektywne, polarografia czy woltamperometria. We wszystkich tych metodach ważną rolę odgrywa etap przygotowania próbek związany z reguły z przeprowadzeniem próbki do roztworu.

Płomieniowa atomowa spektrometria absorpcyjna (FAAS) jest nadal techniką bardzo często wykorzystywaną w analizie pierwiastkowej materiałów roślinnych [119-123]. Wiele publikowanych prac potwierdza jej użyteczność w badaniach środowiskowych. W przypadku metody atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją elektrotermiczną (ETAAS) uwaga badaczy zwrócona jest na zastosowanie nowych modyfikatorów. Dotychczas jako modyfikator matrycy roślinnej zastosowano F^- w oznaczeniach fosforu [124], a także mieszaninę Ca, Mg i kwasu askorbinowego w oznaczeniach boru i kwas winowy i pallad w pomiarach koncentracji kadmu. Nowością jest zastosowanie energii ultradźwiękowej do przygotowania zawiesin z tkanek różnych roślin na przykład w celu oznaczenia Co, Cu i Ni przy użyciu ETAAS [125], czy ołowiu w certyfikowanym materiale odniesienia [126]. Większość z publikacji opisuje zastosowanie metody ASA do oznaczeń pojedynczych pierwiastków, choć pojawiają się doniesienia o możliwości zastosowania tej metody do pomiarów wielopierwiastkowych. Przykładem jest wykorzystanie ETA-AAS do jednoczesnego oznaczenia Cd, Cr, Ni i Pb w roztworach zmineralizowanych roślin [127]. Połączenie techniki generowania wodorków z atomową spektrometrią absorpcyjną z atomizacją elektrotermiczną zostało zastosowane do oznaczania arsenu i antymonu w trawie ryżowej [128]. Pozwoliło to obniżyć granice wykrywalności do odpowiednio 25 i 36 pg.

Wielopierwiastkowe analizy roztworów próbek roślinnych i gleb z zastosowaniem atomowej spektrometrii emisyjnej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie stały się już obecnie powszechne [129-131]. Pojawiają się próby niekonwencjonalnego zastosowania tej metody do np. oznaczenia azotu w próbkach roślinnych [132]. Zastosowanie sprzężenia metody ICP-AES i elektrotermicznego odparowywania próbek pozwoliło znacznie obniżyć granice wykrywalności, np. dla kadmu w matrycy roślinnej uzyskano 11 pg [133]. Innowacją stanowi zastosowanie wzbudzenia mikrofalowego do oznaczania kadmu w stałych próbkach liści z użyciem atomowej spektrometrii emisyjnej [134]. Atomowa spektrometria emisyjna z poziomą plazmą wzbudzoną indukcyjnie była wykorzystana do badań interferencji spektralnych pochodzących od pierwiastków matrycy w próbkach roślinnych [135].

Spektrometria mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie jest najmłodszą metodą stosowaną w badaniach próbek środowiskowych. Ze względu na swe zalety, tj. niskie granice wykrywalności, wysokiej czułości, oraz bardzo dużej selektywności pozwalającej na oznaczenie izotopów pierwiastków w złożonych matrycach, jest jedną z najintensywniej rozwijających się technik pomiarowych [136-138]. Zastosowanie tej metody umożliwia np. badanie transportu i dystrybucji boru w drzewach brzoskwiń podlewanych kwasem bornym wzbogaconym ^{10}B [139]. Stabilne izotopy i technikę podwójnej kalibracji zastosowano w oznaczeniach Se w tkankach roślin [140]. Zastosowanie ablacji laserowej w połączeniu z ICP-MS umożliwia badanie homogeniczności materiałów biologicznych. Technika ta (oraz ^{12}C i ^{13}C jako wzorzec wewnętrzny) została zastosowana w celu badania rozmieszczenia 17 pierwiastków w słojach drzewnych [141] oraz różnych pierwiastków w liściach [142]. Laser zastosowano również w analizie metali w drewnie dębu z beczek, w których przechowywane jest wino [143]. Obiecującą innowacją stanowi również zastosowanie odparowania elektrotermicznego w bezpośredniej analizie roślin, gleb i osadów z użyciem ICP-MS [144].

Mimo znacznych kosztów analiz metoda neutronowej analizy aktywacyjnej znajduje coraz szersze zastosowanie dzięki możliwości wielopierwiastkowych oznaczeń znacznej liczby pierwiastków. Wyniki międzylaboratoryjnych badań roślinnych certyfikowanych materiałów odniesienia wskazują, że neutronowa analiza aktywacyjna (NAA) jest metodą odpowiednią do oznaczeń zawartości Ce, Co, Mn, Rb, Th i V,

natomiast zastosowanie ICP-AES pozwala uzyskać wiarygodne wyniki oznaczeń Ba, Ca, Cr, Fe, K, Mn, Mo, P, S, Sr i Ti [145]. Metoda NAA znalazła także zastosowanie w wielopierwiastkowej analizie szpinaku, siana i alg [146]. NAA z separacją radiochemiczną zastosowano do oznaczania As i Se w sałacie morskiej i białej koniczynie [147].

Technika fluorescencji promieniowania rentgenowskiego jest szeroko stosowana przez geologów do analiz próbek skał i nieco rzadziej przez biologów i chemików w badaniach środowiska [148, 149]. Podstawową zaletą tej techniki jest jej niedestrukcyjność, co umożliwia zarchiwizowanie próbki (w postaci tabletki) i jej ponowną analizę. Ponadto dzięki zastosowaniu metody XRF możliwe jest oznaczenie pierwiastków takich jak siarka czy tytan, ważnych z punktu widzenia monitoringu [150]. Fluorescencję rentgenowską z dyspersją długości fali zastosowano z powodzeniem w analizie porostów (certyfikowanego materiału odniesienia) roztworzonych na mokro w kwasie azotowym [151]. Technika fluorescencji rentgenowskiej z dyspersją energii została wykorzystana do oznaczenia pierwiastków w porostach w badaniach nad sezonowymi zmianami stężeń w tych bioindykatorach [152]. Metodę tą (EDXRF) użyto również w analizie igliwia sosny zwyczajnej i świerka pospolitego w celu sprawdzenia zależności między nowymi symptomami uszkodzeń drzew a składem pierwiastkowym liści [153].

Podobnie jak w przypadku pozostałych materiałów roślinnych koncentracje pierwiastków w igliwiu (także w certyfikowanych materiałach odniesienia) oznaczane są z zastosowaniem:

1. płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej [44, 46, 53, 66, 67, 72, 74, 154],
2. atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją elektrotermiczną [41, 155],
3. atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją w kuwecie grafitowej [156]
4. neutronowej analizy aktywacyjnej [31, 39, 40, 57, 65, 78, 91, 157],
5. spektrometria mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie [38],
6. fluorescencyjna spektrometria rentgenowska [64, 68, 71],
7. atomowa spektrometria emisyjna z plazmą wzbudzoną indukcyjnie [59, 68, 55, 154, 28, 61, 62, 95, 66, 35, 45, 94, 61, 54, 73, 74],
8. spektrofotometria [67],
9. analiza elementarna [67],
10. woltamperometria [63].

2.4. Statystyczna ocena wyników pomiarów analitycznych [158-160]

Nowe techniki instrumentalne pozwalają uzyskać coraz niższe granice wykrywalności i coraz wyższą precyzję oraz spełnić wysokie wymagania co do jakości oznaczeń. Do zadań chemika analityka należy również ocena wyników uzyskanych w czasie pomiarów i samej metody. Taką ocenę umożliwiają metody statystyki matematycznej. W czasie oceny i dyskusji wyników najczęściej uwzględniane są precyzja i dokładność. Precyzja (powtarzalność, odtwarzalność) rezultatów oznaczeń zależy od błędów losowych popełnianych w trakcie wykonywania analizy. Do oceny wyników stosuje się najczęściej wartości średnie i miary rozrzutu. Najczęściej dla serii pomiarów wyznacza się średnią arytmetyczną. Miarą rozproszenia wyników wokół wartości średniej z reguły jest odchylenie standardowe i rozstęp. Odchylenie standardowe jest określone następująco:

(WZÓR 2.4.1)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

gdzie: x_i – poszczególne wartości pomiarów, $\bar{x}$ – wartość średnia wszystkich x_i , n – liczba pomiarów. Wielkość $n-1$ określa się jako liczbę stopni swobody. Rozstępem R nazywa się różnicę między największym i najmniejszym wynikiem w serii pomiarów, czyli:

(WZÓR 2.4.2)

$$R = x_{\max} - x_{\min}$$

Stosuje się go do charakteryzowania rozproszenia wyników losowych o małej liczności ($n < 10$). W przypadku dużej liczby pomiarów ($n > 10$) rozstęp jest złym oszacowaniem rozproszenia w populacji ponieważ uwzględnia (w przeciwieństwie do odchylenia standardowego) tylko dwa wyniki z całej ich serii.

Do obliczenia odchylenia standardowego można wykorzystać również wyniki wielokrotnych analiz próbek o różnej zawartości oznaczanego składnika. Jeżeli zbadano m próbek i dla każdej z nich wykonano n_j równoległych oznaczeń, to otrzymane wyniki można przedstawić według poniższego schematu:

Numer próbki	Numer wyniku					
	1	2	...	i	...	n_j
1	x_{11}	x_{12}	...	x_{1i}	...	
2	x_{21}	x_{22}	...	x_{2i}	...	
:	:	:		:		
j	x_{j1}	x_{j2}	...	x_{ji}	...	
:	:	:		:		
m	x_{m1}	x_{m2}	...	x_{mi}	...	

Wówczas odchylenie standardowe s (lub wariancję s^2) oblicza się ze wzoru:

(WZÓR 2.4.3)

$$s^2 = \frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1) + \dots + s_m^2(n_m - 1)}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots + (n_m - 1)} =$$

(WZÓR 2.4.4)

$$= \frac{\sum (x_{1i} - \bar{x}_1)^2 + \sum (x_{2i} - \bar{x}_2)^2 + \dots + \sum (x_{ji} - \bar{x}_j)^2}{m - n}$$

(WZÓR 2.4.5)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{n - m}}$$

i ma ono $f = n - m$ stopni swobody, gdzie: n – ogólna liczba wyników analiz, a m – liczba próbek.

Przy małej liczbie wyników określamy niekiedy przedział ufności. W chemii analitycznej do obliczenia przedziału ufności powszechnie stosowany jest rozkład t (rozkład Studenta). W tym przypadku przedział ufności dla wartości średniej $\bar{x}$ można obliczyć korzystając z wzoru:

(WZÓR 2.4.6)

$$\bar{x} \pm \frac{t(P, f) \cdot s}{\sqrt{n_j}} = \bar{x} \pm \Delta \bar{x}$$

Stosowane do obliczenia wartości $t(P, f)$ można odczytać z odpowiednich tablic.

Zależność między dwiema wielkościami x i y można opisać liczbowo za pomocą współczynnika korelacji r ($-1 \leq r \leq +1$). Gdy $r = -1$ lub $r = +1$, zachodzi ścisła zależność liniowa. W przypadku, gdy $r = 0$, wielkości x i y są nieskorelowane. W przypadku korelacji liniowej współczynnik r oblicza się na podstawie wzoru:

(WZÓR 2.4.7)

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

Korelacje są najczęściej określane w badaniach klinicznych, w których sprawdzana jest zależność między stosowanym leczeniem a reakcją organizmów [161, 162]. Badana jest także zależność między zawartością pierwiastków w płynach ustrojowych i otoczeniu. Porównano zawartość kadmu i ołowiu w moczu i krwi kobiet w średnim wieku z terenów miejskich i wiejskich [163]. Oznaczono zawartość Zn, Ni, Cr i Pb we krwi, osoczu i moczu mężczyzn odpornych na alergię [164]. Sprawdzana jest również zależność między pierwiastkami w różnych tkankach zwierzęcych. Określono korelacje między zawartością miedzi w wątrobie, nerkach i mózgu szczurów, których dieta „wzbogacana” była miedzią [165]. Zbadano zależność między zawartością arsenu, kadmu, chromu, ołowiu, manganu, rtęci i selenu w tłuszczu, wątrobie, mięśniach, skórze i paznokciach aligatorów amerykańskich (*Alligator mississippiensis*) z trzech jezior Florydy [166]. W przypadku próbek roślinnych najczęściej oblicza się korelacje między

zawartością pierwiastków w glebie i tkankach roślinnych. Tak postępowano badając akumulację metali ciężkich w porostach (*Conocephalum conicum*, *Marchantia polymorpha* i *Pellia epiphylla*) próbkowanych na Dolnym Śląsku, w Tatrach, Puszczy Augustowskiej i Morawskim Krasie (Czechy) [167] oraz transport składników odżywczych (Ca, K, Mg i P) do igliwia świerka (*Picea rubens* Sarg.) ze Wschodniej Wirginii [45], a także zależność między koncentracjami Ca, K i Mg w igliwiu świerka pospolitego a odległością od cementowni [37]. Badane są także zależności między pierwiastkami w różnych tkankach roślinnych. Współczynniki korelacji międzypierwiastkowych obliczono dla Al, B, Cu, Fe, Pb, Sr i Zn w igliwiu (*Picea rubens* Sarg.) ze Wschodniej Wirginii [59] i (*Picea abies*) próbkowanego na Słowacji [67] oraz Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb i Zn w igliwiu [72] i korze [60] sosny zwyczajnej.

2.5. Ekstrakcja jako metoda przygotowania próbek do pomiaru

Ekstrakcja to szeroko stosowana metoda rozdzielania składników próbki, wykorzystująca różnice rozpuszczalności związków chemicznych najczęściej w dwóch nie mieszających się cieczach (z których jedna jest z reguły roztwór wodny, a druga odpowiedni rozpuszczalnik organiczny). Terminem ekstrakcja określa się również proces ługowania analitu w układzie ciało stałe - ciecz. Metoda ta może służyć do wydzielania, rozdzielania, a często także do zagęszczania oznaczanego składnika, albo do usuwania składników przeszkadzających. Jest wykorzystywana do oddzielania analitu od matrycy, eliminacji lub redukcji interferencji pochodzących od innych składników a także zateżniania analitu do poziomu umożliwiającego oznaczenie. Selektowność wydzielania lub rozdzielania uzyskuje się przez zastosowanie wybiórczo działających odczynników i dobór warunków przeprowadzania reakcji chemicznej i procesu ekstrakcji. Czynniki mającymi największy wpływ na proces ługowania są:

1. rodzaj ekstrahenta (i jego stężenie);
2. temperatura;
3. czas ekstrakcji.

W badaniach próbek stałych, często w związku z analizą specjacyjną, procedury ekstrakcji stosowane jako metody przygotowania próbek do oznaczeń pierwiastków śladowych i głównych. Zastosowanie mają dwa typy procedur: ekstrakcja pojedyncza (jednoetapowa) i ekstrakcja sekwencyjna (frakcjonowanie).

a) Ekstrakcja jednoetapowa

Jednoetapowa ekstrakcja w układzie ciało stałe – ciecz ma najczęściej zastosowanie w badaniach próbek gleby. W tym przypadku jeden ekstrahent stosowany jest do ługowania i identyfikacji wybranej frakcji, zazwyczaj pierwiastków bioprzyswajalnych. Badania obejmują oznaczenie metali, głównie: Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb i Zn. Do wyekstrahowania części lub całości tych pierwiastków używane są:

1. woda [168, 169],
2. azotan sodu [170],
3. azotan amonu [170],
4. chlorek wapnia [171, 172],

5. chlorek magnezu [173],
6. EDTA [174, 175],
7. DTPA [176],
8. kwas octowy [177, 178],
9. octan amonu [175, 179],
10. Coca-Cola [180].

Ostatnio technikę tą zaczęto stosować jako alternatywną (w stosunku do tradycyjnej mineralizacji próbek roślinnych i zwierzęcych) metodę przeprowadzenia analitu do roztworu.

W analizie pierwiastkowej materiałów biologicznych jako ekstrahenty użyto:

1. wodę destylowaną [181-183],
2. kwas octowy [182],
3. kwas cytrynowy [182],
4. chlorek amonu [184],
5. EDTA [183],
6. $(\text{CH}_3)_4\text{NOH-EDTA}$ [185],
7. wodorotlenek sodu [186],
8. mieszaninę acetonitryl - woda [186],
9. mieszaninę metanol - woda [186],
10. wodorotlenek czterobutyloamoni [186],
11. kwas solny i kwas azotowy [187 - 196].

Procedurę jednoetapowej ekstrakcji zastosowano do ługowania:

- pierwiastków śladowych z liści herbaty [181],
- Ca, K, Mg i Na oraz anionów (HPO_4^{2-} , NO_3^- , SO_4^{2-}) z kukurydzy, liści kapusty, liści brzoskwini oraz liści i łodyg bawełny [182],
- Al, B, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sr, V i Zn z liści szpinaku i cebuli [183],
- potasu z próbek roślinnych [184],
- różnych pierwiastków z liści jabłoni [185],
- arsenu i antymonu z liści topoli oraz pędów świerka i sosny [186].

Dobre wyniki (wysoki odzysk i precyzja) uzyskano stosując rozcieńczone kwasy solny i azotowy. Te odczynniki zastosowano do ługowania:

- Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Pb i Zn z igliwia sosny [187],
- kory sosny i mchu [188],
- szeregu pierwiastków w badaniach botanicznych certyfikowanych materiałów odniesienia [189]
- tkanek zwierzęcych [190 - 192],
- boru z biologicznych materiałów odniesienia (np. jabłek, brzoskwiń, liści pomidorów i pistacji, słomy jęczmienia, źdźbeł kukurydzy i kiwi oraz proszku z jajek) [192],
- Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni i Zn z liści jabłoni (NIST SRM 1515) oraz materiałów biologicznych takich jak: wątroba, mięśnie, glony [193],
- Ca, K, Mg i Mn z igliwia świerka oraz drewna świerka i dębu [194],
- Ca, Mg i K w igłach sosny i świerka [195],
- Cd, Cu, Pb, i Sn z próbek roślin morskich [196].

Większość ekstrakcji przeprowadzano na gorąco, tylko w dwóch przypadkach procedur z wykorzystaniem rozcieńczonych kwasów pierwiastki ługowano w temperaturze pokojowej [190, 191]. Wysoką temperaturę uzyskiwano dzięki konwencjonalnemu ogrzewaniu. Bardzo rzadko pojawiają się prace opisujące wykorzystanie energii mikrofalowej [183, 185, 192, 193]. Tylko w przypadku oznaczeń kilku pierwiastków w tkankach skorupiaków (np. małży jadalnych) [197 - 199] i Cd, Cu, Mn i Pb w biologicznych materiałach referencyjnych [200] zastosowano ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękowo. Do oznaczeń pierwiastków śladowych i głównych w ekstraktach najczęściej stosowano atomową spektrometrię absorpcyjną (F-AAS i ET-AAS), pomiary wykonywano również metodą spektrometrii emisyjnej (ICP-AES [183, 192], DCP-AES, [194]), spektrometrii mas [192] czy chromatografii jonowej [182].

b) Ekstrakcja sekwencyjna

W procedurach ekstrakcji sekwencyjnej stosowane są kolejno po sobie odczynniki o coraz bardziej drastycznym działaniu. Taki sposób postępowania ma zastosowanie w badaniu:

- osadów rzecznych [201 - 204],
- materiałów geologicznych [205],
- gleb [206 - 210],
- osadów morskich [207, 211 - 213],
- osadów z lagun i jezior [207, 214 - 217],
- osadów komunalnych [221 - 222],
- popiołów [220].

Nikt jeszcze nie zastosował ekstrakcji wieloetapowej w badaniach próbek biologicznych.

Większość procedur ekstrakcji sekwencyjnej opisanych w literaturze oparta jest na schemacie zaproponowanym przez Tessiera i jego zespół [201]. Przy tym sposobie postępowania różnicowanych jest kilka frakcji pierwiastków:

1. frakcja wymienna (metale zaadsorbowane),
2. frakcja węglanowa (metale związane z węglowodorami),
3. frakcja podatna na redukcję (metale związane z amorficznymi wodorotlenkami Fe i Mn),
4. frakcja utlenialna (metale związane ze składnikami organicznymi i siarczkowymi – matrycą organiczną),
5. frakcja szczątkowa (metale związane ze szkieletem mineralnym).

Różnicowane tych frakcji jest możliwe dzięki zastosowaniu następującej procedury:

1. frakcja wymienna
1 g osadu rzecznoego ekstrahowano z 8 ml chlorku magnezu (1M MgCl_2 , pH = 7,0) wytrząsając 1 godzinę w temperaturze pokojowej;
2. frakcja węglanowa
osad z punktu 1. ługowano w temperaturze pokojowej z 8 ml octanu sodu (1 M, pH = 5,0 - regulowane kwasem octowym) przez 5 godzin ciągle mieszając;

3. frakcja podatna na redukcję

do pozostałości po etapie 2. dodano 20 ml 0,04 M chlorowodoru hydroksyaminy w 25 % kwasie octowym, ekstrakcję przeprowadzano w temperaturze 96 °C, 6 godzin mieszając od czasu do czasu;

4. frakcja utlenialna

do osadu z poprzedniego etapu dodano 3 ml 0,02 M kwasu azotowego i 5 ml 30% wody utlenionej, mieszaninę ogrzewano w temperaturze 85 °C przez 2 godziny, po tym czasie dodano 3 ml 30% H_2O_2 i próbkę ponownie ogrzewano przez 3 godziny, po ostudzeniu do próbki dodano 5 ml 3,2 M octanu amonu w 20 % kwasie azotowym, próbkę rozcieńczono do objętości 20 ml i wytrząsano 30 min;

5. pozostałość

1 gram próbki roztwarzano w mieszaninie stężonych kwasów: nadchlorowego (2 ml) i fluorowodorowego (10 ml) w tyglu platynowym, po odparowaniu prawie do sucha dodano 1 ml HClO_4 i ogrzewano do pojawienia się białych dymów, pozostałość rozpuszczono w 12 M kwasie solnym i uzupełniono do objętości 25 ml.

Pomiędzy poszczególnymi etapami próbki odwirowywano w ciągu 30 min. z prędkością 10000 obrotów na minutę, roztwór z nad osadu oddzielano przy pomocy pipety i pozostawiano do analizy, natomiast osad przemywano 8 ml wody dejonizowanej, którą po odwirowaniu (30 min) odrzucano. We wszystkich frakcjach oznaczono zawartość: Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb i Zn przy pomocy atomowej spektrometrii absorpcyjnej.

W poszczególnych etapach procedur ekstrakcji sekwencyjnej najczęściej stosowanymi ekstrahentami są:

- Ad. 1. MgCl_2 [206, 219], $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ [208, 216], NH_4NO_3 [220], CaCl_2 [171, 172];
- Ad. 2. CH_3COONa [206, 207, 216, 219], CH_3COOH [208], $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ [172, 220];
- Ad. 3. $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ [206, 216], $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}\cdot\text{HCl}$ ¹ $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ / CH_3COOH ² [207], $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ / CH_3COOH [208, 219], $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ - $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ [220], cytrynian, szczawian amonu [216, 220], NaOH [171, 172];
- Ad. 4. H_2O_2 [216], $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HNO}_3$ [206, 208, 219], HCl/HNO_3 [207], $(\text{NH}_4)_2\text{EDTA}$ [220], Na_2EDTA [171];
- Ad. 5. mieszaniny silnych kwasów, np.: HNO_3 [171] woda królewska [172], HF /woda królewska [206], $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ [219, 220], $\text{HF}/\text{HClO}_4/\text{HNO}_3$ [207].

¹- amorficzne wodorotlenki, ²- krystaliczne tlenki.

W niektórych przypadkach w pierwszym etapie ekstrakcji sekwencyjnej jako ekstrahent stosowana jest woda [171, 222]. Pomiędzy poszczególnymi etapami ekstrakcji wymagane jest przemywanie pozostałości. W ekstraktach oznaczane są zawartości: Al, As, B, Be, Ca, Ce, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, K, Li, La, Mn, Mg, Na, Ni, P, Pb, Sc, Sn, Sr, Th, Ti, Tl, U, V i Zn.

Bezpośredni wpływ na wydajność i powtarzalność tej techniki mają:

1. właściwości chemiczne, selektywność i wydajność wybranych ekstrahentów,
2. kolejność poszczególnych kroków,
3. warunki pracy, takie jak: czas ekstrakcji, stosunek mas ciała stałego do roztworu itp.,
4. specyficzne „efekty matrycowe” związane z zawartością faz i pierwiastków oraz readsorpcją.

Oprócz badań dotyczących wyboru odpowiedniego dla danej frakcji pierwiastków ekstrahenta przeprowadzono szereg eksperymentów mających na celu dobór optymalnych warunków przeprowadzania ekstrakcji sekwencyjnej. Sprawdzono wpływ:

- pH ekstrahentów,
- ich stężenia,
- temperatury ekstrakcji,
- czasu ługowania,
- atmosfery nad roztworem (powietrze, azot),
- sposobu rozdziału faz - przeanalizowano oddziaływanie prędkości wirowania, czasu, wirowania, rodzaju użytych sączków, itp.

Instytut - The Measurement and Testing Programme (dawniej CBR) zorganizował międzylaboratoryjne badania mające na celu porównanie różnych procedur ekstrakcji sekwencyjnej. W wyniku tych badań stwierdzono w roku 1992, że najbardziej odpowiednim i wystarczającym sposobem postępowania dla certyfikowanych próbek gleby jest zastosowanie EDTA lub kwasu octowego do zidentyfikowania frakcji metali bioprzyswajalnych. Natomiast w przypadku osadów najlepsze wyniki uzyskano po zastosowaniu trzyetapowej procedury:

1. CH_3COOH ;
2. $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$;
3. $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$,

do zidentyfikowania i pomiaru zawartości:

1. metali przyswajalnych i związanych z węglanami;
2. metali wbudowanych w tlenki żelaza i manganu;
3. frakcji organicznej i siarczkowej.

Do oznaczania pierwiastków śladowych i głównych w ekstraktach stosowane są:

- atomowa spektrometria absorpcyjna (ASA) [202, 205, 207 - 210, 212, 219, 220],
- atomowa spektrometria emisyjna (ICP-AES) [172, 204, 206 - 208 (Ca, K i Na), 210, 213, 214],
- spektrometria mas (ICP-MS) [207, 211],
- fluorescencja rentgenowska [204],
- dyfrakcja rentgenowska [206, 220]
- spektrofotometria UV/VIS [219 (Ca, K i Na)].

W ostatnich latach przeprowadzono badania, w których zamiast konwencjonalnego wytrząsania próbek zastosowano energię mikrofalową i ultradźwięki. Promieniowanie mikrofalowe zastosowano jako wspomaganie ekstrakcji: Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb i Zn z certyfikowanych materiałów odniesienia (gleba, osad rzeczny i osad komunalny) przy pomocy kwasu azotowego i wody królewskiej [222]. Grzanie mikrofalowe wykorzystano również w pięcioetapowej ekstrakcji (schemat Tessiera) Ca, Cu, Fe i Mg z osadów z weneckiej laguny oraz osadu komunalnego [223] oraz Cr, Cu, Ni, Pb i Zn z osadu komunalnego [218] a także Cu, Pb i Zn z gleby [224]. W celu przyspieszenia procesu ekstrakcji zastosowano energię ultradźwięków. Przeprowadzono ługowanie Cr, Cu, Ni, Pb i Zn z osadu komunalnego stosując schemat Tessiera [225, 226] oraz procedurę BCR [227].

Porównanie warunków, w których przeprowadzana była konwencjonalna, wspomagana mikrofalowo i ultradźwiękami pięcioetapowa ekstrakcja sekwencyjna oraz rezultatów pomiarów zawartości pierwiastków w poszczególnych frakcjach przedstawione jest w tabeli 1. Wyniki oznaczeń zawartości Cu, Cr, Ni, Pb i Zn w ekstraktach z poszczególnych etapów wskazują na dobrą zgodność wydajności procesów (odzysk 98 – 101 %). Znaczące różnice dla trzech metod uzyskano jedynie miedzi, niklu i ołowiu. Zastosowanie promieniowania mikrofalowego i energii ultradźwiękowej znacznie skróciło czas eksperymentów ekstrakcji sekwencyjnej.

Tabela 1. Porównanie warunków eksperymentalnych ekstrakcji konwencjonalnej, wspomaganej mikrofalowo i ultradźwiękami przeprowadzonej zgodnie ze schematem Tessiera (na podstawie [217, 225])

Etap	Fracja	Odczynnik	EKSTRAKCJA						
			konwencjonalna (wytrząsanie)	wspomagana mikrofalowo	wyniki odzysk* [%]		wspomagana ultradźwiękowo (100 W, 20 kHz)	wyniki odzysk** [%]	
1.	Wymienna	8 ml 1M MgCl ₂ , pH = 7	1 h, 25 °C	30 s, 90 W	Cu	58,7	3 min., 50 % amplitudy	Cu	98,9
					Ni	99,5		Ni	97,2
					Pb	101		Pb	97,6
					Zn	101		Zn	99,5
2.	Węglanowa	8 ml 1M octanu sodu pH = 5	5 h, 25 °C	30 s, 90 W	Cu	63,5	1 min., 50 % amplitudy	Cu	98,6
					Ni	99,2		Ni	97,0
					Pb	98,8		Pb	99,7
					Zn	98,7		Zn	98,2
3.	Redukowalna	20 ml 0,04 M NH ₂ OH*HCl/ CH ₃ COOH (25 % w/w)	6 h, 96 °C	30 s, 90 W	Cu	861	7 min., 50 % amplitudy	Cu	253
					Ni	99,6		Ni	96,2
					Pb	98,5		Pb	97,6
					Zn	98,3		Zn	99,0
4.	Utlenialna	3 ml 0,02 M HNO ₃ / 5 ml 30 % H ₂ O ₂ + 3 ml 30 % H ₂ O ₂ + 5 ml 3,2 M octanu amonu	2 h , 85 °C	30 s, 270 W 10 s, 270 W	Cu	85,8	7 min., 50 % amp. 2 min., 50 % amp.	Cu	28,0
					Ni	98,8		Ni	99,5
			3 h, 85 °C		Pb	1170		Pb	97,4
			30 min., 25 °C		Zn	100		Zn	64,9

*- odzysk obliczony jako stosunek między zawartością metalu wyekstrahowaną z zastosowaniem mikrofal a tą z ekstrakcji konwencjonalnej

** - odzysk obliczony jako stosunek między zawartością metalu wyekstrahowaną z zastosowaniem ultradźwięków a tą z ekstrakcji konwencjonalnej

3. Część eksperymentalna

3.1. Materiał badawczy

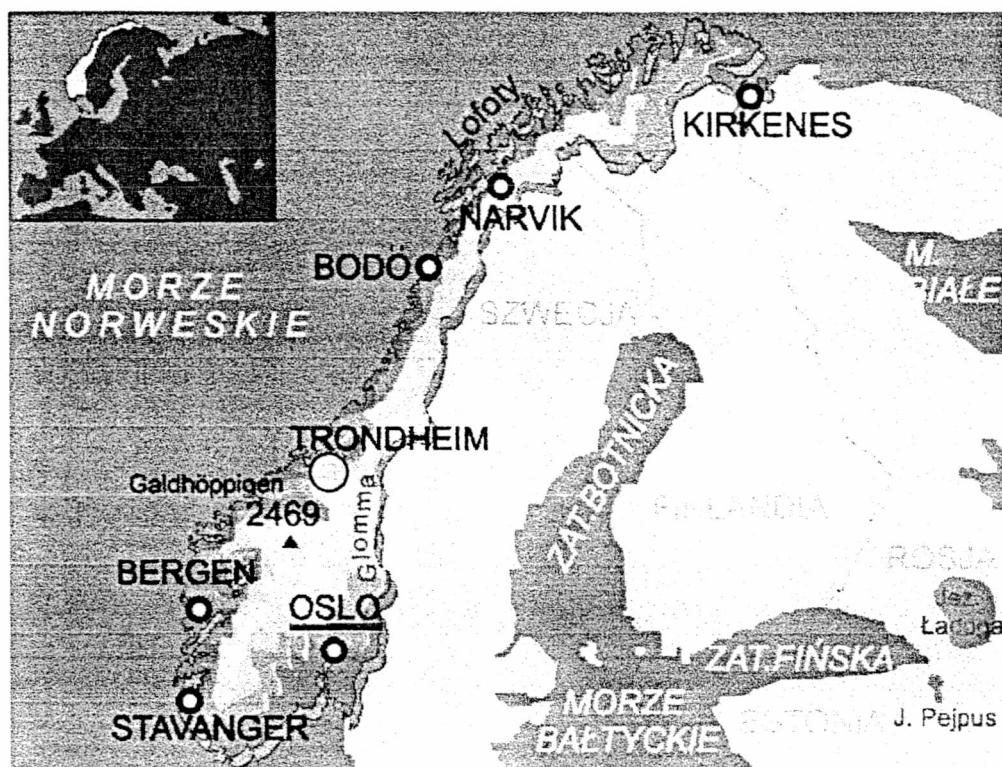
Materiał badań stanowi igliwie świerka pospolitego (*Picea abies*), sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*) i cisu pospolitego (*Taxus boccata*).

3.2. Próbkowanie

Próbki igliwia świerka pospolitego, sosny zwyczajnej i cisu pospolitego zostały pobrane po zakończeniu okresu wegetacji (w listopadzie i grudniu) z pięciu miejsc na Dolnym Śląsku i z dwóch siedlisk w Trondheim (Norwegia). Lokalizację miejsc próbkowania przedstawiono na mapach zamieszczonych poniżej. W zależności od ilości drzew rosnących w każdym z miejsc, próbki pobrano z trzech do dwunastu młodych drzew przez obcięcie gałęzi ze środkowej części korony i środka korony.



Oznaczenie lokalizacji miejsc próbkowania



Oznaczenie lokalizacji miejsc próbkowania

3.3. Procedury przygotowania materiału badawczego do analizy

3.3.1. Przygotowanie igliwia

W laboratorium, pył i osady usunięto z powierzchni igliwia przez mycie w wodzie z kranu a następnie dejonizowanej. Umyte igliwie suszono w przewiewnym pomieszczeniu do uzyskania masy powietrznie suchej. Suche igły obrywano z gałązek. Analizie poddano igły jednoroczne (z tegorocznego przyrostu). Igliwie z drzew rosnących na jednym stanowisku zmieszano w jedną próbkę laboratoryjną, przechowywaną do czasu analizy w foliowych torebkach.

3.3.2. Stosowane odczynniki chemiczne

Roztwory wzorców przygotowane zostały przez rozcieńczenie wzorców jedno- i wielopierwiastkowych (firm SPEX Industries i Merck) o stężeniu 1000 µg/ml wodą dejonizowaną. Wodę dejonizowaną (o oporze właściwym 18,3 MΩ cm) przygotowywano przy użyciu zestawu do oczyszczania wody Easy pure RF (model 703, Barnstead, Thermolyne Corporation, USA).

Do przygotowania próbek stosowano następujące odczynniki (co najmniej czyste do analiz): 65% kwas azotowy - Merck KGaA, Darmstadt, Germany; PPH "Standard", Lublin, Polska; 35 - 38% kwas chlorowodorowy - PPH "Standard", Lublin, Polska; 95 - 97% kwas siarkowy - TZPN "Polchem", Toruń, Polska; 30% nadtlenek wodoru - PPH-POCh, Gliwice, Polska; chloroform - PPH-POCh, Gliwice; toluen - PPH-POCh, Gliwice; czterohydrofuran - PPH-POCh, Gliwice; octan amonu - Przedsiębiorstwo Chemiczne ODCZYNNIKI Sp. z o.o., Lublin, Polska; kwas octowy - PPH-POCh, Gliwice; kwas cytrynowy - PPH-POCh, Gliwice; kwas szczawiowy - PPH-POCh, Gliwice; chlorek magnezu - PPH-POCh, Gliwice; azotan amonu - PPH-POCh, Gliwice; chlorek amonu - PPH-POCh, Gliwice; chlorowodorek hydroksyaminy - PPH-POCh, Gliwice; wersenian sodu - PPH-POCh, Gliwice.

Szkło i plastikowe naczynia były myte przez moczenie ich przez 48 godzin w 10 % kwasie azotowym albo działanie ultradźwięków (30 min) i wielokrotne płukanie w wodzie dejonizowanej.

3.3.3. Procedury mineralizacji i roztwarzania

a) Roztwarzanie klasyczne

Około 10 g dokładnie odważonej próbki umieszczano w czystej, szklanej zlewce. Do zlewki dodawano 100 ml stężonego kwasu azotowego i przykrywano szkiełkiem zegarkowym. Następnego dnia zlewkę z zawartością ostrożnie ogrzewano na płycie grzejnej. W razie potrzeby dodawano następne porcje kwasu i ponownie ogrzewano roztwór. Po ostudzeniu do zawartości zlewki dodawano kroplami wodę utlenioną i zlewkę ogrzewano – ten krok powtarzano aż do całkowitego odbarwienia roztworu. Po zmineralizowaniu roztwór odparowywano do niewielkich objętości.

b) Roztworzenie mikrofalowe

Do naczynia teflonowego dokładnie odważano około 0,5 g próbki, dodawano 6 ml kwasu azotowego i 1 ml wody utlenionej. Roztworzenie przeprowadzane w układzie zamkniętym (model MLS – 1200 MEGA, firmy Milestone, Włochy) według programu przedstawionego w tabeli 2.

Tabela 2. Procedura roztwarzania mikrofalowego

Etap	Moc [W]	Czas [min]
1	250	2
2	0	6
3	250	5
4	400	5
5	0	5
6	600	5

c) Spopielanie

10 g igliwia dokładnie odważanego do porcelanowego tygla spopielano w piecu mikrofalowym (mikrofalowy system do spopielania próbek model MAS 7000 firmy CEM Corporation, USA) według schematu przedstawionego w tabeli 3.

Tabela 3. Procedura spopielania w piecu mikrofalowym

Etap	Temperatura [°C]	Czas ¹ [min]	Czas ² [min]
1	100	30	5
2	300	30	5
3	550	45	720

Czas¹ – czas „dochodzenia” do temperatury

Czas² – czas utrzymywania w temperaturze

Pozostałość po spopielaniu zwilżano wodą dejonizowaną i rozpuszczano w 6 ml kwasu azotowego.

Na zakończenie wszystkich procedur roztwarzania igliwia ostudzoną zawartość naczyń przenoszono ilościowo do kolb miarowych (roztwarzanie klasyczne i spopielanie – 50 ml, roztwarzanie mikrofalowe – 25 ml) dodawano kwasu azotowego (roztwór końcowy 5%) i uzupełniano do kreski wodą dejonizowaną. Wszystkie roztwory sączono przez twardy sączelek.

3.3.4. Procedury ekstrakcji

a) Ekstrakcja konwencjonalna

Odważano dokładnie ok. 2g igliwia. Próbkę umieszczano w szklanej probówce o pojemności 150 ml, dodawano 20 ml ekstrahenta i naczynie zamykano (zaklejano parafilmem). Probki wytrząsano przez 24 godziny w łaźni wodnej w temperaturze pokojowej.

b) Ekstrakcja wspomagana mikrofalowo

2 g próbki igliwia odważano do naczynia teflonowego, dodawano 20 ml odczynnika ekstrahującego i poddawano działaniu promieniowania mikrofalowego o mocy 150 W w układzie do mineralizacji mikrofalowej (model MLS – 1200 MEGA, firmy Milestone).

c) Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami

Próbkę igliwia świerka (2 g odważone do zakręcanego naczynia plastikowego) i ekstrahent (20 ml) przez 10 minut poddawano działaniu ultradźwięków (w myjce ultradźwiękowej z grzaniem typu ULTRASONICS – H firmy Selecta s.a., Hiszpania) w temperaturze pokojowej.

Ponieważ wszystkie ekstrakty miały postać zawiesin do oznaczania pierwiastków zastosowano spektrometr wyposażony w nebulizer rowkowy.

3.4. Metody pomiarowe

Atomowa spektrometria emisyjna plazmy sprzężonej indukcyjnie

Koncentracje pierwiastków w analizowanych rozworach zmierzono z zastosowaniem atomowej spektrometrii emisyjnej z argonową plazmą sprzężoną indukcyjnie jako źródłem wzbudzenia. Charakterystyka i zastosowanie tej metody są dobrze opisane w literaturze i dlatego zagadnienie to pominięto w tej rozprawie. Do pomiarów wykorzystano aparat firmy Jobin-Yvon model 38S pracujący w warunkach prezentowanych w tabeli 4.

Tabela 4. Charakterystyka i warunki pracy spektrometru

Parametry wyładowania:			
Typ generatora		JY 2300	
Częstotliwość generatora		27,3 MHz	
Nebulizer		krzyżowy / Meinharda / rowkowy	
Komora mgielna		typu Scott'a	
Moc		1000 W	
Przepływ gazu plazmowego		13 l min ⁻¹	
Przepływ gazu osłaniającego		0,2 l min ⁻¹	
Przepływ gazu nośnego		0,25 l min ⁻¹ / 0,35 l min ⁻¹ *	
Szybkość podawania próbki		0,8 ml min ⁻¹ / 1,2 ml min ⁻¹ *	
* - dane dotyczące pomiarów z nebulizerem rowkowym			
Monochromator:			
Typ:		HR 1000 (układ Czerny-Turnera)	
Długość drogi optycznej		1m	
Siatki dyfrakcyjne		4320 i 2400 rysmm ⁻¹	
Szerokość szczelin		20 µm / 50 µm (wejście / wyjście)	
Linie analityczne (długość w nm):			
Al	226,922; 396,152	Mg	279,553; 280,270; 285,213
B	249,773	Mn	257,610; 259,373
Ba	233,527	Ni	221,647; 231,604
Ca	317,933; 393,366	P	213,618; 214,914
Cd	214,438; 226,502; 228,802	Pb	220,353
Co	228,616	Sr	407,771
Cr	205,552; 267,716	Ti	334,941
Cu	224,700; 324,754	V	292,402
Fe	238,204; 259,940	Zn	202,548; 213,856

Wyboru linii analitycznych dokonano biorąc pod uwagę następujące parametry: czułość linii, stosunek intensywności linii do intensywności tła, granicę wykrywalności, wpływ innych pierwiastków na sygnał analitu oraz zakres liniowości krzywych kalibracji.

Proszkowa dyfrakcja rentgenowska

Przeprowadzono analizę jakościową metodą dyfrakcji rentgenowskiej. Do badań stosowano proszkowy dyfraktometr rentgenowski X'PERT firmy Philips. Zastosowano promieniowanie CuK_α , goniometr pionowy oraz licznikową rejestrację kąta i położenia refleksu. Obróbka danych, np. usuwanie tła oraz obliczanie pozycji, intensywności integralnej i wysokości pików została przeprowadzona przy użyciu programu komputerowego DHN - Powder Diffraction System. Identyfikację poszczególnych faz przeprowadzono poprzez porównanie otrzymanego widma rentgenowskiego badanej próbki z widmami wzorcowym znajdującymi się w bazie danych ICDD PDF-2.

Tabela 5. Charakterystyka i warunki pracy dyfraktometru

Generator	PW 1830
Moduł kontrolny	PW 3710
Licznik	PW 3719
Promieniowanie	CuK_α
Napięcie	40 kV
Natężenie	30 mA
Czas zliczania pojedynczego impulsu	2 s
Zakres 2 theta	5 - 60°
Krok	0,05

4. Wyniki badań i dyskusja

Wszystkie koncentracje pierwiastków podane w tej pracy (jak i inne wyniki, np. wydajności ekstrakcji) są średnimi arytmetycznymi uzyskanymi z kilku (pięciu lub trzech) równoległych próbek. Obok wartości średnich obliczono też odchylenia standardowe i (niekiedy lub) przedziały ufności korzystając ze wzorów: 2.4.5 i 2.4.6. Stwierdzono, że w większości wypadków wyniki dla obu tych wielkości (charakteryzujących rozproszenie wyników) są zbliżone.

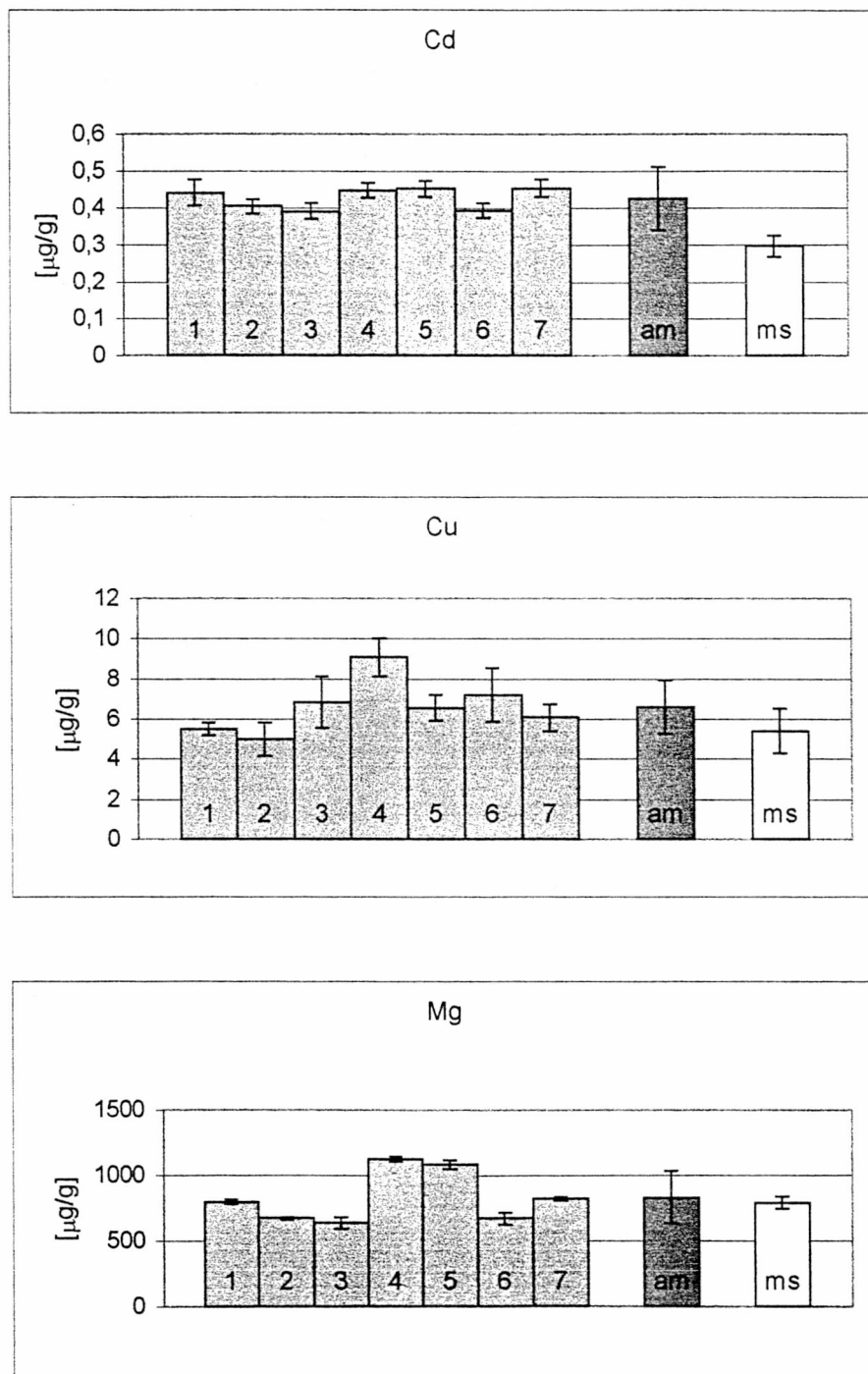
4.1. Analiza śladowa igliwia z zastosowaniem atomowej spektrometrii emisyjnej z plazmą sprzężoną indukcyjnie

4.1.1. Wpływ sposobu próbkowania na uzyskiwane wyniki

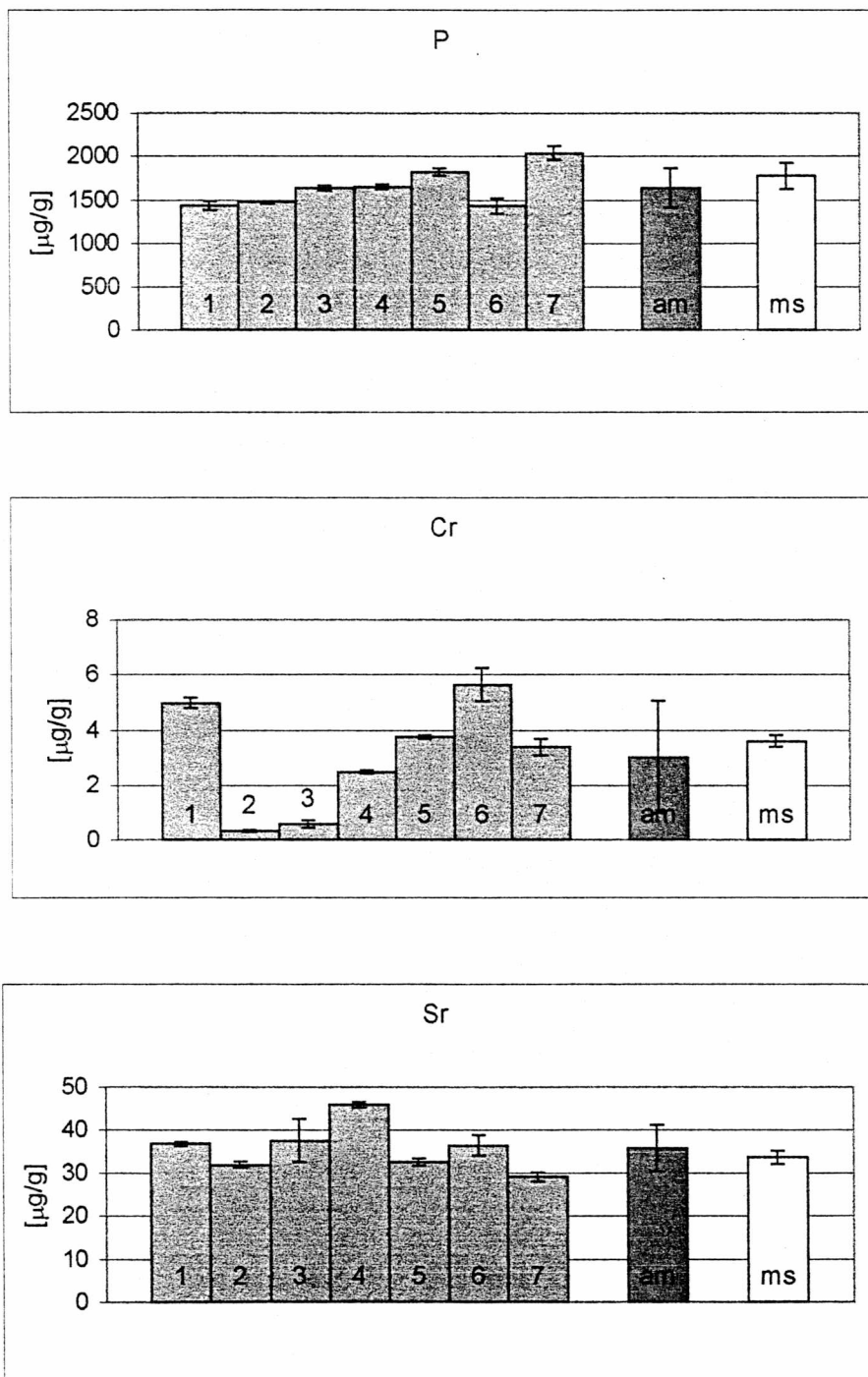
Porównano dwie procedury przygotowania próbek laboratoryjnych igliwia świerka srebrnego charakteryzujących jedną powierzchnię próbkowania. Analizie poddano próbki igliwia z pojedynczych drzew oraz jedną próbkę (charakteryzującą to samo siedlisko) powstałą przez zmieszanie równych porcji igliwia z każdego z drzew. Na podstawie wyników zaprezentowanych na rysunkach 1 i 2 można stwierdzić, że średnie arytmetyczne ze stężeń pierwiastków obliczone dla 7 prób analizowanych oddzielnie są zgodne z wartościami stężeń zmierzonymi w próbce mieszanej. Podobną zależność między koncentracjami zaobserwowano również dla pierwiastków, dla których wyniki nie są tutaj zamieszczone. Tylko dla glinu zauważono znaczące różnice między koncentracjami pierwiastków w próbce mieszanej i średnią arytmetyczną. Oczywiście precyzja stężeń obliczonych jako średnia arytmetyczna jest znacząco niższa od tej dla próbki mieszanej. Rezultaty badań wskazują na brak wpływu sposobu przygotowania próbki na uzyskiwane wyniki analityczne.

Analiza wyników pomiarów koncentracji pierwiastków w igliwiu próbkowanym z pojedynczych drzew wskazuje na możliwość podziału pierwiastków na dwie grupy: - pierwszą – pierwiastków (np. B, Ba, Ca, Cd, Mg, P i Sr), których stężenia w próbkach z pojedynczych drzew nie różnią się znacząco,

- drugą – dla której różnice w koncentracji analitu w igliwiu z drzew 1-7 są znacznie wyższe od odchylenia standardowego (np. Al, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Ti i Zn).



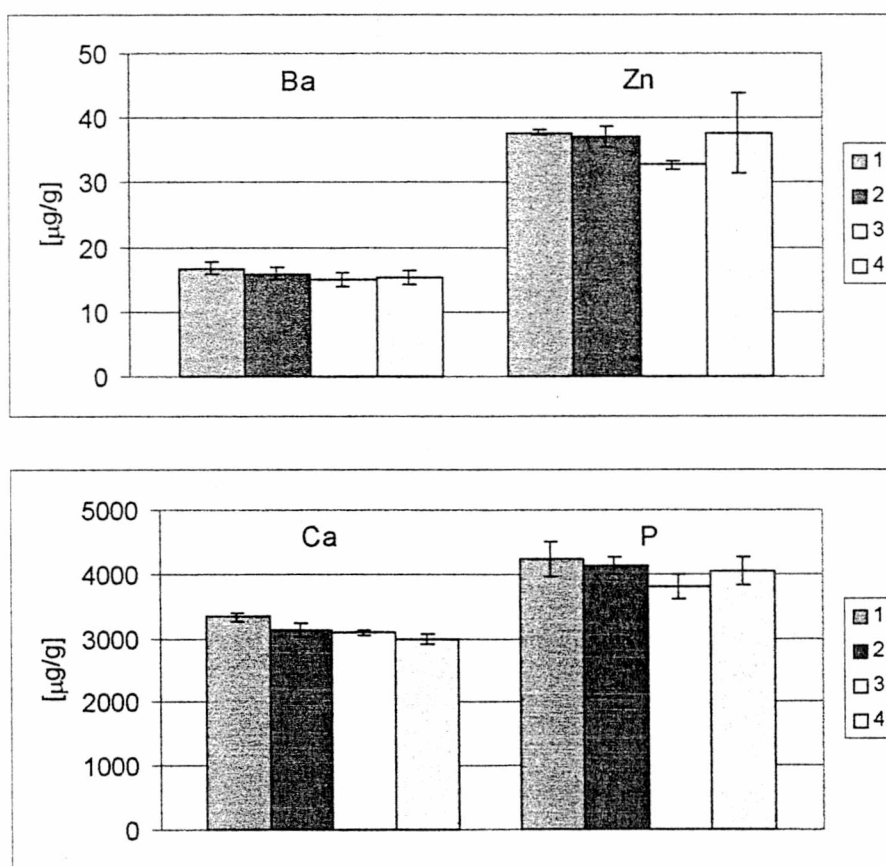
Rysunek 1. Koncentracje kadmu, miedzi i magnezu - różne metody przygotowania próbek: 1-7 – poszczególne drzewa, am – średnia arytmetyczna z próbek 1-7, ms – próbka mieszana



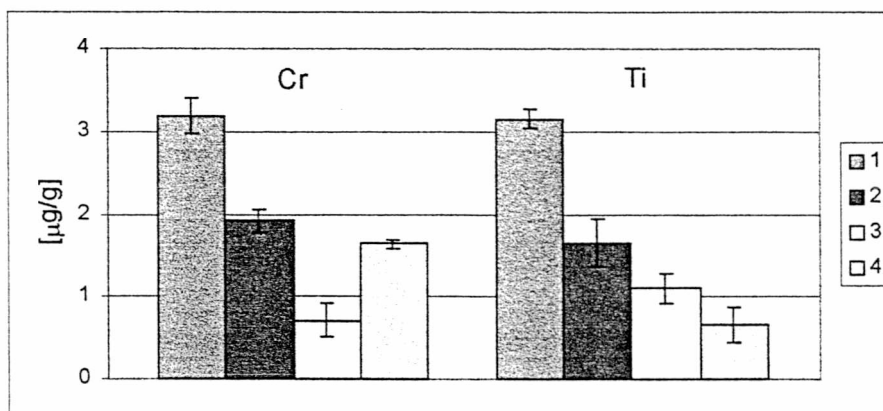
Rysunek 2. Koncentracje fosforu, chromu i strontu - różne metody przygotowania próbek: 1-7 – poszczególne drzewa, am – średnia arytmetyczna z próbek 1-7, ms – próbka mieszana

4.1.2. Porównanie procedur mycia

Sprawdzono efektywność różnych procedur mycia igliwia świerka przy użyciu wody dejonizowanej, chloroformu i mieszaniny toluen / czterohydrofuran. Dotychczas nie opublikowano prac, w których porównano działanie różnych roztworów myjących. W tej pracy porównano również zawartość pierwiastków w igliwiu umyтым i nie umyтым roztwarzając próbki w mieszaninie kwasu azotowego i wody utlenionej. Wyniki oznaczeń baru, cynku, wapnia, chromu i tytanu zaprezentowane są na rysunkach 3 i 4. Zaobserwowano wyraźne różnice w koncentracjach pierwiastków w igliwiu myтым oraz w igliwiu nie myтым. Dla Ca, Ba, P i Zn różnice stężeń są niewielkie, natomiast dla chromu, tytanu i pozostałych pierwiastków są one wyraźne i znaczne. Na podstawie uzyskanych wyników można jednoznacznie stwierdzić, że każdy z badanych odczynników „usuwa” pewną ilość analizowanych pierwiastków. Nie można jest jednak stwierdzić, który z nich zmywa zanieczyszczenia tylko z powierzchni igliwia, a który łączy pierwiastki z próbek.



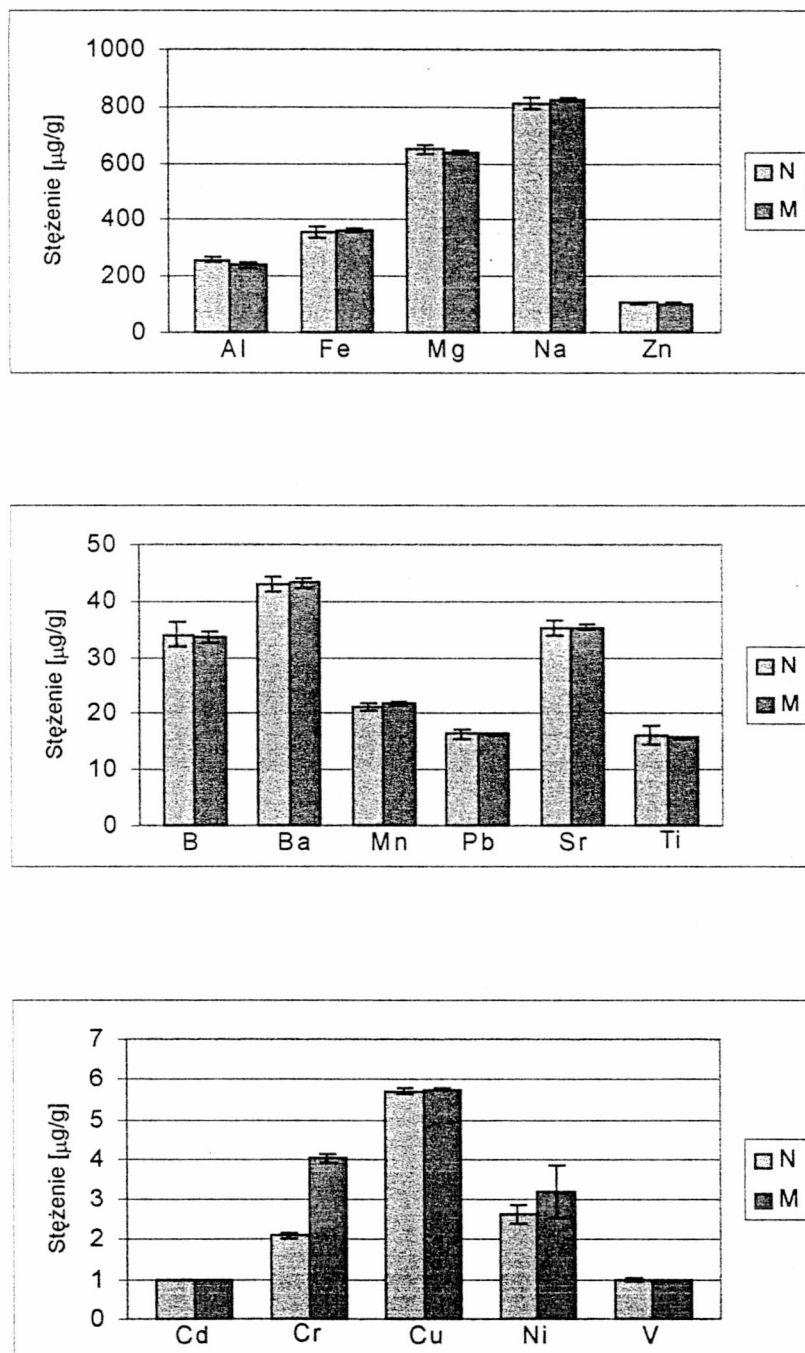
Rysunek 3. Zawartość wapnia, baru, fosforu i cynku w igliwiu niemyтым (1) i myтым (2 - woda, 3 - chloroform, 4 - toluen / czterohydrofuran)



Rysunek 4. Zawartość chromu i tytanu w igliwiu niemytym (1) i mytym (2 - woda, 3 - chloroform, 4 - tolueń / czterohydrofuran)

4.1.3. Homogeniczność próbki

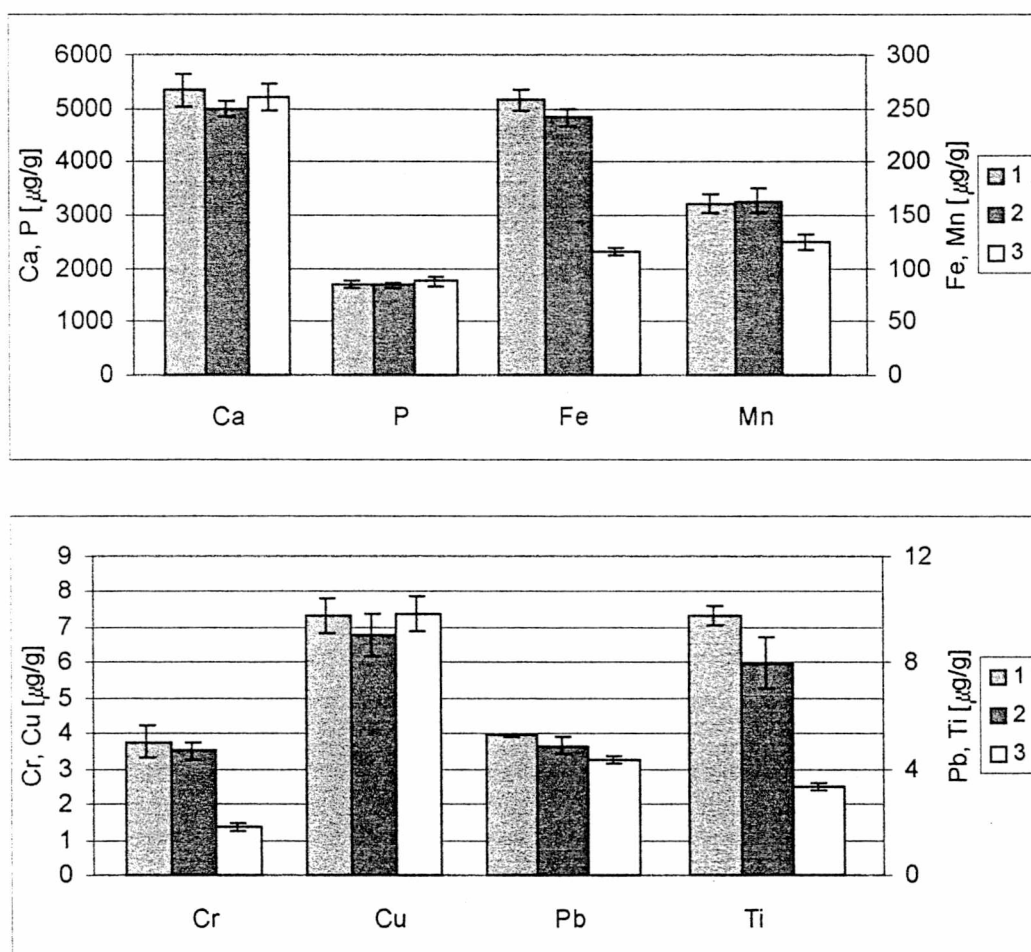
Badano homogeniczność mielonych i niezmielonych próbek igliwia mierząc trzykrotnie zawartość pierwiastków w dziesięciu próbkach równoległych każdego rodzaju próbek do analiz. Wybrane wyniki oznaczeń przedstawione są na rysunku 5. Porównano koncentracje pierwiastków zmierzone w roztworach, które otrzymano w wyniku klasycznej mineralizacji na mokro próbek igliwia zmielonego o masie 1 g i niezmielonego o masie 10 g. Dla większości analizowanych pierwiastków dla rozpatrywanych tu przypadków uzyskano zgodne wyniki oznaczeń. Jednak rozrzuty wyników dla próbek nie mielonych są większe od tych dla próbek mielonych (odchylenia standardowe są nawet trzykrotnie większe). Wyjątki stanowiły chrom i nikiel – w przypadku tych pierwiastków stężenia w próbkach mielonych były wyższe od koncentracji zmierzonych w próbkach nie mielonych. Oznaczenia te były również mniej precyzyjne. Należy jednak zaznaczyć, że zgodność wyników uzyskano przy dziesięciokrotnie większej masie próbki niezmielonej. Niższa masa igliwia niezmielonego prowadziła do znacznego obniżenia precyzji oznaczeń. W dalszych eksperymentach stosowano mielenie igliwia.



Rysunek 5. Badania homogeniczności próbek (N – niezmielonych , M – mielonych)

4.1.4. Porównanie metod mineralizacji próbek

Porównano trzy, najczęściej obecnie stosowane w badaniach materiałów roślinnych, metody mineralizacji próbek. Zastosowano mineralizację na mokro w układzie otwartym oraz zamkniętym (mineralizacja wspomagana mikrofalowo) i spopielenie. Badania przeprowadzono na igliwiu świerka pospolitego i cisu pospolitego (który dotąd nie był przedmiotem badań). Wybrane wyniki oznaczeń pierwiastków śladowych i głównych w liściach świerka są przedstawione na rysunku 6.

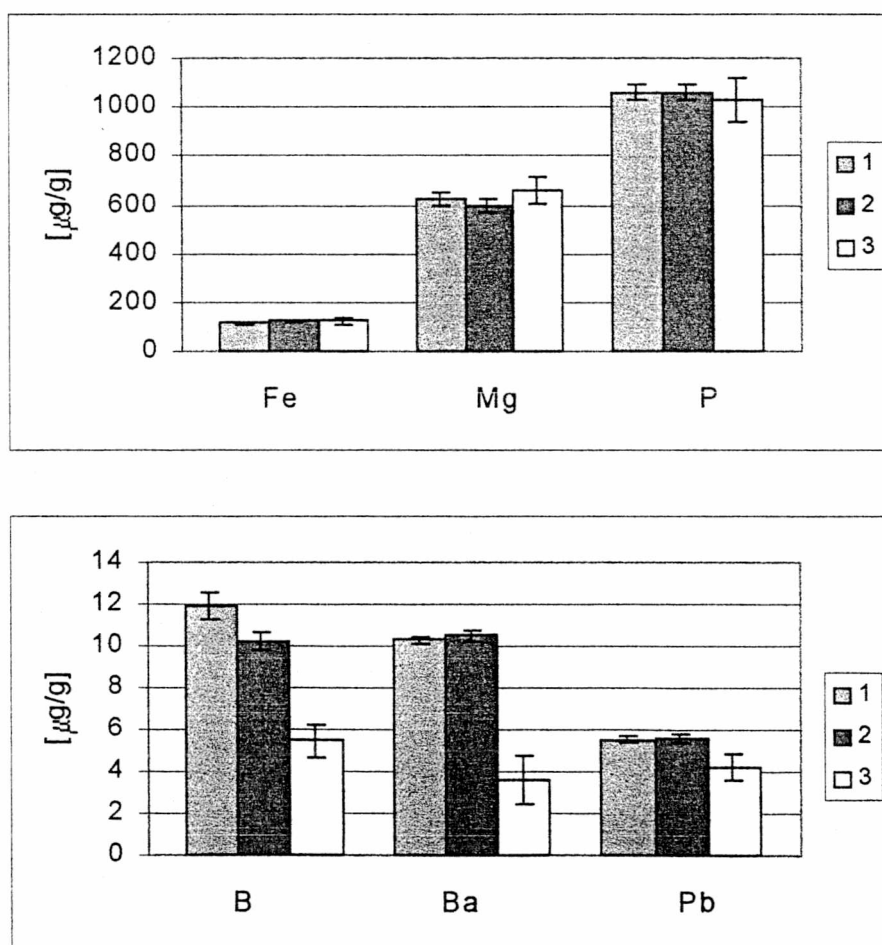


Rysunek 6. Porównanie metod mineralizacji próbek: 1 – mineralizacja mikrofalowa, 2 – roztwarzanie klasyczne, 3 – spopielenie.

Dla pierwiastków matrycy (Ca, Mg, P) i większości pozostałych trzy badane metody dają zbliżone wyniki. Jednak, dla Mn, Al, Ti i Cr, spopielenie okazało się nieefektywne. Może to być związane z tworzeniem się związków trudno lub tylko częściowo rozpuszczalnych

[228]. W zastosowaniu do próbek igliwia najlepszą okazała się mineralizacja mikrofalowa ze względu na najwyższą precyzję uzyskiwanych wyników, niewielką ilość zużywanych odczynników i krótki czas roztwarzania. W przypadku igliwia świerka i cisu zaobserwowano zbieżność wyników.

Badano także proces roztwarzania igliwia za pomocą różnych stężonych kwasów nieorganicznych. W tym celu analizowany materiał roztworzono przy użyciu: kwasu azotowego, kwasu azotowego i chlorowodorowego oraz kwasu azotowego i kwasu siarkowego. Porównanie zawartości pierwiastków w roztworach otrzymanych w wyniku roztwarzania igliwia z różnymi kwasami (i dodatkiem wody utlenionej) pozwala stwierdzić, że dla większości z nich uzyskano zgodne wyniki (na przykład dla Fe, Mg i P – rysunek 7).



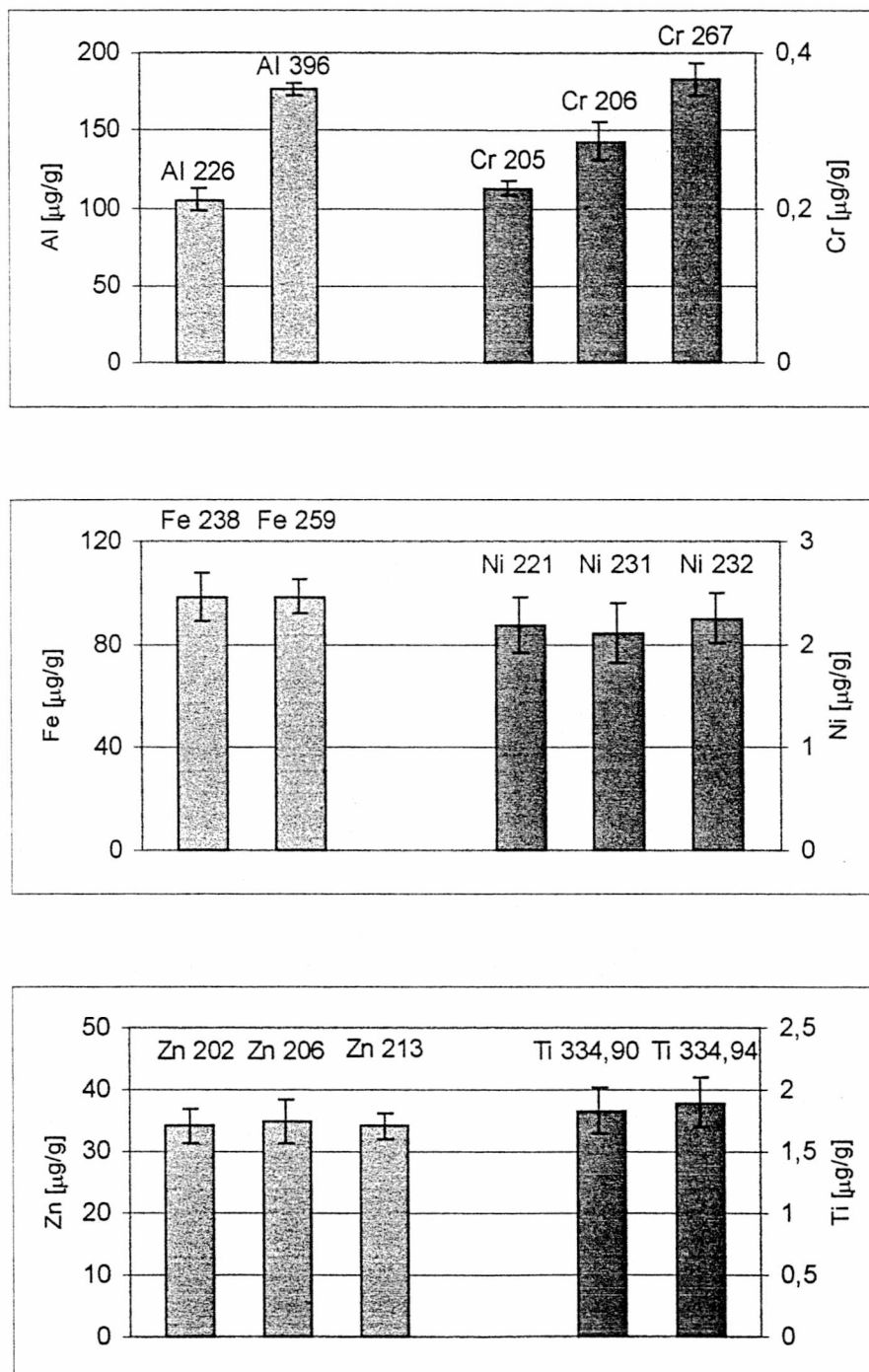
Rysunek 7. Porównanie metod roztwarzania z zastosowaniem: 1 – kwasu azotowego, 2 – kwasów azotowego i solnego, 3 – mieszaniny kwasów azotowego i siarkowego

Tylko dla kilku pierwiastków (takich jak: B, Ba i Pb) stężenia się znacząco różnią. Największe różnice znaleziono dla B i Ba. W przypadku Ba związane jest to z powstawaniem trudno rozpuszczalnego BaSO_4 . Natomiast dużo niższa zawartość B w roztworze po roztwarzaniu igliwia w mieszaninie HNO_3 i H_2SO_4 jest nieco zaskakujące. Ten wynik sugeruje stratę boru podczas ogrzewania z kwasem siarkowym. Precyzja pomiarów stężeń prawie wszystkich pierwiastków w próbkach roztworzonych w mieszaninie stężonych kwasów azotowego i siarkowego była najmniejsza.

Najwyższe stężenia i najniższe odchylenia standardowe otrzymano w roztworach uzyskanych po zastosowaniu stężonego kwasu azotowego dlatego też kwas ten został zastosowany w dalszych eksperymentach.

4.1.5. Wybór linii analitycznych

Właściwy wybór linii analitycznych podczas prowadzenia oznaczeń metodą ICP-AES jest bardzo istotną sprawą. Każdy z pierwiastków ma od kilku do kilkunastu linii analitycznych (stosowanych w oznaczeniach), różniących się od siebie takimi parametrami jak: intensywność, granica wykrywalności, stosunek sygnału pomiarowego do tła. Podczas pomiarów należy wybrać linię, która jest wystarczająco czuła, ma odpowiednio niską granicę wykrywalności i jest wolna od interferencji spektralnych. Istotne znaczenie ma także szeroki zakres prostoliniowości krzywych kalibracji. Koncentracje badanych pierwiastków w próbkach igliwia świerka pospolitego, sosny zwyczajnej i cisu pospolitego mierzone były z kilku linii analitycznych. Dla większości z nich uzyskano zgodne wyniki pomiarów stężeń z różnych linii emisyjnych (patrz rysunek 8 – na którym przedstawione są wyniki oznaczeń Al, Cr, Fe, Ni, Ti i Zn w igliwiu świerka). Tylko dla glinu i chromu we wszystkich próbkach zaobserwowano znaczące różnice w stężeniach. W przypadku glinu może to być wyjaśnione spektralnymi interferencjami dla linii Al 396 [229, 230]. Do dalszych badań wybrano wykorzystano linie Al 226 i Cr 267 (rekomendowane przez „Official methods of analysis” [231]).



Rysunek 8. Koncentracje wybranych pierwiastków wyznaczone w oparciu o różne linie analityczne

4.1.6. Analiza materiału referencyjnego

Chcąc skontrolować dokładność wykonywanych oznaczeń można oznaczyć analit kilkoma niezależnymi technikami analitycznymi, przeprowadzić analizę próbek z dodatkiem analitu (metoda dodatków wzorca) lub zanalizować certyfikowany materiał odniesienia. W tej pracy, w celu sprawdzenia zastosowanej procedury przygotowania próbek oraz dokładności metody pomiarowej zanalizowano materiał referencyjny. Próbkę certyfikowanego materiału odniesienia (CBR 101 – igliwie świerka pospolitego pobrane w Europie) zmineralizowano na mokro w układzie do mineralizacji mikrofalowej za pomocą mieszaniny kwasu azotowego (który jest najczęściej stosowanym utleniaczem w analizie igliwia) i wody utlenionej. Pomiar koncentracji wybranych pierwiastków wykonano z zastosowaniem ICP-AES. Wyniki pomiarów przedstawione są w tabeli 6.

Tabela 6. Analiza certyfikowanego materiału odniesienia (CBR 101- spruce needles (*Picea abies*) from Eurpe)

		Wyniki pomiarów	
		HNO ₃ + H ₂ O ₂	HF + HNO ₃
Wartości certyfikowane			
Al	173 ± 5	105 ± 4	160 ± 14
Mg	619 ± 9	560 ± 14	623 ± 14
Mn	915 ± 11	918 ± 23	858 ± 56
P	1690 ± 40	1697 ± 92	-
Zn	35,3 ± 2,3	33,8 ± 1,8	34,8 ± 3,1
Wartości niecertyfikowane			
Cr	-	2,1 ± 0,2	2,4 ± 0,2
Cu	4,9 ± 0,2	4,7 ± 0,7	5,0 ± 0,7
Fe	151 ± 7	143 ± 3	159 ± 10
Ni	-	5,8 ± 0,6	5,9 ± 0,5
Sr	-	5,5 ± 0,3	6,5 ± 1,3
Ti	-	3,3 ± 0,5	8,6 ± 0,6
V	-	0,48 ± 0,16	0,46 ± 0,14

Dla większości analizowanych pierwiastków zaobserwowano dobrą zgodność uzyskanych wyników z wartościami certyfikowanymi, co oznacza, że zastosowane

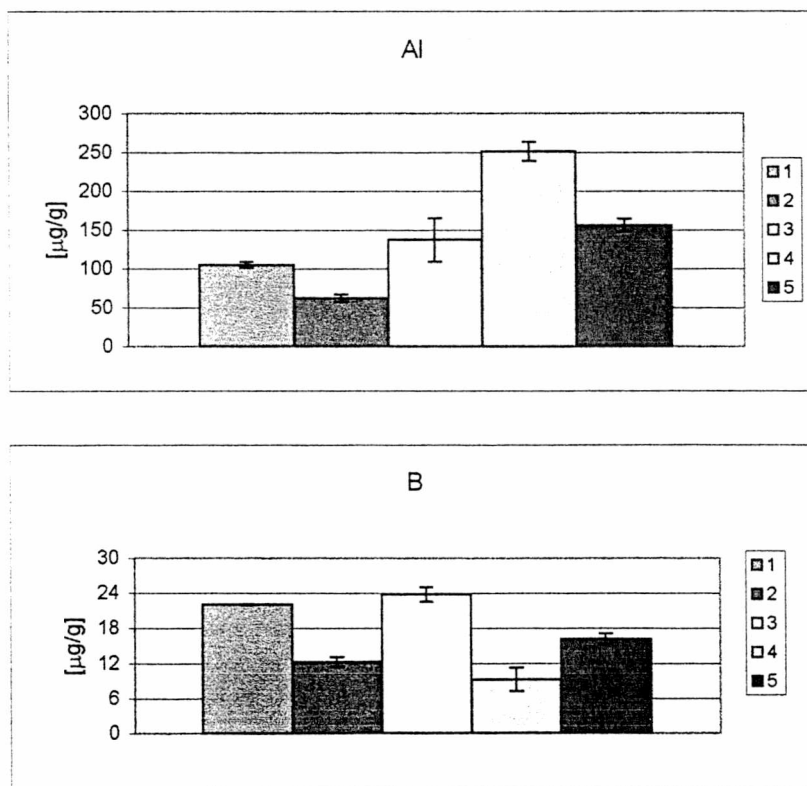
metody analityczne są dokładne. Tylko dla glinu i magnezu wyniki te się znacząco różnią (tj. odpowiednio o około: 40 i 10 %).

W celu porównania ten sam materiał roztworzono zgodnie z procedurą polecaną przez producenta materiału odniesienia [232]: to znaczy w mieszaninie stężonych kwasów fluorowodorowego i azotowego (odpowiednio: 1 i 5 ml), choć w literaturze brak jest opisu stosowania HF do roztwarzania igliwia. W przypadku glinu, magnezu, strontu i tytanu zastosowanie HF pozwoliło uzyskać wyższe stężenia. Dla strontu i magnezu zmiana stężenia mieści się w granicach odchylenia standardowego, ale w przypadku glinu i tytanu różnica jest znaczna. Natomiast dla manganu otrzymano wynik niższy o około 6 %. Należy też zaznaczyć, że precyzja wyników w przypadku zastosowania kwasu fluorowodorowego jest niższa dla glinu, manganu, cynku, żelaza i strontu.

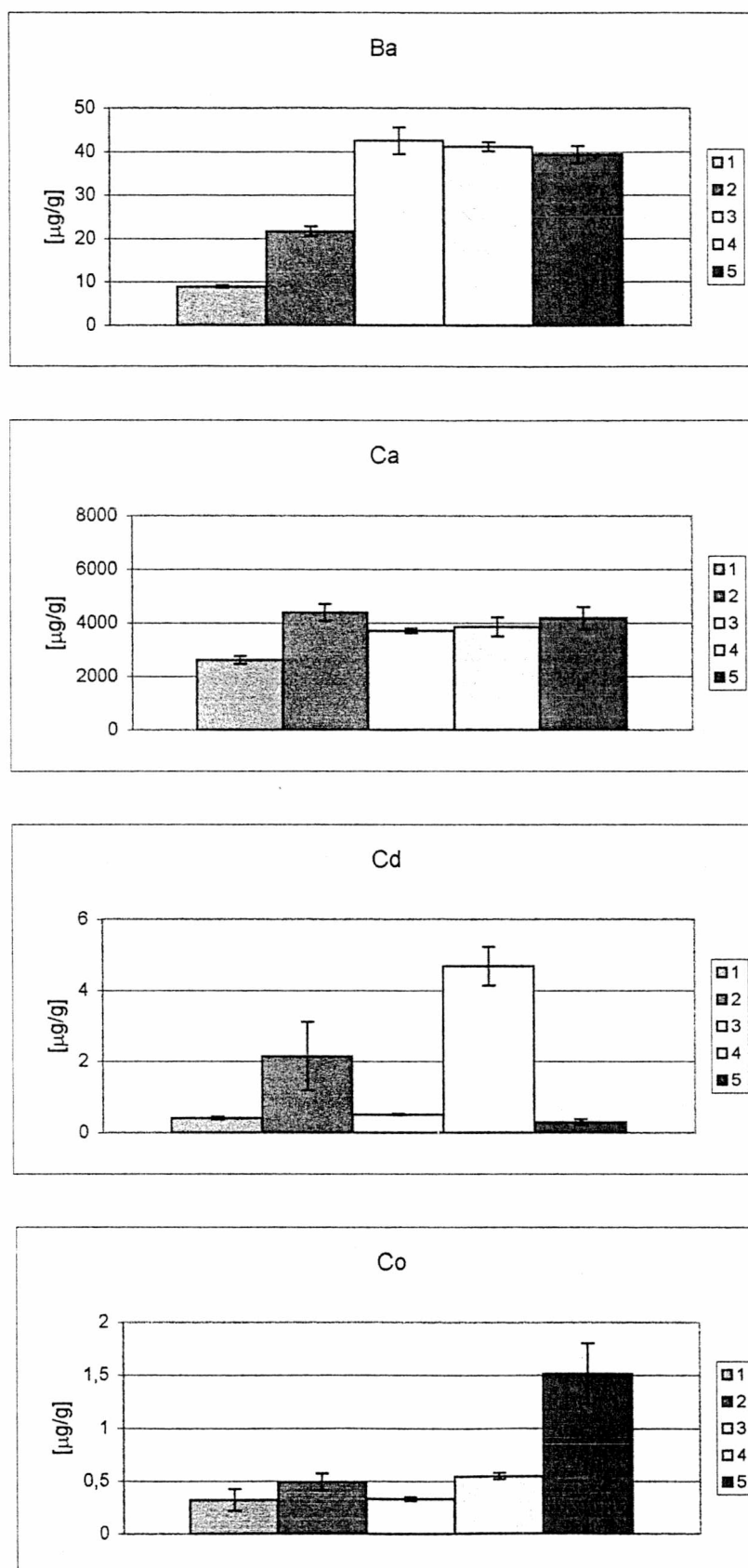
4.1.7. Porównanie koncentracji pierwiastków w igliwiu próbkowanym w Polsce i Norwegii

4.1.7.1. Analiza igliwia świerka pospolitego (*Picea abies*)

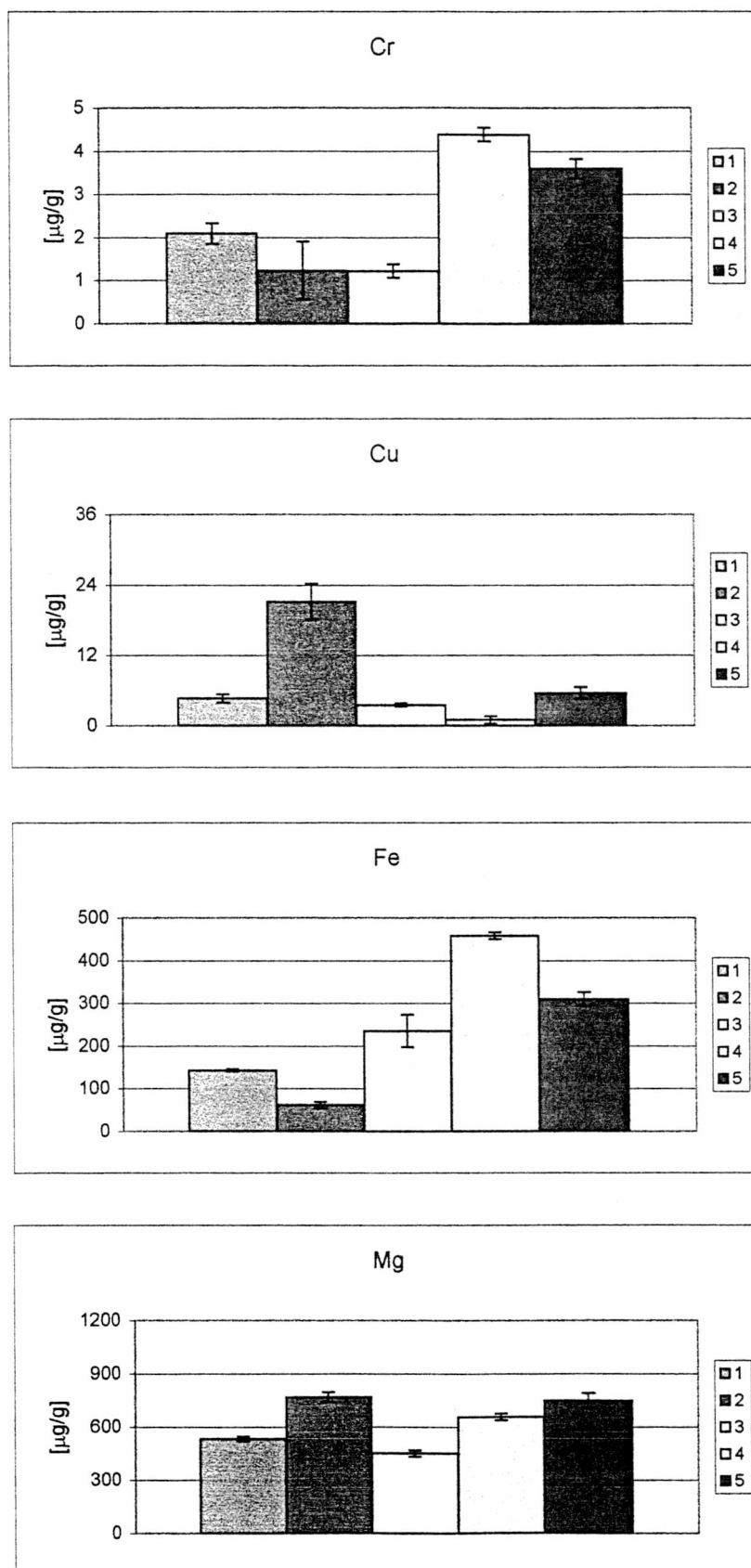
Analizie poddano igliwie świerka próbkowanego w Polsce i Norwegii. Na terenie Dolnego Śląska igły pobrano w Oławie (miejsca oznaczone jako 3, 4 i 5) - mieście, w którym od lat działa huta cynku i ołowiu - Huta Oława. W Norwegii próbki pobrano w mieście Trondheim (2). Oznaczone zawartości badanych pierwiastków porównano z koncentracjami zmierzonymi w certyfikowanym materiale odniesienia, CBR 101 (1). Wyniki oznaczeń wybranych pierwiastków przedstawiono na rysunkach 9 - 13.



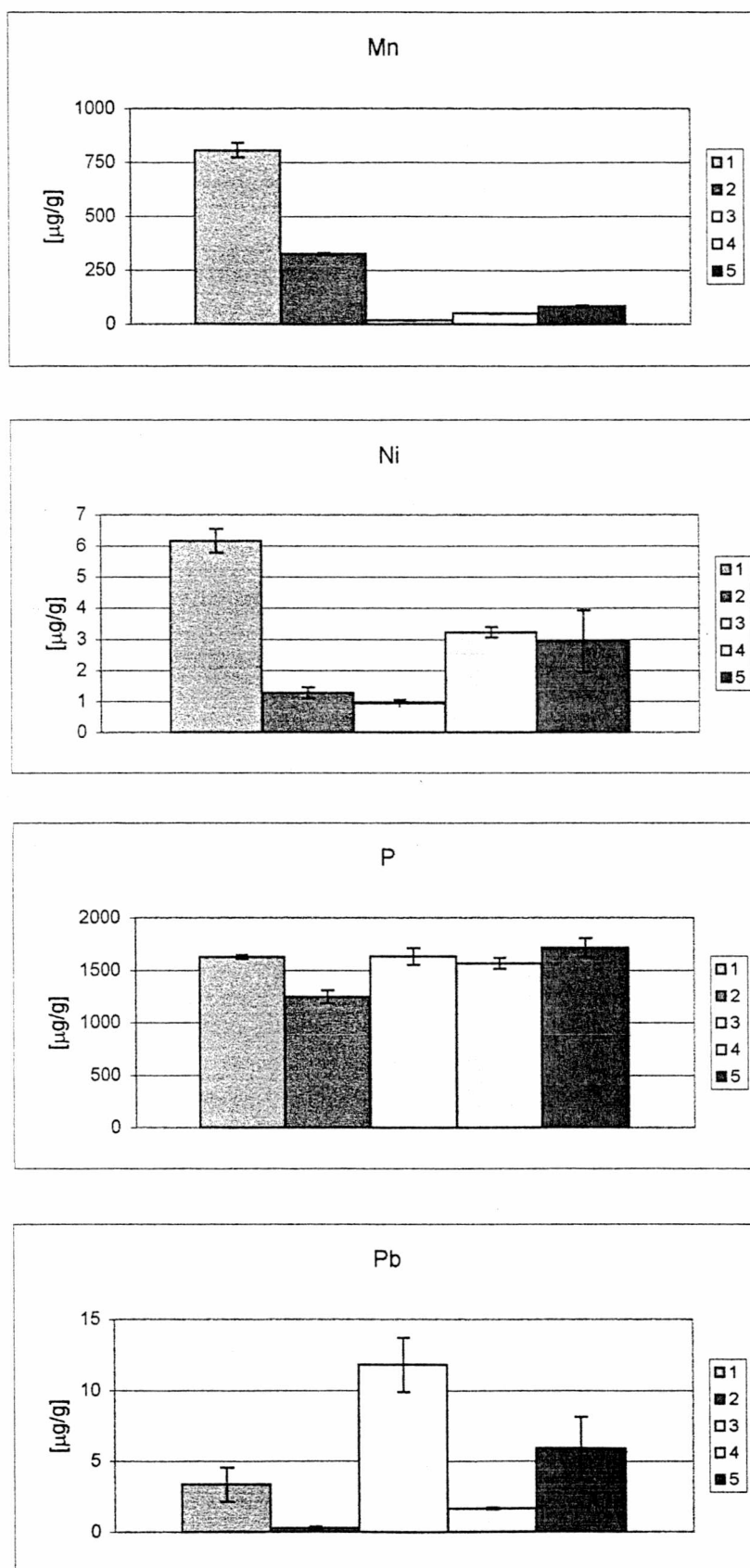
Rysunek 9. Zawartość glinu i boru w igliwiu świerka: 1 - materiał referencyjny, 2 - świerk z Trondheim, 3-5 – igliwie próbkowane na Dolnym Śląsku



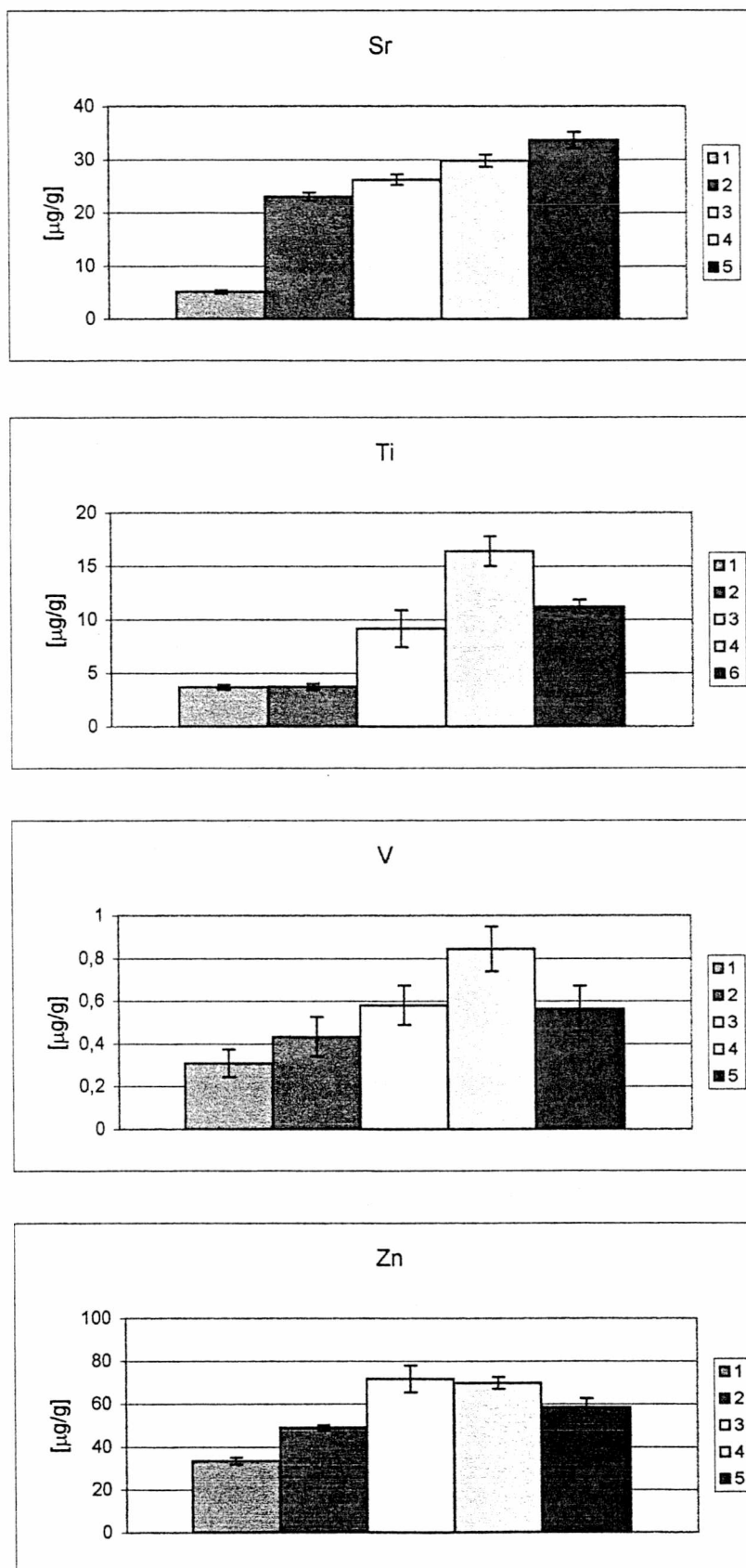
Rysunek 10. Zawartość baru, wapnia, kadmu i kobaltu w igliwiu świerka: 1 - materiał referencyjny, 2 - świerk z Trondheim, 3-5 – igliwie próbkowane na Dolnym Śląsku



Rysunek 11. Zawartość chromu, miedzi, żelaza i magnezu w igliwiu świerka: 1 - materiał referencyjny, 2 - świerk z Trondheim, 3-5 – igliwie próbkowane na Dolnym Śląsku



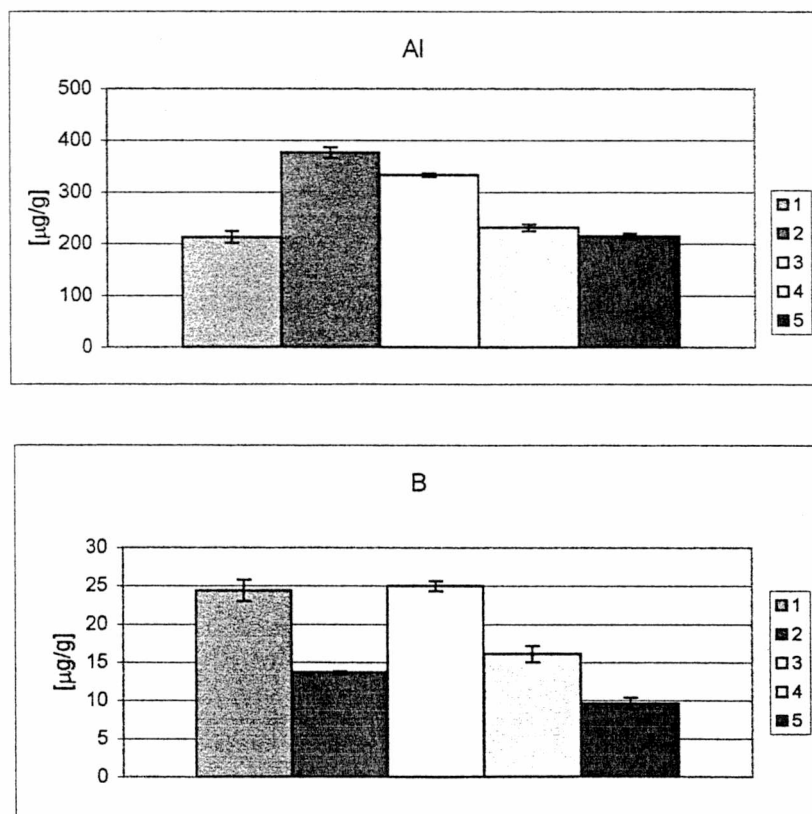
Rysunek 12. Zawartość manganu, niklu, fosforu i ołowiu w igliwiu świerka: 1 - materiał referencyjny, 2 - świerk z Trondheim, 3-5 – igliwie próbkowane na Dolnym Śląsku



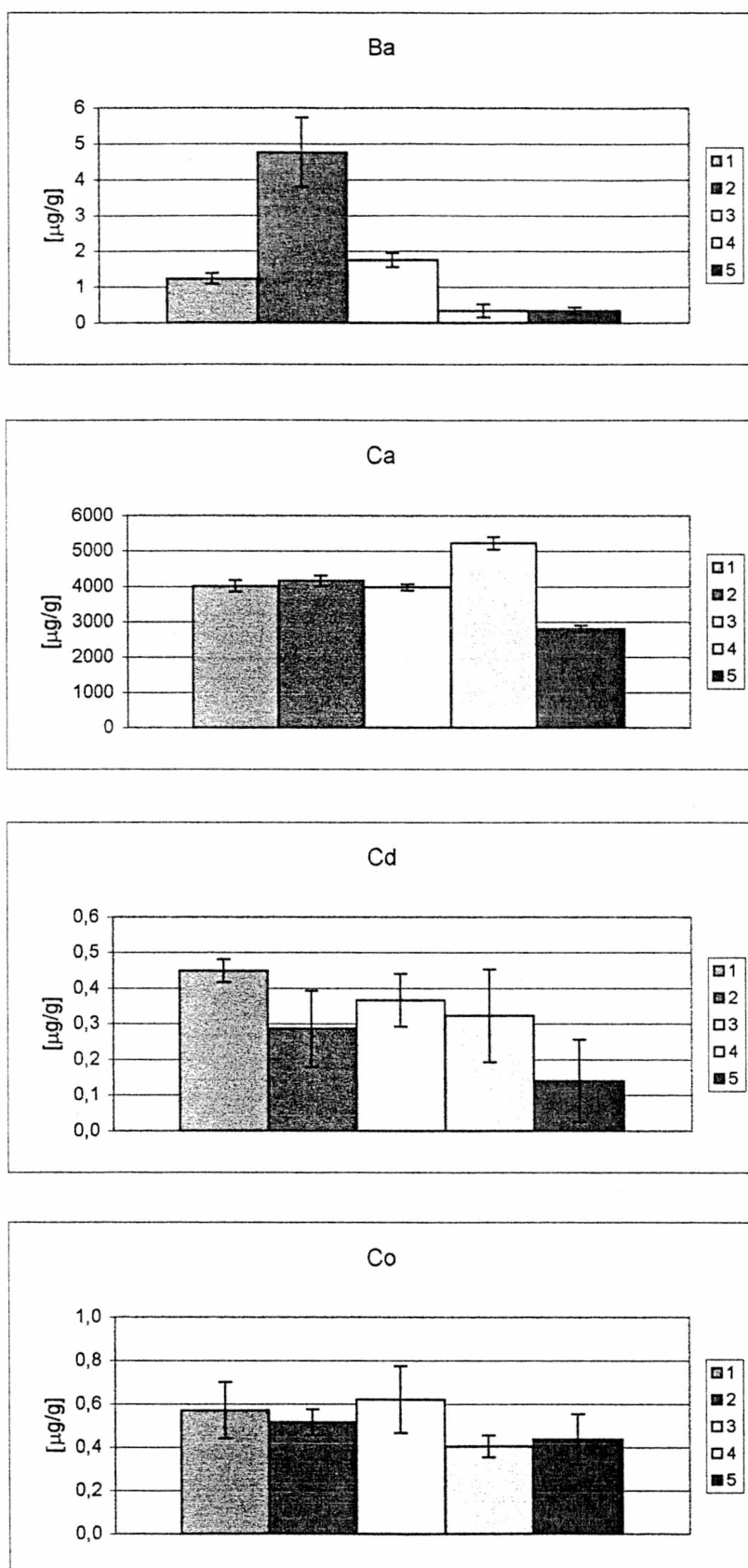
Rysunek 13. Zawartość strontu, tytanu, wanadu i cynku w igliwiu świerka: 1 - materiał referencyjny, 2 - świerk z Trondheim, 3-5 - igliwie próbkowane na Dolnym Śląsku

4.1.7.2. Analiza igliwia sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*)

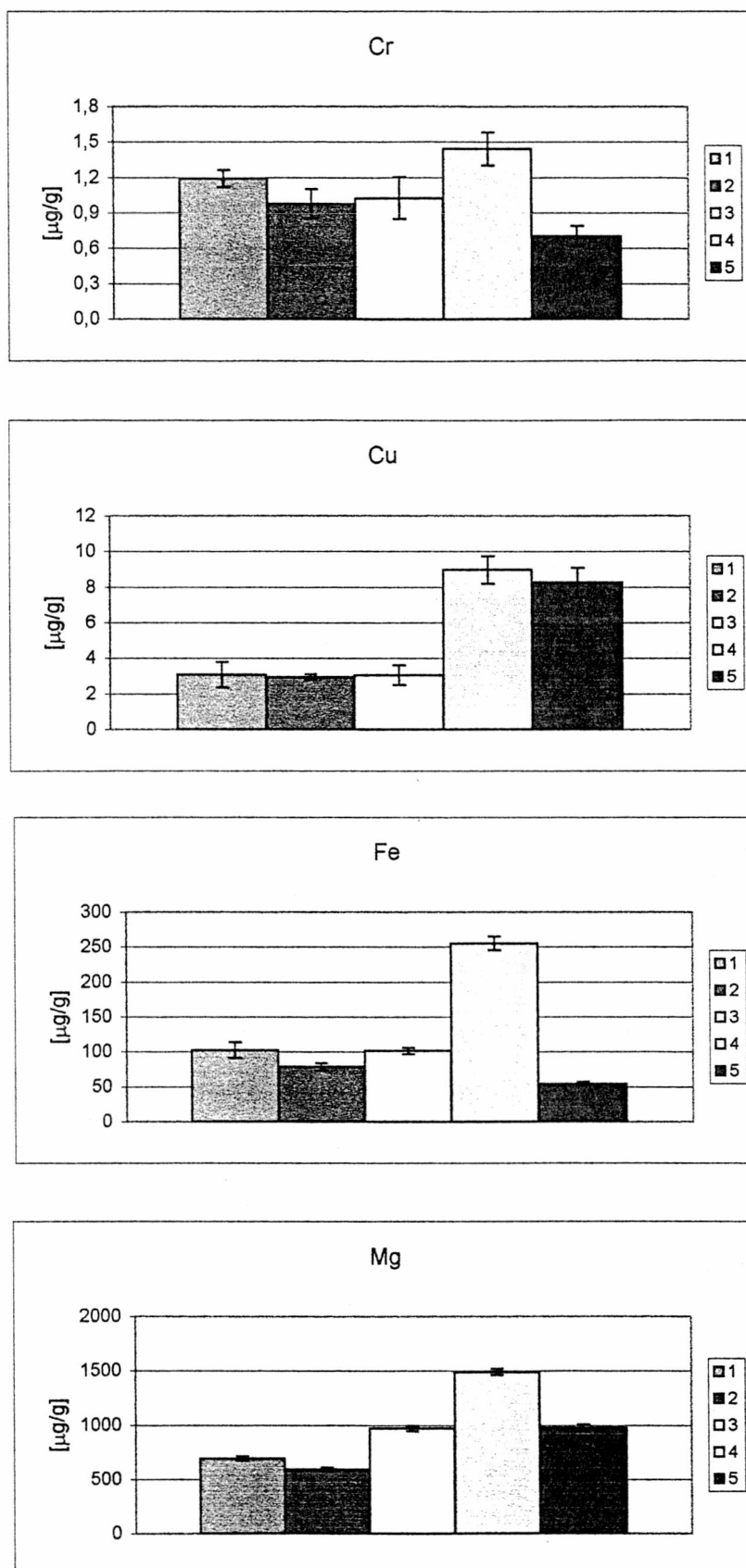
Analizowano igliwie sosny pospolitej. Próbkę pobrano w okolicach Oławy (miejsca oznaczone na wykresach jako 2 i 3) - miasta, w którym od lat działa huta cynku i ołowiu - Huta Oława oraz Siechnicach - gdzie do niedawna funkcjonowała huta takim samym profilem produkcji (1). Natomiast w Norwegii próbkowanie przeprowadzono w centrum miasta Trondheim (4) i w lesie poza miastem (5). Koncentracje analizowanych pierwiastków pokazano na rysunkach 14-18.



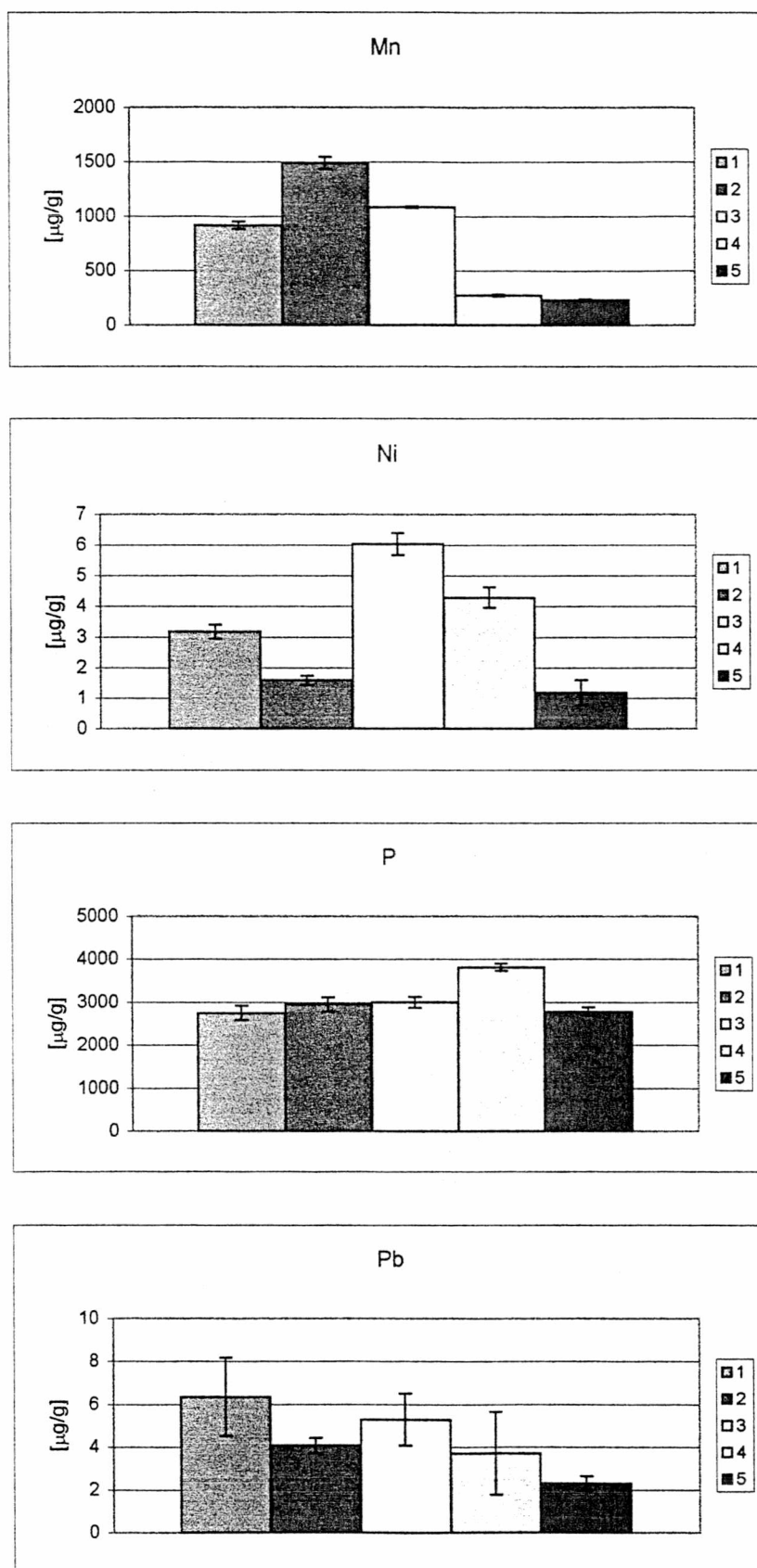
Rysunek 14. Zawartość glinu i boru w igliwiu sosny pospolitej: 1-3 – igliwie z okolic Wrocławia , 4-5 - sosna próbkowana w Trondheim i okolicach



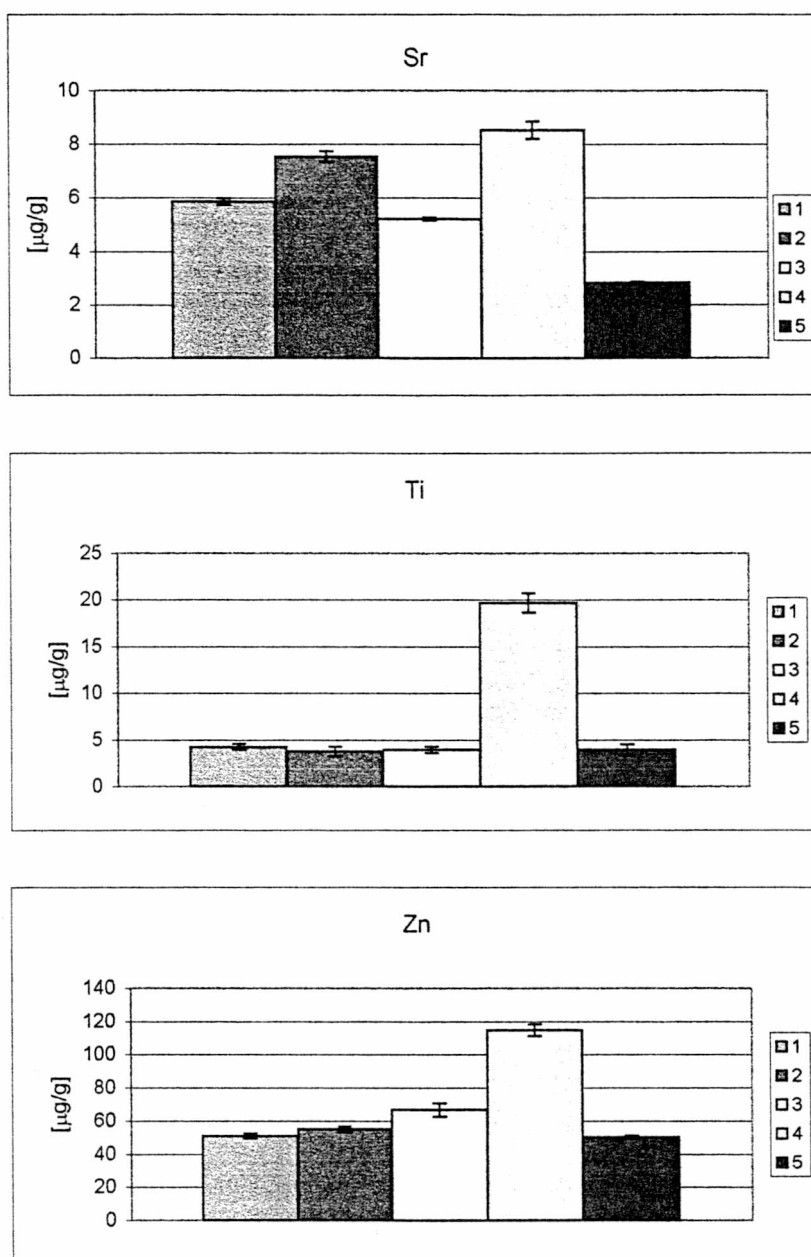
Rysunek 15. Zawartość baru, wapnia, kadmu i kobaltu w igliwiu sosny pospolitej:
1-3 – igliwie z okolic Wrocławia , 4-5 – sosna próbkowana w Trondheim i okolicach



Rysunek 16. Zawartość chromu, miedzi, żelaza i magnezu w igliwiu sosny pospolitej:
1-3 - igliwie z okolic Wrocławia , 4-5 - sosna próbkowana w Trondheim i okolicach



Rysunek 17. Zawartość manganu, niklu, fosforu i ołowiu w igliwiu sosny pospolitej:
1-3 - igliwie z okolic Wrocławia , 4-5 - sosna próbkowana w Trondheim i okolicach



Rysunek 18. Zawartość strontu, tytanu i cynku w igliwiu sosny pospolitej: 1-3 - igliwie z okolic Wrocławia, 4-5 - sosna próbkowana w Trondheim i okolicach

Oceniając zależność koncentracji pierwiastków w igliwiu świerka pospolitego i sosny zwyczajnej od miejsca pobrania próbek można stwierdzić, że istnieje wyraźny związek pomiędzy zawartością pierwiastków śladowych i głównych w próbkach listowia świerka i sosny a miejscem próbkowania. W przypadku świerka największe różnice w stężeniu badanych pierwiastków zaobserwowano dla kadmu, kobaltu, miedzi, żelaza, manganu, niklu, ołowiu, strontu, tytanu, wanadu i cynku. W próbkach z Oławy zauważono wyraźnie wyższe zawartości Co, Cr, Fe, Ni, Pb, Ti, V i Zn. Natomiast w igliwiu z Trondheim zarejestrowano najwyższe koncentracje kadmu i miedzi. Porównanie rezultatów uzyskanych dla próbek igliwia świerka z Oławy i Trondheim z wynikami oznaczeń pierwiastków w certyfikowanym materiale odniesienia wskazuje na znaczną rozbieżność składów tych materiałów.

W igliwiu sosny największe rozrzuty stężeń odnotowano dla: glinu, boru, baru, miedzi, żelaza, magnezu, manganu, niklu, strontu i tytanu. Zaobserwowano najwyższe zawartości wapnia, chromu, miedzi, żelaza, magnezu, fosforu, strontu, tytanu i cynku w igliwiu z centrum Trondheim. Natomiast w przypadku glinu, boru, baru, manganu, niklu i ołowiu najwyższe koncentracje zmierzono w próbkach igliwia z okolic Oławy. Tylko kadmu i ołowiu było najwięcej w igliwiu próbkowanym w Siechnicach.

Próbki igliwia wszystkich gatunków drzew (także cisu i świerka białego omawianych w następnych rozdziałach) przygotowano do pomiaru zawartości pierwiastków rozpuszczając je bez użycia kwasu fluorowodorowego (w kwasie azotowym z dodatkiem wody utlenionej), tak jak w prawie wszystkich pracach poświęconych analizom igliwia, po to by wyniki przedstawione w tej pracy można było porównać z danymi literaturowymi.

4.1.8. Analiza próbek świerka pospolitego, świerka białego i cisu pospolitego rosnących na tym samym stanowisku

Porównano koncentracje pierwiastków w igliwiu świerka pospolitego (*Picea abies*), świerka białego (*Picea glauca*) i cisu pospolitego (*Taxus baccata*). Wyniki analiz próbek trzech gatunków drzew zimozielonych zebranych z jednego stanowiska w Oławie są przedstawione w tabeli 7.

Tabela 7. Zawartość pierwiastków igliwiu drzew szpilkowych z jednego siedliska [$\mu\text{g/g}$]

	Świerk pospolity	Świerk biały	Cis pospolity
Al	137 ± 28	222 ± 3	$63,7 \pm 0,3$
B	$23,8 \pm 1,2$	$18,8 \pm 0,4$	$14,3 \pm 0,2$
Ba	$42,5 \pm 3,1$	$47,8 \pm 3,6$	$12,0 \pm 0,4$
Ca	3700 ± 90	3200 ± 70	5520 ± 100
Cd	$0,51 \pm 0,02$	$0,53 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,01$
Co	$0,33 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,01$
Cr	$1,22 \pm 0,20$	$1,41 \pm 0,76$	$0,84 \pm 0,04$
Cu	$3,52 \pm 0,30$	$4,60 \pm 0,39$	$3,68 \pm 0,05$
Fe	235 ± 38	387 ± 4	135 ± 2
K	7560 ± 320	7610 ± 300	6970 ± 250
Mg	451 ± 18	533 ± 15	550 ± 21
Mn	$17,7 \pm 2,1$	$48,5 \pm 4,4$	376 ± 9
Na	494 ± 94	521 ± 18	190 ± 3
Ni	$0,94 \pm 0,11$	$3,38 \pm 3,22$	$1,51 \pm 0,08$
P	1630 ± 80	1720 ± 50	1320 ± 60
Pb	$11,8 \pm 1,9$	$17,6 \pm 0,6$	$6,92 \pm 0,18$
Sr	$26,2 \pm 1,0$	$21,5 \pm 1,1$	$18,8 \pm 0,9$
Ti	$9,16 \pm 1,75$	$15,2 \pm 0,13$	$4,75 \pm 0,04$
V	$0,58 \pm 0,09$	$0,88 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,01$
Zn	$71,7 \pm 6,2$	$63,3 \pm 1,3$	$93,0 \pm 2,1$

Porównanie stężeń pierwiastków w badanych liściach wskazuje jednoznacznie na różnice w pobieraniu tych metali przez rozpatrywane gatunki. Najmniejsze różnice zaobserwowano w stężeniach boru, kadmu, kobaltu, miedzi, potasu, magnezu i fosforu. Znaczące różnice zaobserwowano dla Mn, Fe, Al, Ba, Ca. W świetle badań materiału referencyjnego (rozdział 4.1.6) wyniki dla Al oraz Ti prezentowane w tutaj są zaniżone.

4.1.9. Zawartość wybranych pierwiastków w igliwiu cisu z różnych stanowisk

Przeprowadzono wielopierwiastkową analizę igliwia cisu pospolitego (*Taxus baccata*) zebranego w trzech miejscach. Uzyskane wyniki, zaprezentowane w tabeli 8 wskazują na zależność składu pierwiastkowego liści od siedliska drzew.

Tabela 8. Zawartość pierwiastków w igliwiu cisu pospolitego [$\mu\text{g/g}$]

	Miejsce próbkowania		
	Oława (1)	Oława (2)	Wrocław (3)
Al	$63,7 \pm 0,3$	219 ± 8	207 ± 8
B	$14,3 \pm 0,2$	$25,4 \pm 2,2$	$37,6 \pm 1,3$
Ba	$12,0 \pm 0,4$	$19,9 \pm 5,1$	$23,9 \pm 0,4$
Ca	5520 ± 100	5980 ± 240	7250 ± 140
Cd	$0,47 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,01$
Co	$0,33 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,01$
Cr	$0,84 \pm 0,04$	$1,42 \pm 0,09$	$1,74 \pm 0,12$
Cu	$3,68 \pm 0,05$	$5,53 \pm 0,94$	$9,40 \pm 0,01$
Fe	135 ± 2	461 ± 20	432 ± 14
K	6970 ± 250	7200 ± 630	11800 ± 170
Mg	550 ± 21	869 ± 38	810 ± 7
Mn	376 ± 9	$65,3 \pm 2,3$	$59,5 \pm 0,7$
Na	190 ± 3	288 ± 31	612 ± 25
Ni	$1,37 \pm 0,09$	$1,38 \pm 0,07$	$1,29 \pm 0,02$
P	1320 ± 60	-	1810 ± 49
Pb	$6,92 \pm 0,18$	$19,6 \pm 2,6$	$15,4 \pm 0,3$
Sr	$18,8 \pm 0,9$	-	$29,2 \pm 0,8$
Ti	$4,75 \pm 0,04$	$13,9 \pm 0,6$	$9,99 \pm 0,4$
V	$0,36 \pm 0,01$	$0,86 \pm 0,04$	$0,98 \pm 0,02$
Zn	$93,0 \pm 2,1$	$77,7 \pm 3,0$	$47,2 \pm 0,3$

Bardzo wysoka zawartość cynku w próbkach pochodzących z Oławy jest związana z obecnością huty cynku w mieście (Huta „Oława”). Zgodnie z przewidywaniami, w próbkach pobranych z terenów miejskich (Wrocław i Oława) zaobserwowano wyższe stężenia Al, B, Ba, Cr, Cu, Fe, Mg, Pb, Ti i V niż w tkankach ze stanowisk zlokalizowanych poza centrum. Jedynie zawartość manganu była mniejsza w próbkach z siedlisk miejskich. W próbkach z centrum Oławy zaobserwowano

najwyższe ilości glinu, żelaza, magnezu, ołowiu i tytanu. Natomiast stężenia pierwiastków śladowych (B, Ba, Cr, Cu, Sr i V) i głównych (Ca, K, Na i P) były najwyższe w igliwiu próbkowanym we Wrocławiu.

4.1.10. Porównanie zawartości wybranych pierwiastków w badanych igliwiu z danymi literaturowymi

Porównując wyniki oznaczeń pierwiastków w badanym materiale z danymi dostępnymi w literaturze (tabela 9) można stwierdzić, że dla większości analizowanych pierwiastków zmierzone stężenia są zgodne z wynikami uzyskanymi przez autorów innych publikacji. Rozbieżności występują w maksymalnej zawartości kadmu, kobaltu, chromu, miedzi, żelaza, fosforu i ołowiu w przypadku igliwia świerka oraz kobaltu i fosforu w liściach sosny. Jednak na podstawie tych danych trudno jest określić stopień skażenia środowiska naturalnego, bo nie ma dotąd norm określających dopuszczalne, bądź niebezpieczne stężenie pierwiastków w igliwiu (mimo, że igliwie jest uznanym bioindykatorem). Nie ma także danych o naturalnych koncentracjach pierwiastków w listowiu świerka i sosny, czy wartości dotyczących terenów nieskażonych – pozbawionych wpływów działalności człowieka.

Analiza danych zamieszczonych w tabeli 9 pozwala zauważyć, że dla igliwia sosny i świerka, różnice w stężeniach pierwiastków takich jak: bor, wapń, kobalt, żelazo, stront, tytan i wanad są niewielkie, natomiast koncentracje glinu, baru, manganu i ołowiu mogą różnić się znacznie.

Tabela 9. Zakresy stężeń pierwiastków [$\mu\text{g/g}$] w igliwiu świerka i sosny – wyniki oznaczeń i dane literaturowe

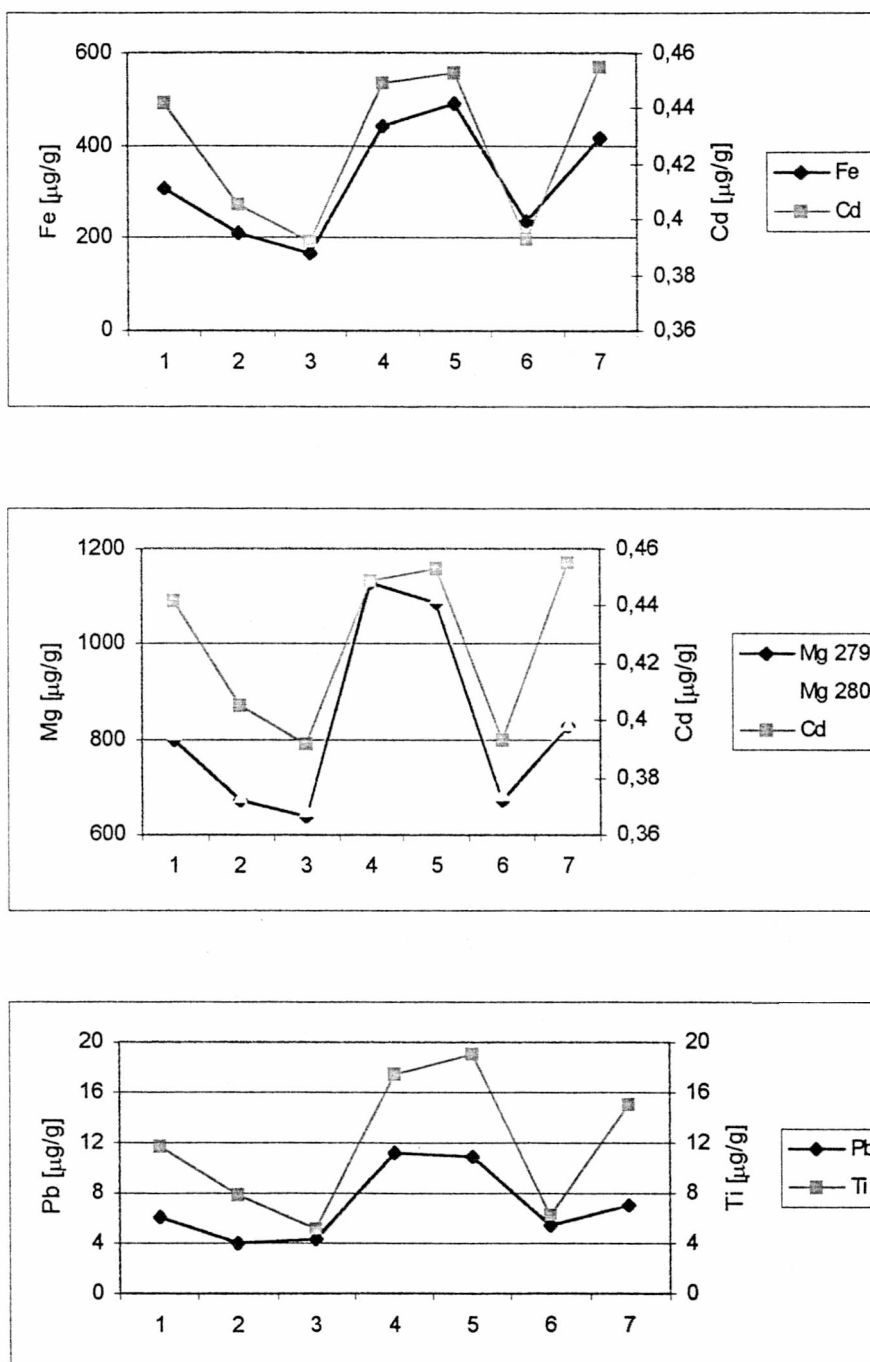
	Świerk pospolity		Sosna zwyczajna	
	Dane eksperymentalne	Dane literaturowe	Dane eksperymentalne	Dane literaturowe
Al	62,0 - 251	6,8 - 319	176 - 377	194 - 1001
B	9,2 - 23,8	17 - 63	9,61 - 25,0	11,3 - 33,6
Ba	21,6 - 47,8	1,0 - 53,2	0,34 - 4,76	0,13 - 7,2
Ca	3200 - 4390	600-8078	3000 - 5230	1498 - 6400
Cd	0,30 - 4,69	0,064 - 0,19	0,06 - 0,28	0,08 - 0,753
Co	0,33 - 1,51	0,1 - 0,336	0,40 - 0,62	0,074 - 0,36
Cr	1,22 - 4,38	0,312 - <1,0	0,23 - 1,66	0,145 - 6,71
Cu	3,52 - 21,1	1,75 - 5,09	3,07 - 9,92	1,2 - 207,3
Fe	61,3 - 458	16,3 - 150	56,7 - 254	20 - 431
Mg	451 - 767	220 - 1500	465 - 1560	751 - 2000
Mn	17,7 - 327	33 - 3474	230 - 1440	25 - 2555
Ni	0,94 - 3,38	1,2 - 3,5	1,83 - 6,00	0,1 - 395,6
P	1250 - 1720	1500 - 1600	1450 - 3810	530 - 2200
Pb	0,29 - 17,6	0,8 - <10	2,28 - 6,34	0,12 - 10,8
Sr	21,5 - 33,6	<10 - 99	2,83 - 8,52	1,5 - 16
Ti	3,72 - 16,4	-	1,89 - 19,7	2,0 - 5,0
V	0,43 - 0,88	<1	0,12 - 0,60	0,5 - 0,9
Zn	48,9 - 71,7	6,9 - 80	36,9 - 117	13 - 480

4.1.11. Międzypierwiastkowe korelacje w igliwiu

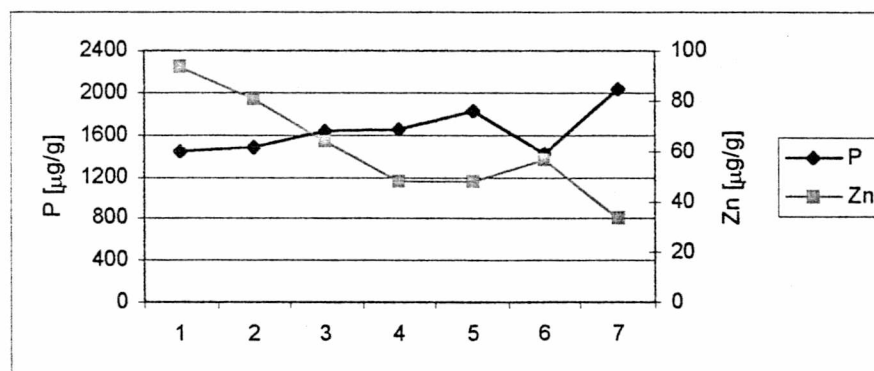
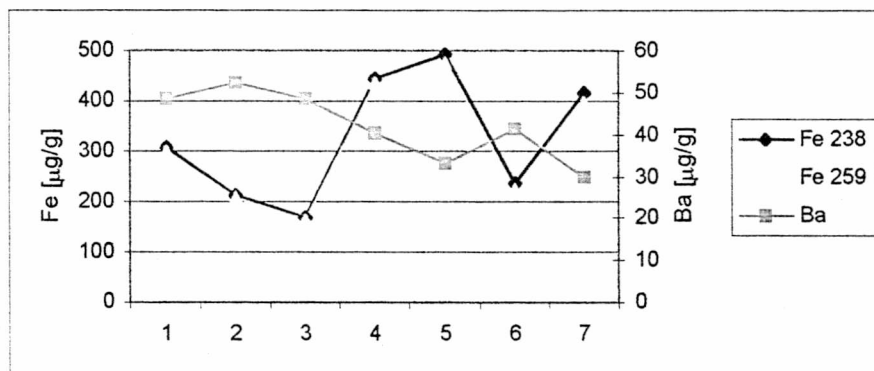
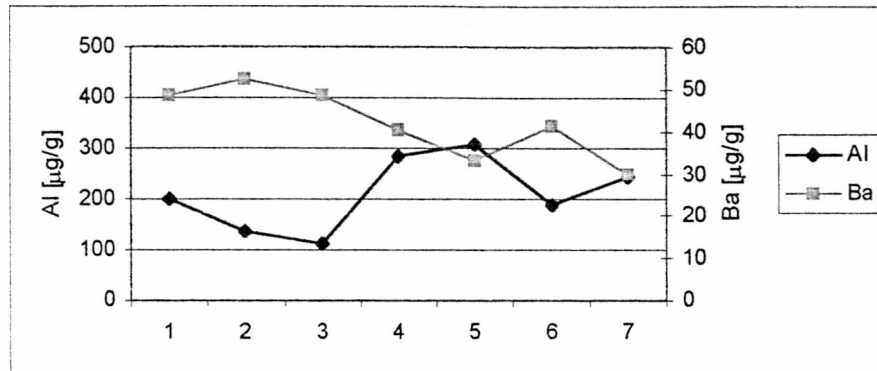
Zbadano zależności między pierwiastkami w igliwiu świerka pospolitego pojedynczych drzew rosnących na tym samym stanowisku. W tym celu obliczono współczynniki korelacji liniowej (korzystając ze wzoru 2.4.7). Współczynniki korelacji międzypierwiastkowych przedstawiono w tabeli 10. Dodatkowo korelacje zaobserwowano dla następujących par pierwiastków: Al-Cd, Al-Fe, Al-Mg, Al-Pb, Al-Ti, Ba-Mn, Ba-Zn, Ca-Sr, Cd-Fe, Cd-Mg, Cd-Ni, Cd-Pb, Cd-Ti, Cu-Sr, Fe-Mg, Fe-Pb, Fe-Ti, Mg-Pb, Mg-Ti, Mn-Zn i Pb-Ti. Występowanie takich zależności wskazuje na synergizm między tymi pierwiastkami. Wysokie (powyżej 0,7), dodatnie współczynniki korelacji sugerują, że te pierwiastki mają to samo pochodzenie. Tylko pomiędzy: Al-Ba, Ba-Fe, Ba-Ti, Ba-P i P-Zn zaobserwowano korelacje ujemne. W odróżnieniu od danych literaturowych opisujących zależności międzypierwiastkowe w igliwiu świerka ze Słowacji [67] nie zaobserwowano korelacji Cr/Fe i Cr/Pb. Nie wykryto również zależności między Ca/Al, Ca/Mg i Ca/Mn odnotowanymi dla igliwia sosny [72]. Potwierdzono zaś obecność zależności między zawartością wapnia i strontu (istniejącą w przypadku igliwia sosny). Niespodziewanie, stwierdzono związek między koncentracjami żelaza i ołowiu - stwierdzonymi do tej pory tylko dla kory sosny zwyczajnej [37].

Tabela 10. Współczynniki korelacji między pierwiastkami w igliwiu świerka pospolitego

	<i>Al</i>	<i>B</i>	<i>Ba</i>	<i>Ca</i>	<i>Cd</i>	<i>Cr</i>	<i>Cu</i>	<i>Fe</i>	<i>Mg</i>	<i>Mn</i>	<i>Ni</i>	<i>P</i>	<i>Pb</i>	<i>Sr</i>	<i>Ti</i>	<i>Zn</i>
<i>Al</i>	1															
<i>B</i>	0,25	1														
<i>Ba</i>	<u>-0,78</u>	0,06	1													
<i>Ca</i>	0,21	0,25	0,34	1												
<i>Cd</i>	<u>0,85</u>	0,67	-0,65	0,11	1											
<i>Cr</i>	0,45	-0,19	-0,43	0,35	0,29	1										
<i>Cu</i>	0,43	-0,12	-0,30	0,42	0,12	0,09	1									
<i>Fe</i>	<u>0,98</u>	0,38	<u>-0,79</u>	0,10	<u>0,92</u>	0,33	0,34	1								
<i>Mg</i>	<u>0,93</u>	0,40	-0,56	0,36	<u>0,81</u>	0,18	0,54	<u>0,92</u>	1							
<i>Mn</i>	-0,57	0,41	<u>0,71</u>	0,35	-0,24	-0,18	-0,39	-0,52	-0,41	1						
<i>Ni</i>	0,59	0,58	-0,38	0,32	<u>0,79</u>	0,38	-0,19	0,63	0,49	0,20	1					
<i>P</i>	0,52	0,21	<u>-0,82</u>	-0,62	0,61	-0,09	0,10	0,63	0,42	-0,47	0,23	1				
<i>Pb</i>	<u>0,95</u>	0,29	-0,64	0,33	<u>0,77</u>	0,25	0,60	<u>0,93</u>	<u>0,99</u>	-0,48	0,46	0,45	1			
<i>Sr</i>	0,13	0,15	0,26	<u>0,79</u>	-0,04	-0,01	<u>0,80</u>	0,03	0,36	0,14	-0,13	-0,39	0,35	1		
<i>Ti</i>	<u>0,95</u>	0,49	<u>-0,69</u>	0,14	0,14	0,23	0,30	<u>0,99</u>	<u>0,94</u>	-0,43	0,64	0,60	<u>0,92</u>	0,07	1	
<i>Zn</i>	-0,57	0,23	<u>0,87</u>	0,45	-0,37	-0,08	-0,53	-0,58	-0,45	<u>0,81</u>	0,03	<u>-0,81</u>	-0,54	0,08	-0,49	1



Rysunek 19. Relacje między stężeniami wybranych par pierwiastków (synergizm)



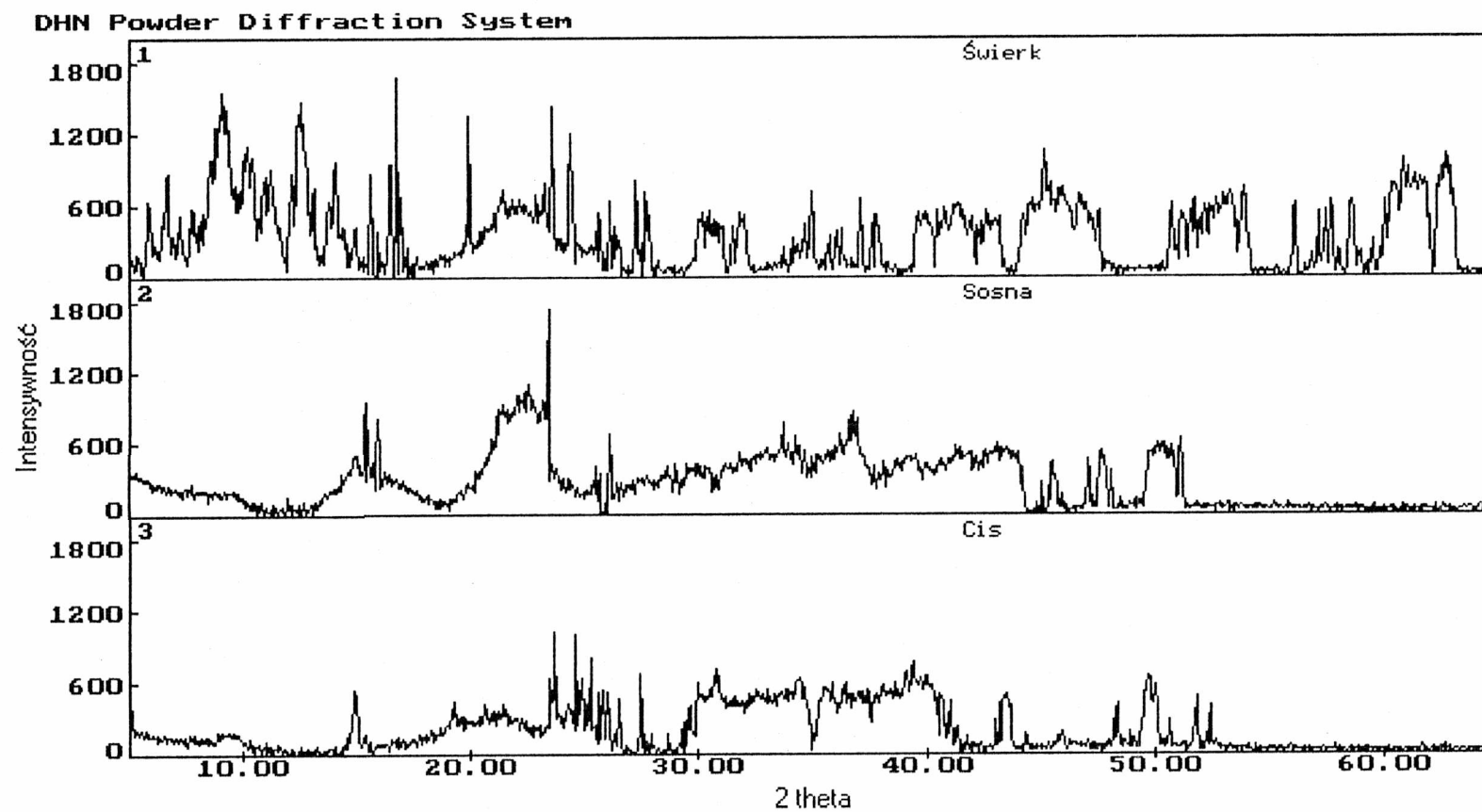
Rysunek 20. Relacje między stężeniami wybranych par pierwiastków (antagonizm)

4.2. Zastosowanie metody proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej w badaniach igliwia

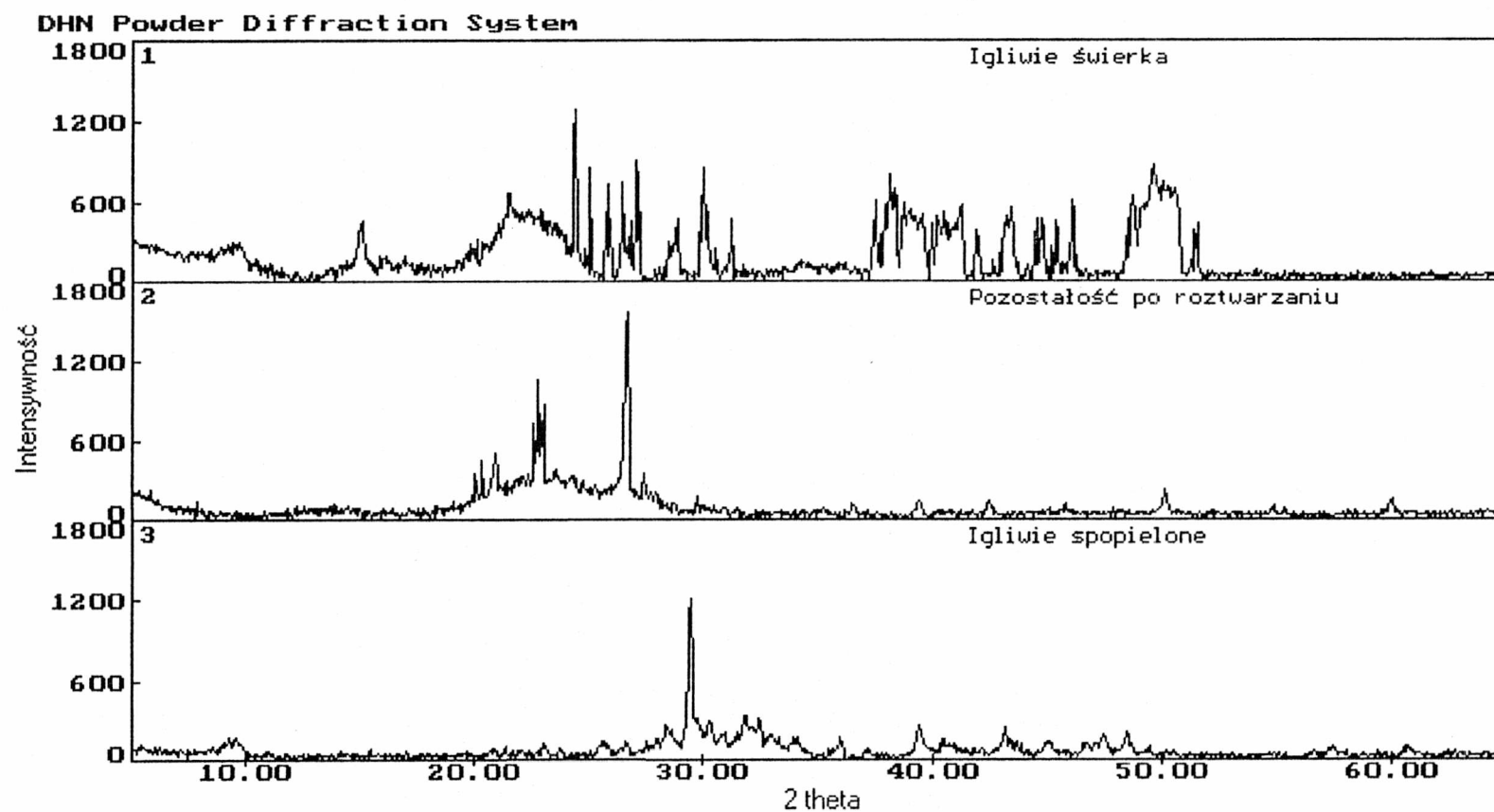
Metoda proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej została tutaj zastosowana do identyfikacji ewentualnych struktur krystalicznych i minerałów występujących w próbkach igliwia świerka, sosny i cisu oraz w osadach po mineralizacji i pozostałości po spopieleniu, a także do sprawdzenia wydajności stosowanych procedur mycia. W literaturze brak jest dotąd artykułów na temat możliwości zastosowania PD XRF do badania materiału roślinnego typu igliwie, jak i prac poświęconych zastosowaniu tej metody do śledzenia przebiegu procesu mineralizacji materiałów roślinnych. Analiza jakościowa przeprowadzona została porównując dyfraktogram badanej substancji z dyfraktogramem wzorcowym wykonanym dla substancji o znanym składzie chemicznym.

Wyniki jednoznacznie wskazują, że igliwiu świerka, sosny i cisu oraz pozostałościach po mineralizacji brak jest struktur krystalicznych na poziomie umożliwiającym wykrycie, czyli powyżej kilku procent. Jednocześnie wyraźnie zaznaczyła się obecność wosków parafinowych w badanych próbkach igliwia - o strukturze zależnej od gatunku drzewa.

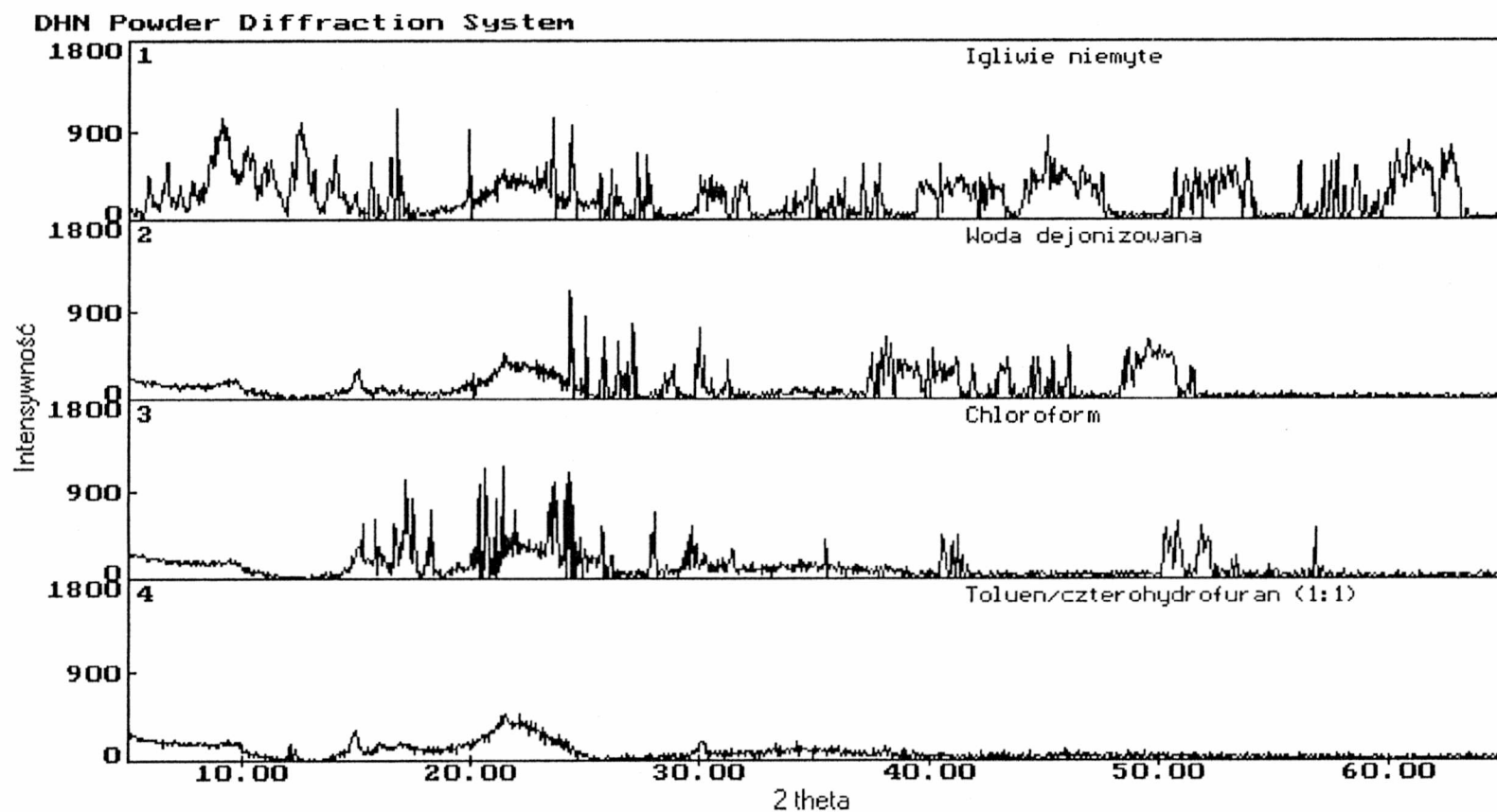
Porównanie dyfraktogramów próbek igliwia poddanym różnym procedurom mycia oraz wyników pomiarów zawartości wybranych pierwiastków w tych próbkach przy użyciu ICP-AES pozwala stwierdzić, że w czasie procesu mycia ługowane są nie tylko woski z powierzchni igieł, ale także związki metaloorganiczne.



Rysunek 21. Dyfraktogramy igliwia różnych gatunków drzew



Rysunek 22. Dyfraktogramy - igliwie różne etapy przygotowania próbek



Rysunek 23. Dyfraktogramy - igliwie przed i po myciu

4.3. Zastosowanie ekstrakcji w układzie ciało stałe – ciecz w procesie przygotowania próbek igliwia do analizy i w analizie specjacyjnej

4.3.1. Ekstrakcja konwencjonalna

Badano możliwość zastosowania procesu ługowania w układzie ciecz - ciało stałe do przygotowania próbek materiału roślinnego do oznaczania pierwiastków śladowych i głównych metodą ICP-AES. Analizie poddano igliwie świerka (*Picea*). W celu zoptymalizowania warunków procesu przeprowadzono i porównano ekstrakcję wybranych pierwiastków z igliwia w zależności od: rodzaju ekstrahenta, jego stężenia, temperatury ekstrakcji oraz czasu wytrząsania. Wyznaczono wydajność ekstrakcji w porównaniu z mineralizacją mikrofalową przeprowadzoną w układzie zamkniętym pod wysokim ciśnieniem - z zastosowaniem stężonego kwasu azotowego i wody utlenionej. Metodą emisyjnej spektrometrii atomowej z argonową plazmą sprzężoną indukcyjnie oznaczono w ekstraktach i próbkach zmineralizowanych całkowite koncentracje Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Pb, Sr, Ti, Vi Zn.

4.3.1.1. Porównanie efektywności ekstrakcji przy użyciu różnych ekstrahentów

W dotychczas opublikowanych pracach relacjonujących badania nad zastosowaniem ekstrakcji jako metody przygotowania w analizie pierwiastkowej próbek roślinnych stosowano zazwyczaj: rozcieńczony kwas azotowy, kwas solny, kwas octowy, kwas cytrynowy, wodę dejonizowaną, wodorotlenek sodu. Nie badano dotąd takich ekstrahentów jak: chlorek magnezu, octan amonu, chlorek amonu, azotan amonu, kwas szczawiowy i chlorowodorek hydroksyaminy, często stosowanych do frakcjonowania składników próbek środowiskowych (np. gleby).

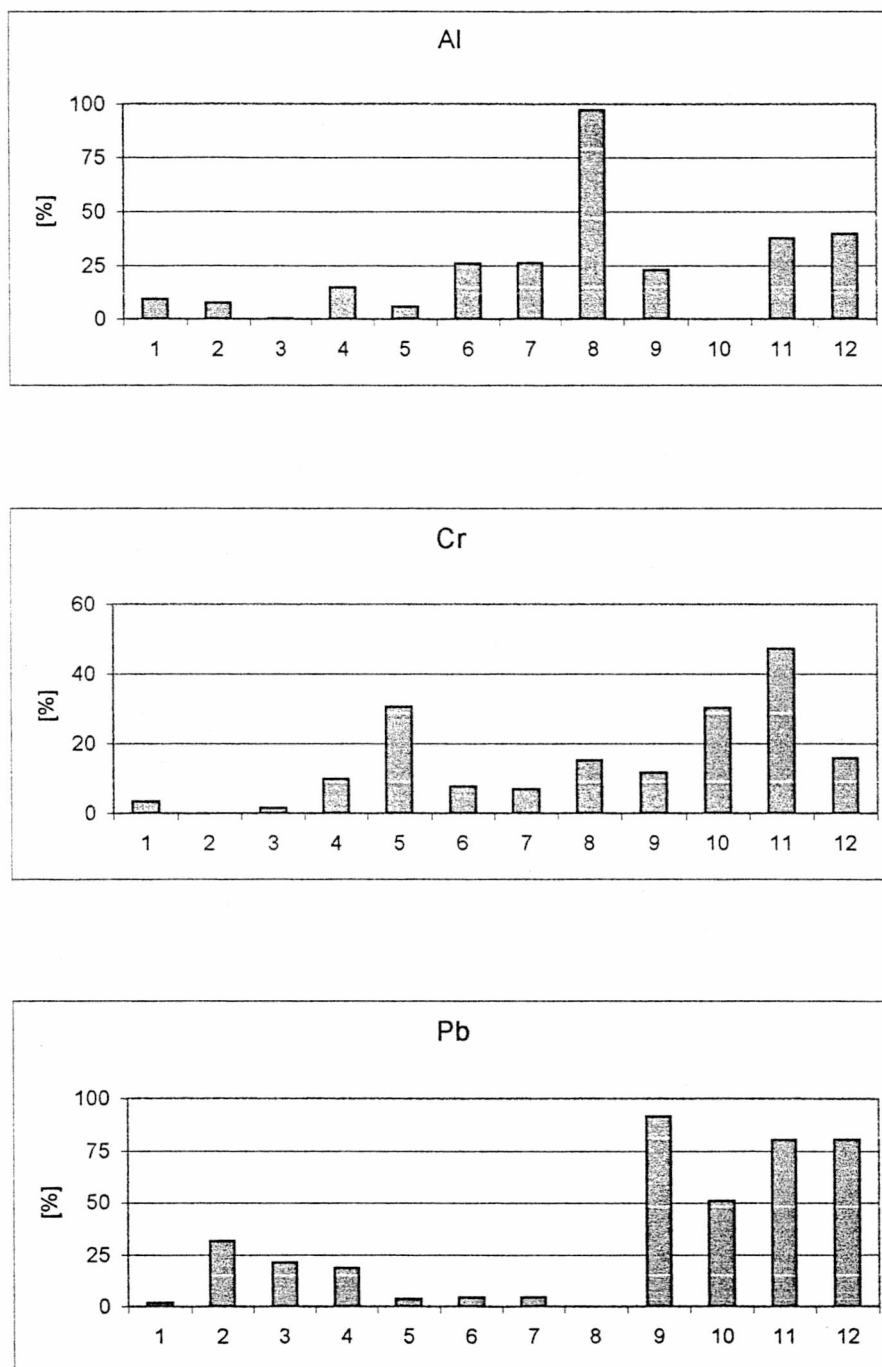
W tej pracy przeprowadzono ekstrakcję pierwiastków z próbek igliwia stosując następujące ekstrahenty:

1. woda dejonizowana,
2. chlorek magnezu (1 M),
3. octan amonu (1 M),
4. chlorek amonu (1 M),

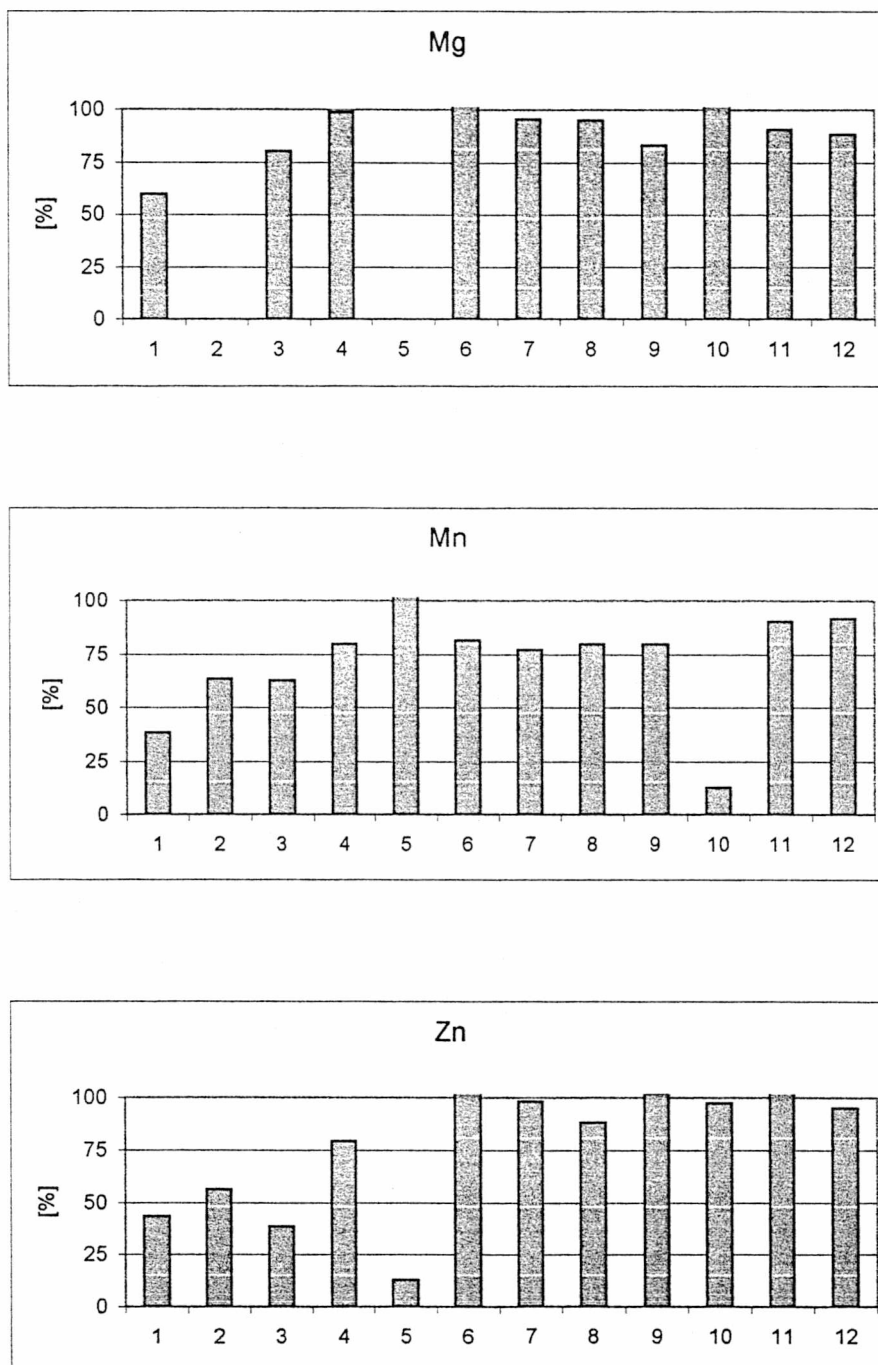
5. azotan amonu (1 M),
6. kwas octowy (1 M),
7. kwas cytrynowy (1 M),
8. kwas szczawiowy (1 M),
9. wersenian sodu (0,1 M),
10. chlorowodorek hydroksyaminy (0,1 M),
11. kwas solny (1 M),
12. kwas azotowy (1 M).

Wyniki badań procesu ekstrakcji przedstawiono dla wybranych pierwiastków na rysunkach 24 i 25. Jak widać z analizy danych efektywność procesu ekstrakcji zależy zarówno od typu ekstrahenta jak i pierwiastka. Zaobserwowano znaczne różnice wydajności ługowania dla różnych pierwiastków. Najmniejsze różnice w wydajności badanych ekstrahentów i efektywność procesu powyżej 50 % uzyskano dla magnezu, manganu i cynku. Najniższe wydajności procesu ługowania zaobserwowano w przypadku glinu i chromu.

Dla niektórych pierwiastków np.: Ba, Mg, Mn, Pb i Zn ekstrakcja z roztworami kwasów może zastąpić procedurę mineralizacji dla materiału roślinnego, którym jest igliwie. Porównanie wyników uzyskanych dla różnych ekstrahentów potwierdza możliwość zaadoptowania procedur ekstrakcji sekwencyjnej, stosowanej dotychczas wyłącznie do próbek gleby, różnych osadów i popiołów, w analizie próbek roślinnych. Duże różnice w efektywności zastosowanych ekstrahentów wskazują na możliwość zastosowania ekstrakcji w analizie specjacyjnej materiału roślinnego. Prawdopodobnie, będzie można wyodrębnić różne frakcje pierwiastków z igliwia z zastosowaniem prostych ekstrahentów. Na tym etapie badań trudno jest ocenić możliwość bardziej zaawansowanego rozdziału form specjacyjnych pierwiastków przy użyciu stosowanych w tej pracy odczynników.



Rysunek 24. Porównanie wydajności ekstrahentów dla glinu, chromu i ołowiu



Rysunek 25. Porównanie wydajności ekstrahentów dla magnezu, manganu i cynku

4.3.1.2. Wpływ stężenia ekstrahenta na efektywność ekstrakcji

Dla wybranych roztworów, tj.: wersenianu sodu, chlorowodoru hydroksyaminy, kwasu solnego i kwasu azotowego badano zależność pomiędzy wydajnością procesu ekstrakcji a stężeniem ekstrahenta. Postępując zgodnie z procedurą zaprezentowaną wcześniej w części eksperymentalnej (procedury przygotowania materiału badawczego do analizy) przeprowadzono eksperymenty z zastosowaniem roztworów o następujących stężeniach:

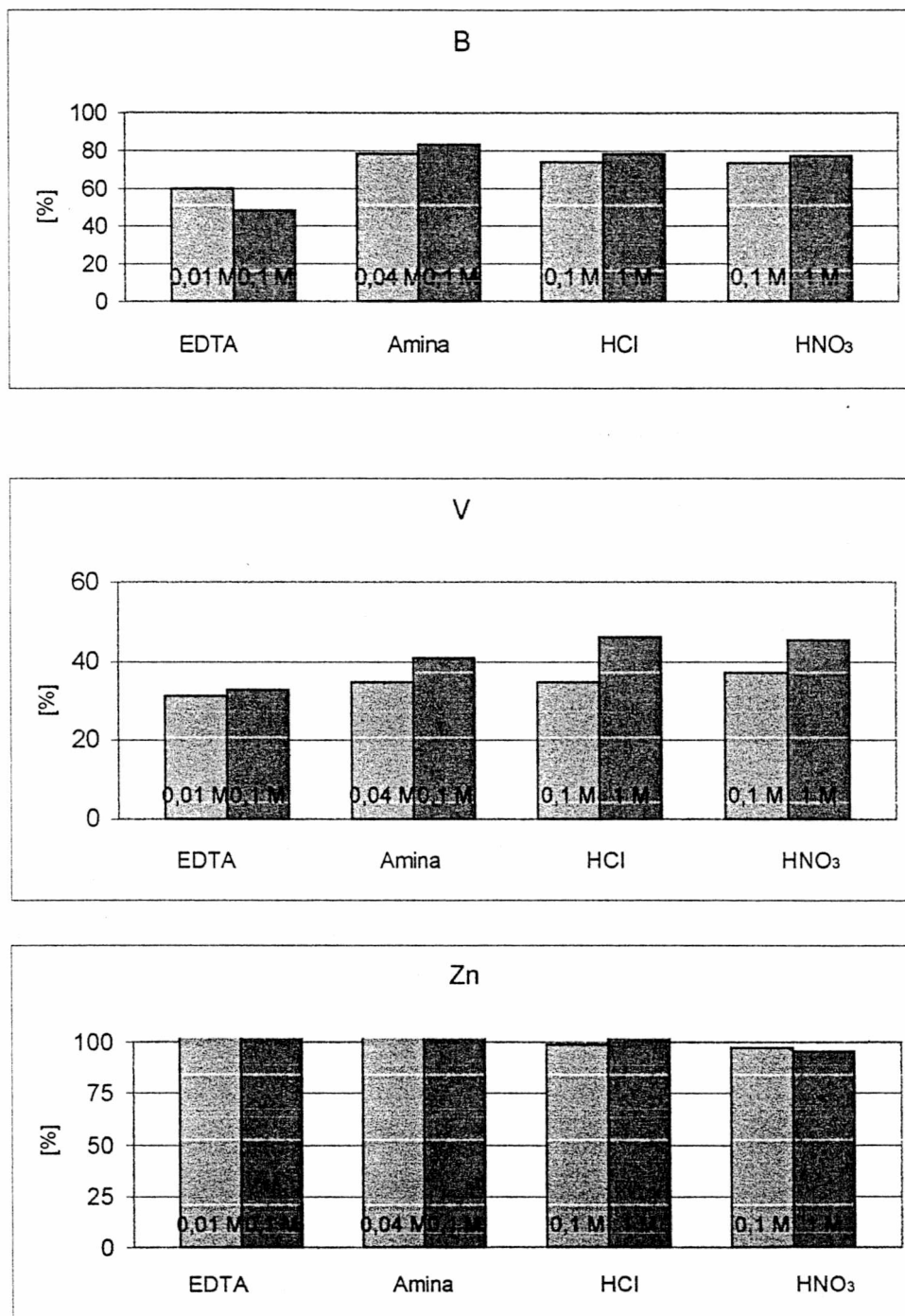
EDTA - 0,01 i 0,1 M

$\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ – 0,04 i 0,1 M

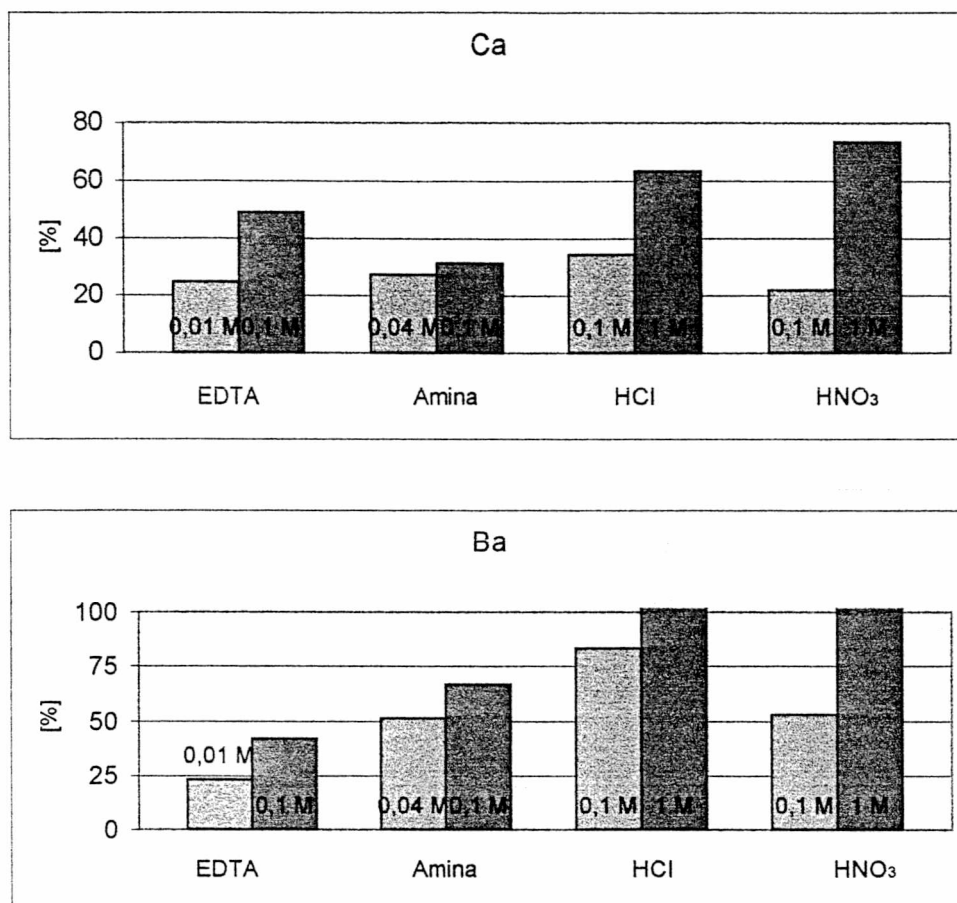
HCl – 0,1 i 1 M

HNO_3 – 0,1 i 1 M.

Na podstawie uzyskanych wyników (rysunki 26 i 27) można stwierdzić, że wzrost stężenia roztworów ekstrahentów prowadzi do wzrostu efektywności procesu ługowania. Taką zależność zaobserwowano m.in. dla Ba, Ca, Mn, P, Pb i V. Tylko w przypadku boru i cynku różnice w wydajnościach ekstrahentów o różnych stężeniach są nieznaczne. Najwyższe wzrosty efektywności i to dla wszystkich roztworów uzyskano dla Ba i Ca. W przypadku roztworów EDTA dla B, Mn, P i Pb intensywności sygnałów zmierzonych w ekstraktach 0,1 M są niższe od tych w roztworach 0,01 M, ale w granicach błędów. Jest to prawdopodobnie spowodowane pojawieniem się efektów matrycowych związanych ze wzrostem stężenia sodu.



Rysunek 26. Porównanie wydajności ekstrahentów w zależności od jego stężenia dla boru, wanadu i cynku

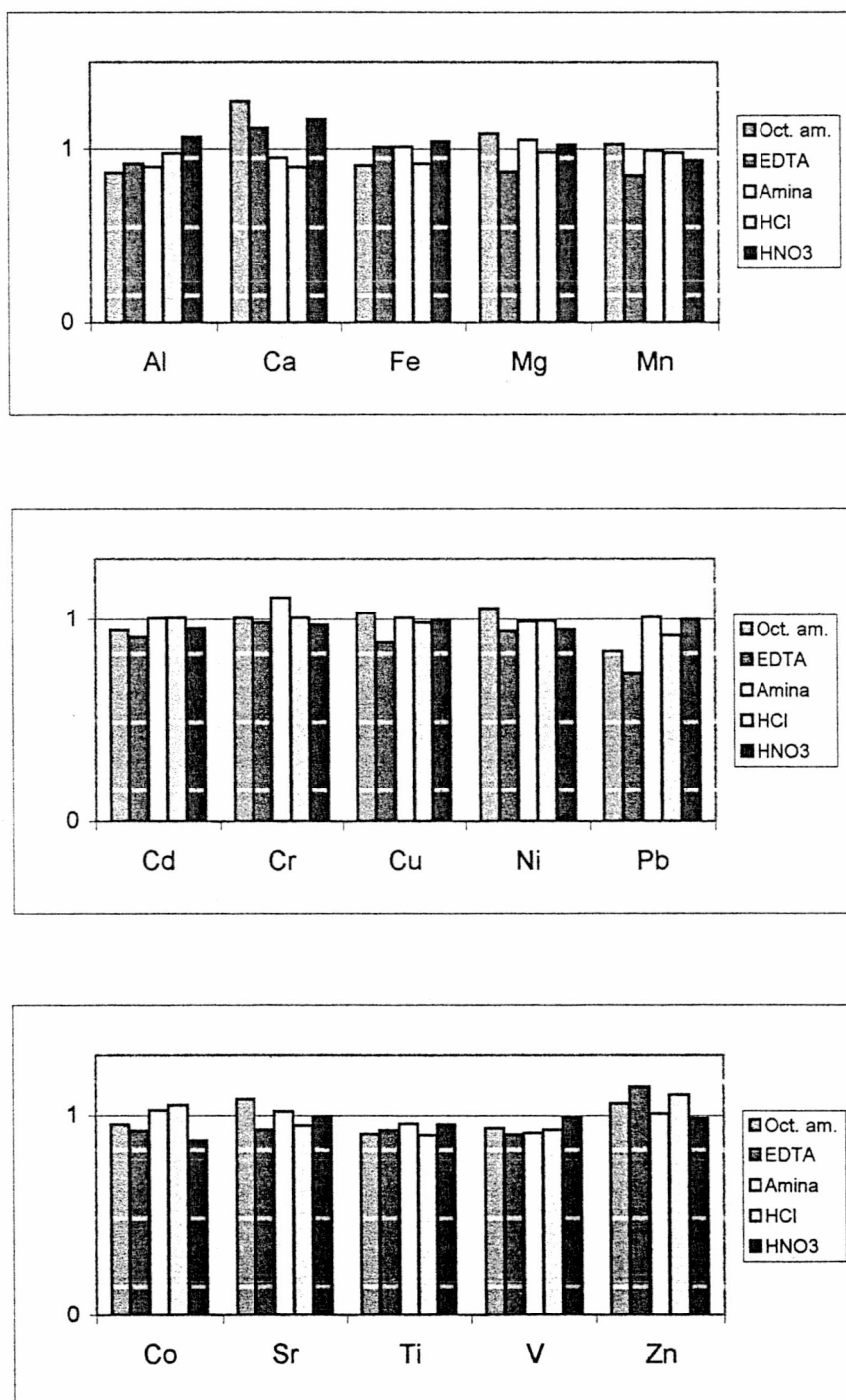


Rysunek 27. Porównanie wydajności ekstrahentów w zależności od jego stężenia dla baru i wapnia

4.3.1.3. Wpływ matrycy ekstrahenta na sygnał pomiarowy

Zbadano wpływ matrycy ekstrahenta na intensywność sygnałów pomiarowych analizowanych pierwiastków. W tym celu przygotowano roztwory wielopierwiastkowego wzorca w badanych ekstrahentach. Wyniki pomiarów stężenia pierwiastków w obecności matryc różnych ekstrahentów względem intensywności sygnałów 1ppm w roztworze wodnym przedstawiono na rysunku 28. Dla roztworów octanu amonu, wersenianu sodu, chlorowodoru hydroksyaminy oraz kwasów solnego i azotowego stwierdzono stosunkowo niewielkie (z reguły kilka procent, sporadycznie do 10 %) zmiany sygnałów pomiarowych wszystkich badanych pierwiastków. Tylko w przypadku jednomolowych roztworów soli: chlorku magnezu czy octanu sodu obniżenie sygnału 1 ppm pierwiastków

w porównaniu z roztworem wodnym o tym samym stężeniu analitu wynosiło od 20 do 40 %.



Rysunek 28. Wpływ matrycy ekstrahenta na sygnał pomiarowy - zmierzone stężenie pierwiastków w obecności matrycy różnych ekstrahentów ($C_0 = 1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$)

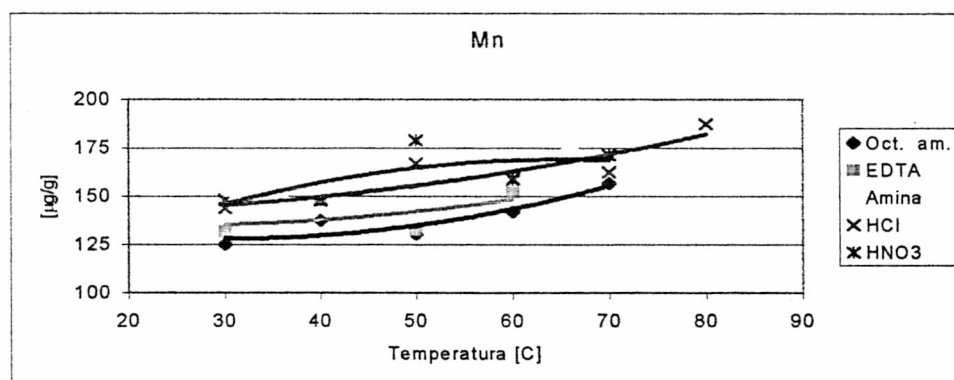
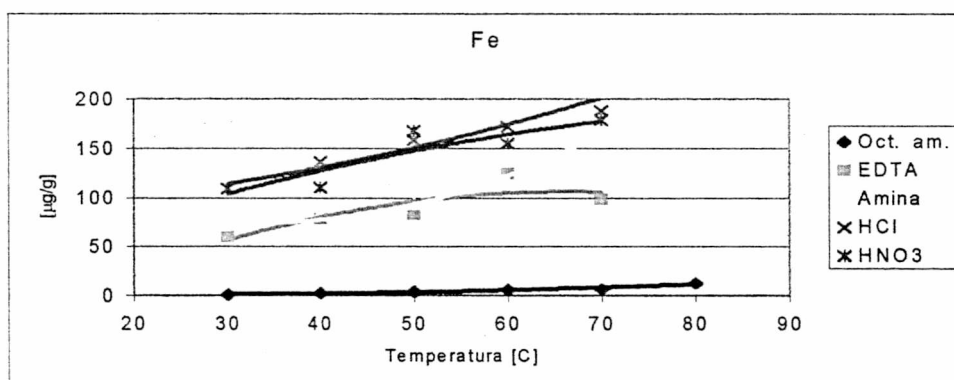
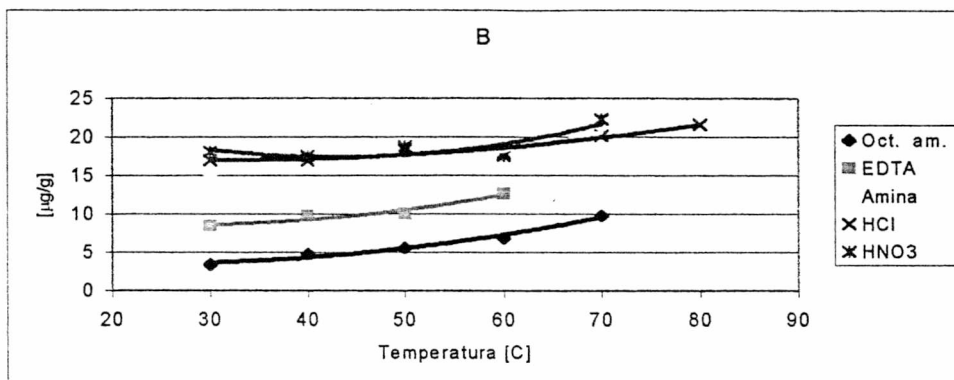
4.3.1.4. Badanie wpływu stosunku faz na proces ekstrakcji

Przeprowadzono ekstrakcję pierwiastków z igliwia świerka (24 h) z zastosowaniem wody dejonizowanej i kwasu azotowego o stosunkach fazy ciekłej do stałej 10:1, 20:1 i 30:1. Stwierdzono, że zwiększenie stosunku fazy ciekłej do stałej (z 10:1 na 20:1) dla wody dejonizowanej stosunkowo w niewielkim stopniu powiększa wydajność ługowania. W przypadku kwasu azotowego wpływ ten jest bardziej istotny. Największy wzrost efektywności ekstrahowania obserwuje się przy zmianie proporcji z 10:1 na 20:1. Dalsze zwiększanie tych proporcji nie powoduje już znaczących zmian.

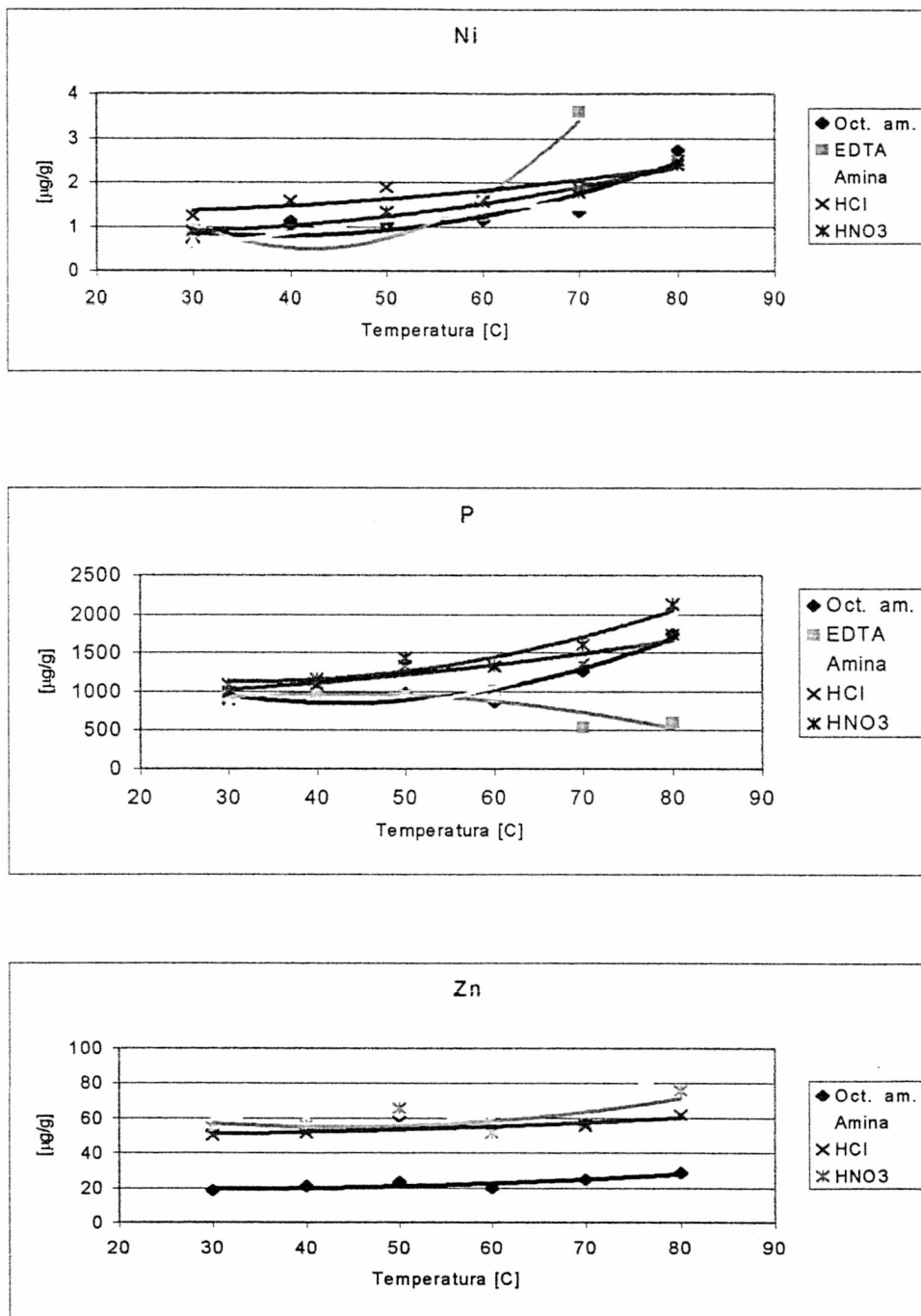
4.3.1.5. Wpływ temperatury na wydajność procesu ekstrakcji

Zbadano zależność efektywności ekstrakcji od temperatury. W tym celu proces ługowania igliwia przeprowadzono w temperaturze bliskiej temperaturze pokojowej (tutaj ok. 30 °C) oraz 40, 50, 60, 70 i 80 °C z udziałem octanu amonu, EDTA, chlorowodoru hydroksyaminy oraz kwasów solnego i azotowego. Porównano zawartości pierwiastków śladowych i głównych w ekstraktach. Wybrane wyniki przedstawione są na rysunkach 29 i 30.

Wzrost temperatury, z reguły, powodował znaczny wzrost wydajności procesu ługowania, jednak zależność wydajności od temperatury jest różna dla przypadków tutaj rozpatrywanych. Zauważono wyraźny wzrost stężenia B, Fe, Ni, Pb i Zn w ekstraktach wraz ze wzrostem temperatury, w której przeprowadzano proces. Największe różnice obserwowano w przypadku żelaza i fosforu. Jednocześnie, na podstawie uzyskanych wyników, można stwierdzić, że amina jest odczynnikiem najsilniej reagującym na zmiany temperatury. Natomiast kwas azotowy w wysokich temperaturach (70 i 80 °C) powoduje częściową mineralizację próbek - świadczy o tym zmiana barwy ekstraktów. Roztwory po ekstrakcji igliwia z 1 M HNO₃ w niższych temperaturach są brunatne; a te otrzymane po ługowaniu w temperaturze 70 lub 80 °C są jasnożółte (zaś pozostałość brunatnieje).



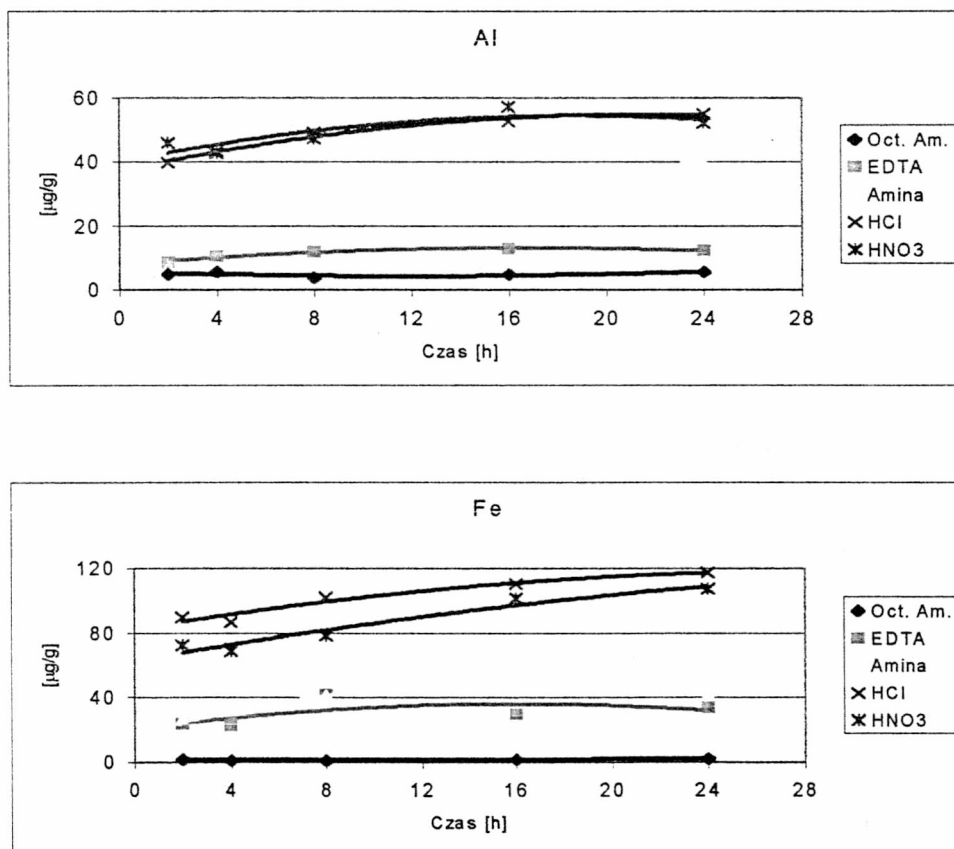
Rysunek 29. Porównanie wydajności ekstrahentów w zależności od temperatury procesu dla boru, żelaza i manganu



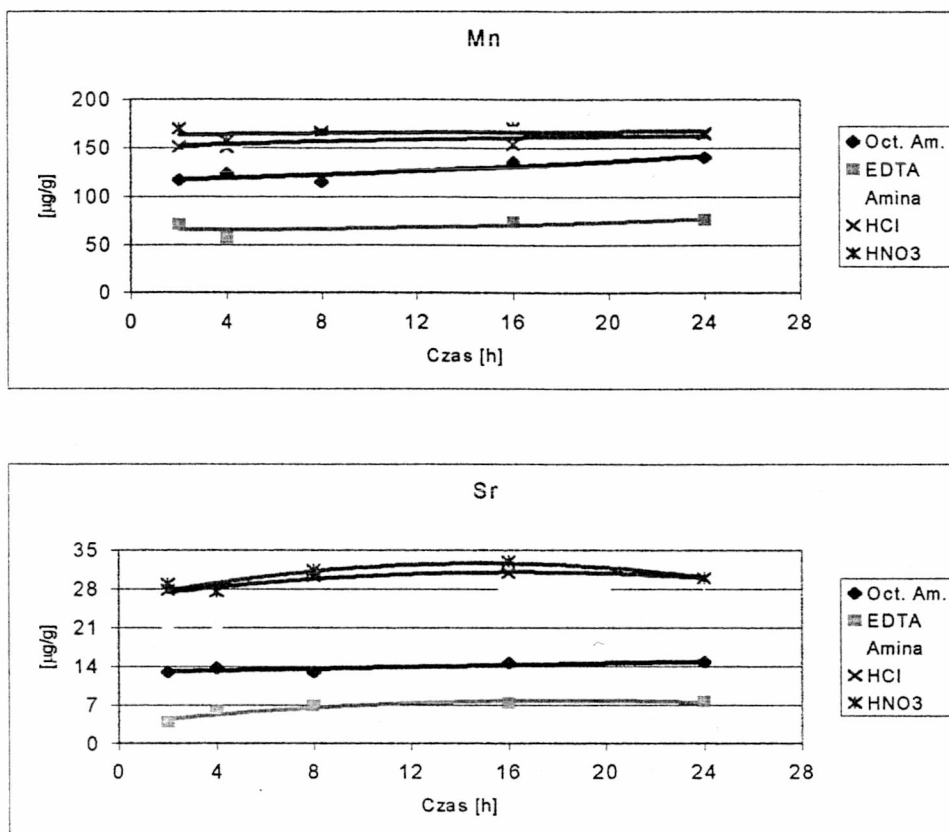
Rysunek 30. Porównanie wydajności ekstrahentów w zależności temperatury procesu dla niklu, fosforu i cynku

4.3.1.6. Badanie zależności między czasem wytrząsania a wydajnością ekstrakcji

Żeby ocenić wpływ czasu ekstrakcji na jej efektywność próbki igliwia były wytrząsane z octanem amonu, wersenianem sodu, chlorowodorkiem hydroksyaminy, kwasem solnym oraz azotowym przez 2, 4, 8, 12 i 24 godziny. Wyniki oznaczeń wybranych pierwiastków prezentowane są na rysunkach 31 i 32. Dla większości badanych pierwiastków nie zaobserwowano wyraźnej zależności między efektywnością ekstrakcji a czasem (dla $t > 2$ h), chociaż zmiany stężenia wraz z wydłużeniem czasu zazwyczaj są wyższe od 10 %. Wyjątki stanowią żelazo i glin – dla tych pierwiastków wzrost stężenia jest znaczny.



Rysunek 31. Wydajność ekstrahentów w zależności od czasu ekstrakcji dla glinu i żelaza



Rysunek 32. Wydajność ekstrahentów w zależności od czasu ekstrakcji dla manganu i strontu

4.3.2. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami

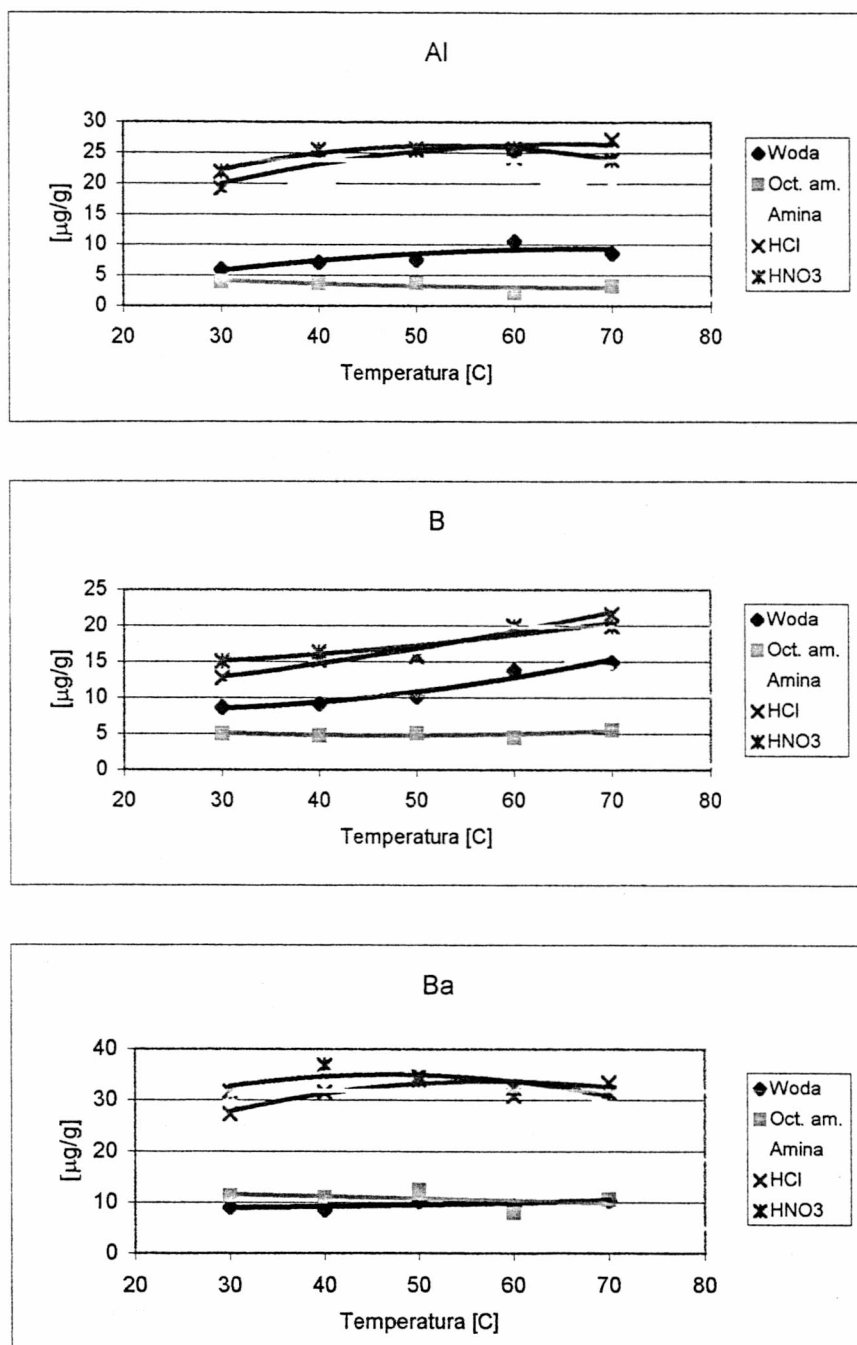
W następnym etapie badań proces ekstrakcji wspomagano energią ultradźwiękową.

Zbadano wydajność procesu ekstrakcji, w której konwencjonalne wytrząsanie zastąpione zostało działaniem ultradźwięków. Wykonano eksperymenty, podczas których próbki igliwia świerka wraz z ekstrahentem poddano działaniu ultradźwięków w myjce ultradźwiękowej. Sprawdzono wpływ: rodzaju ekstrahenta, czasu ługowania i temperatury ekstrakcji na wydajność procesu. Z wykorzystaniem metody ICP-AES oznaczono zawartość wybranych pierwiastków w następujących ekstraktach: woda dejonizowana, octan amonu (1 M), wersenian sodu (0,1 M), chlorowodorek hydroksyaminy (0,1 M) oraz kwasach (1 M) solnym i azotowym. Wyznaczono wydajność procesu ekstrakcji w zależności od czasu (10, 15, 30, 60 i 180 minut). Przeprowadzono doświadczenia i porównano wyniki ługowania pierwiastków śladowych i głównych z igliwia w temperaturze 30, 40, 50, 60 i 70 °C. Zbadano także wydajność ługowania pierwiastków dla różnych stosunków fazy stałej do ciekłej (1:10 i 1:20). Wyniki oznaczeń wybranych pierwiastków w badanych ekstrahentach w zależności od temperatury, czasu i stosunku faz przedstawione są odpowiednio na rysunkach: 33-35, 36-37, 38-39.

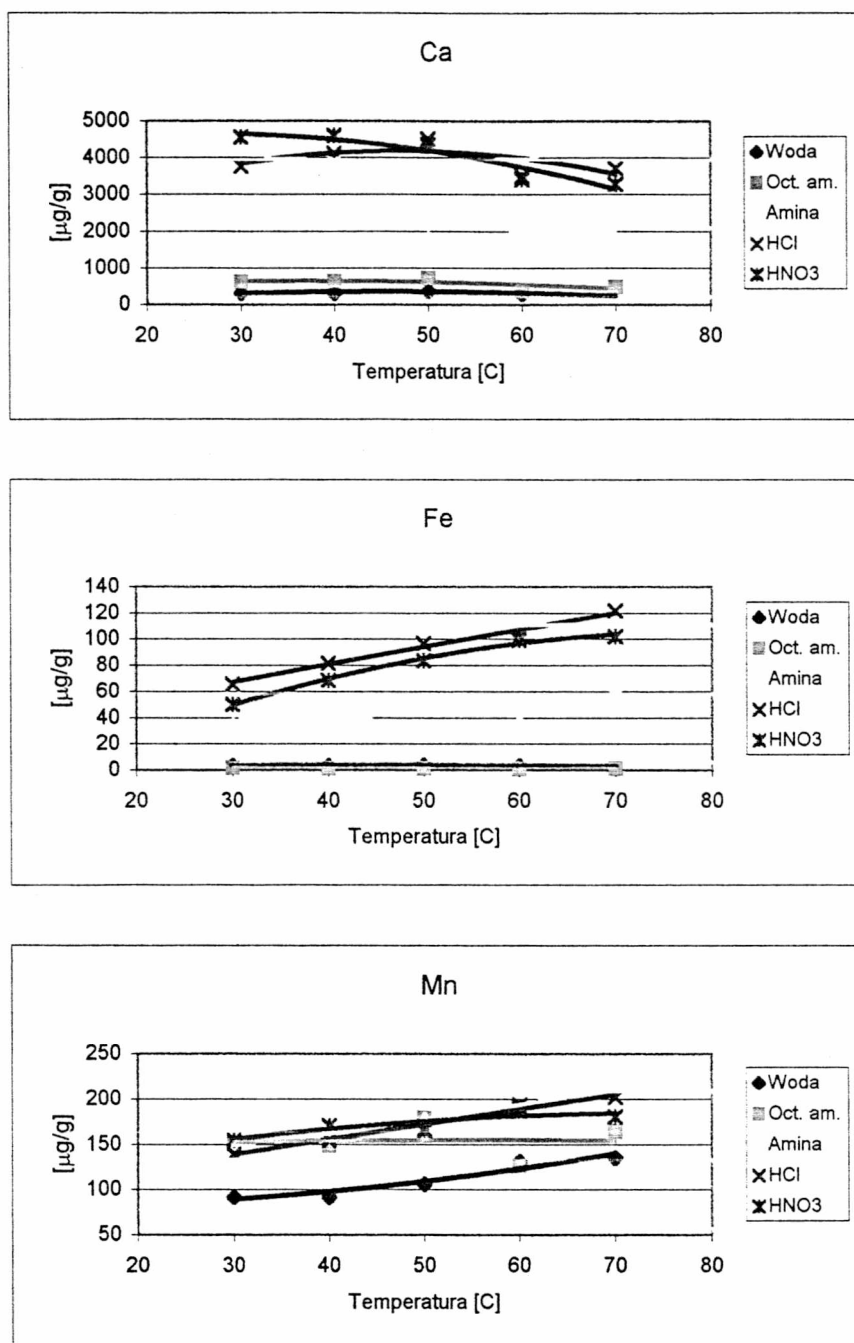
Dla większości analizowanych pierwiastków nie zaobserwowano wyraźnej zależności między wydajnością ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękowo a czasem ługowania. Tylko dla glinu, boru, wapnia, miedzi, żelaza, magnezu, manganu, tytanu i cynku zauważono niewielki wzrost stężenia analitu w niektórych ekstrahentach wraz z wydłużeniem czasu ługowania.

Podobnie jak w przypadku ekstrakcji konwencjonalnej, wzrost temperatury, w której przeprowadzona była ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami, powoduje wzrost wydajności procesu ługowania dla glinu, boru, kadmu, żelaza, magnezu, manganu, niklu i strontu.

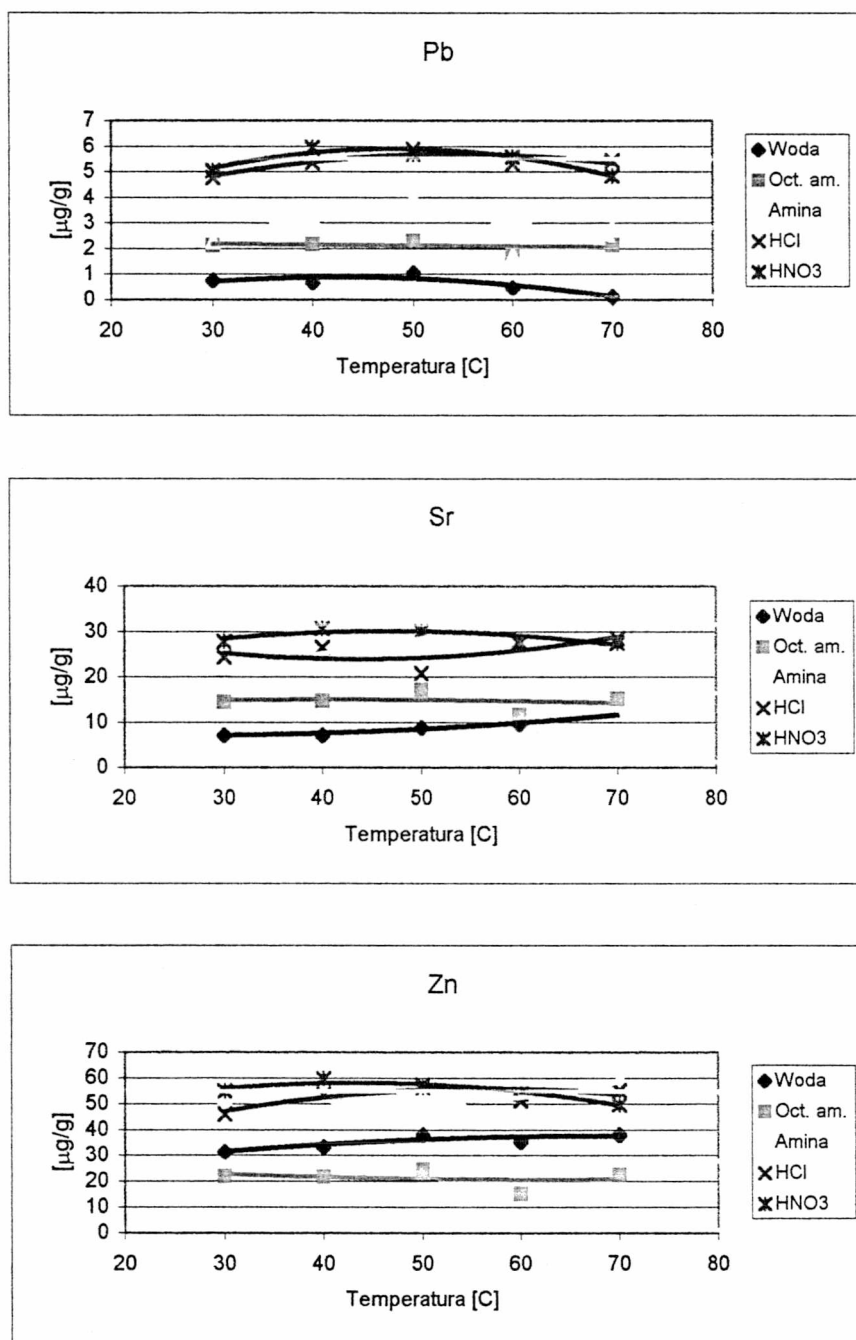
Dla większości badanych ekstrahentów i analizowanych pierwiastków zmiana stosunku fazy stałej do ciekłej nie powoduje znaczącej zmiany wydajności procesu ługowania pierwiastków z igliwia. Największe różnice zaobserwowano dla boru, kadmu, manganu i tytanu - zmierzone w ekstraktach koncentracje tych pierwiastków są wyższe, gdy stosunek fazy stałej do cieczy wynosi 1:20.



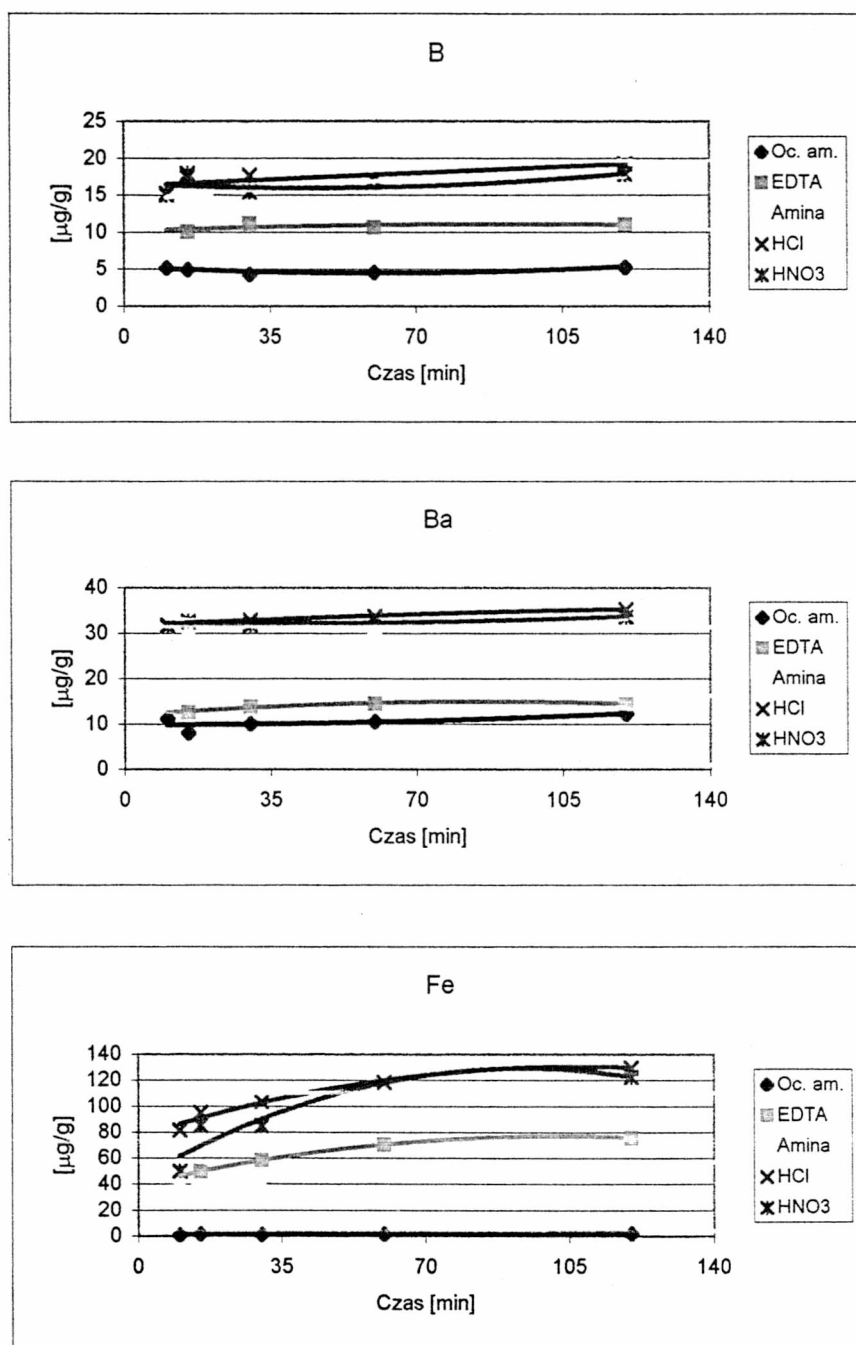
Rysunek 33. Porównanie wydajności ekstrahentów w zależności od temperatury procesu



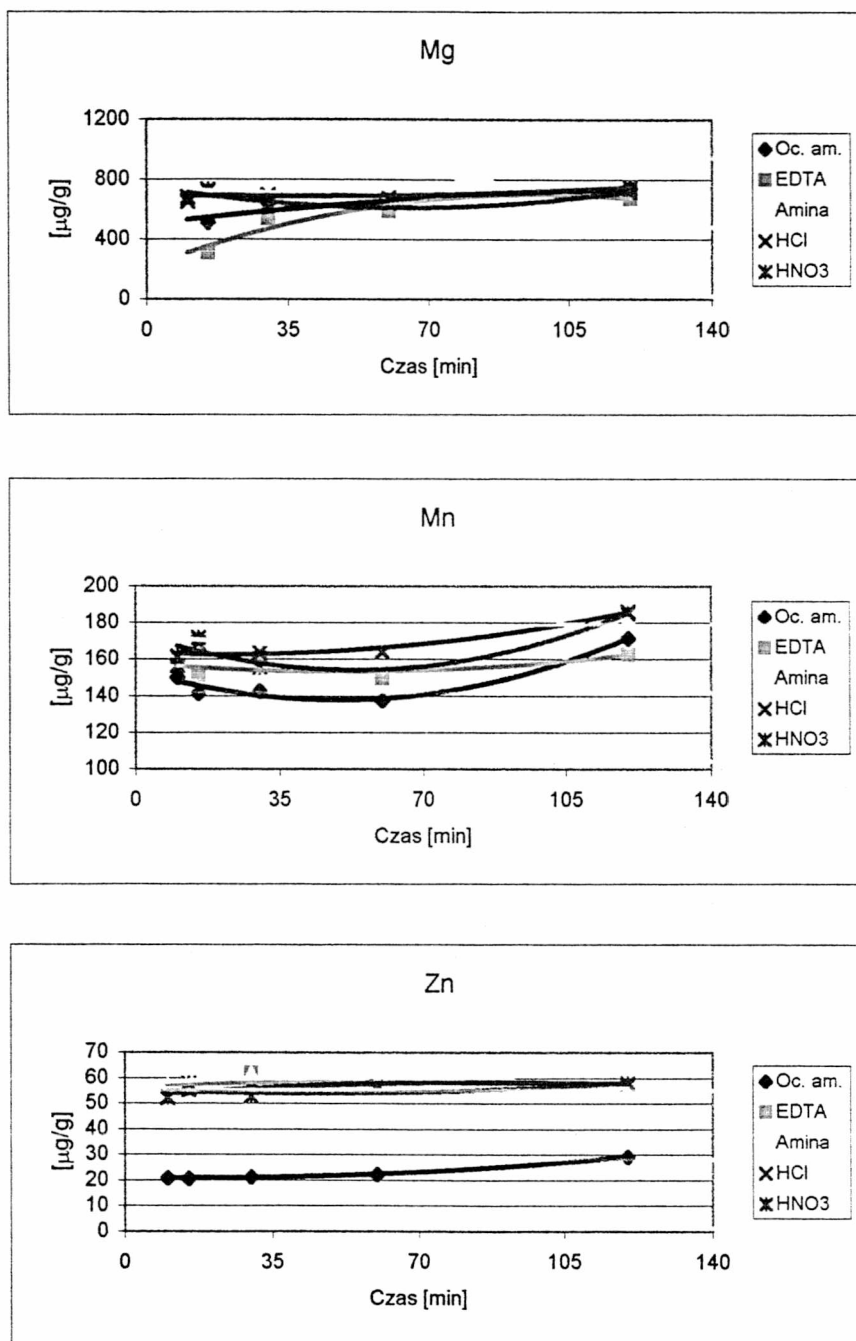
Rysunek 34. Porównanie wydajności ekstrahentów w zależności od temperatury procesu



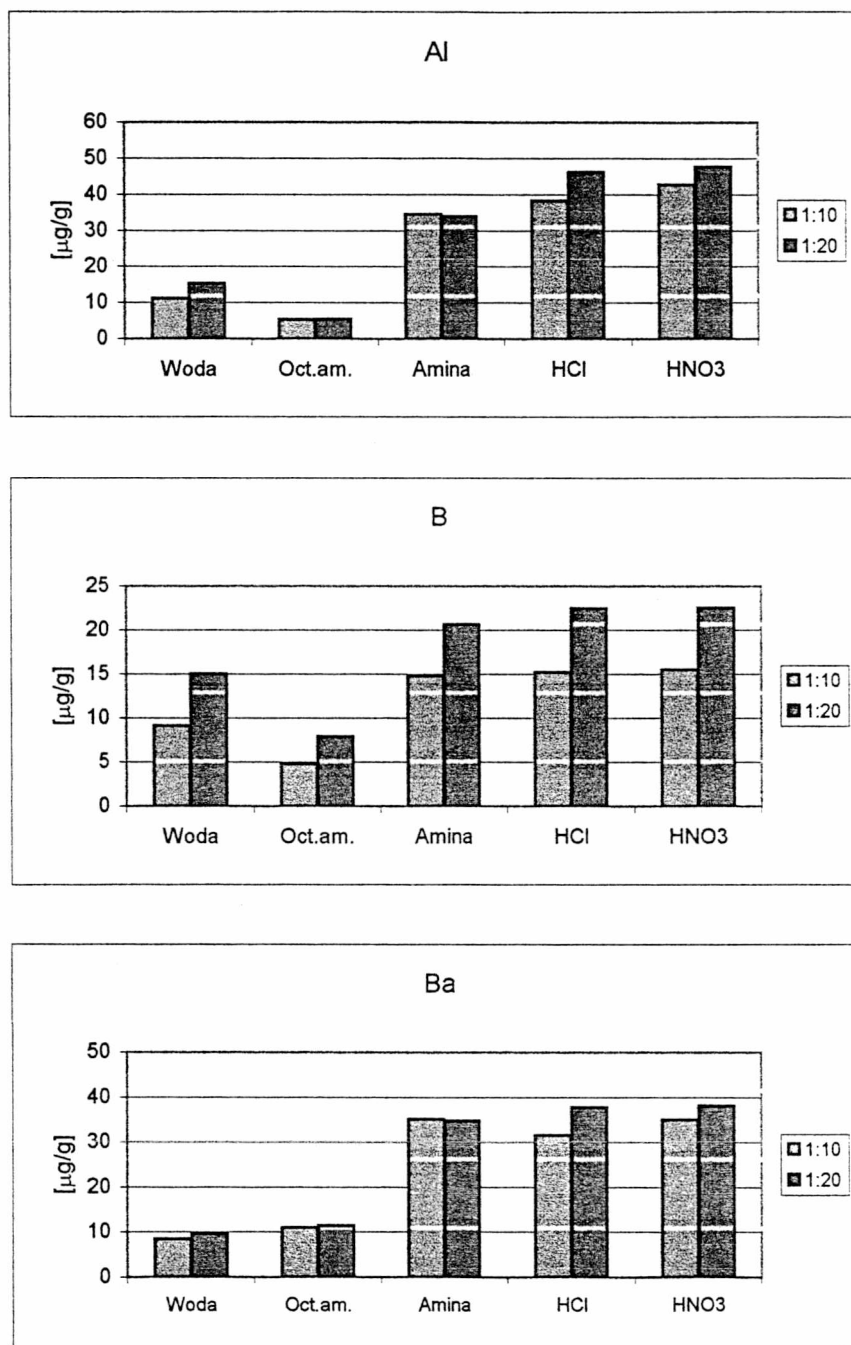
Rysunek 35. Porównanie wydajności ekstrahentów w zależności od temperatury procesu



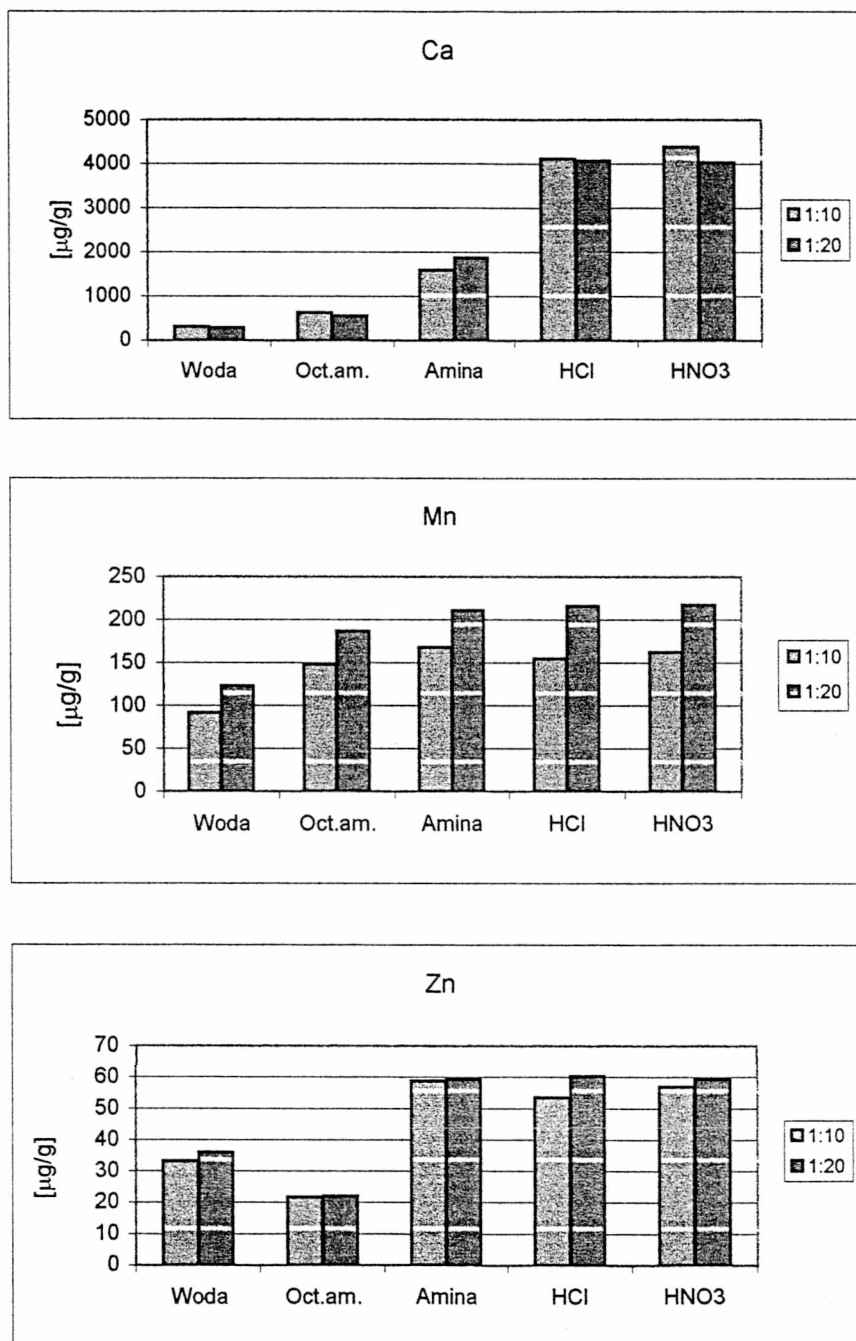
Rysunek 36. Porównanie wydajności ekstrahentów w zależności od czasu ekstrakcji



Rysunek 37. Porównanie wydajności ekstrahentów w zależności od czasu ekstrakcji



Rysunek 38. Wydajność procesu ługowania w zależności od stosunku faz



Rysunek 39. Wydajność procesu ługowania w zależności od stosunku faz

4.3.3. Ekstrakcja wspomagana mikrofalowo

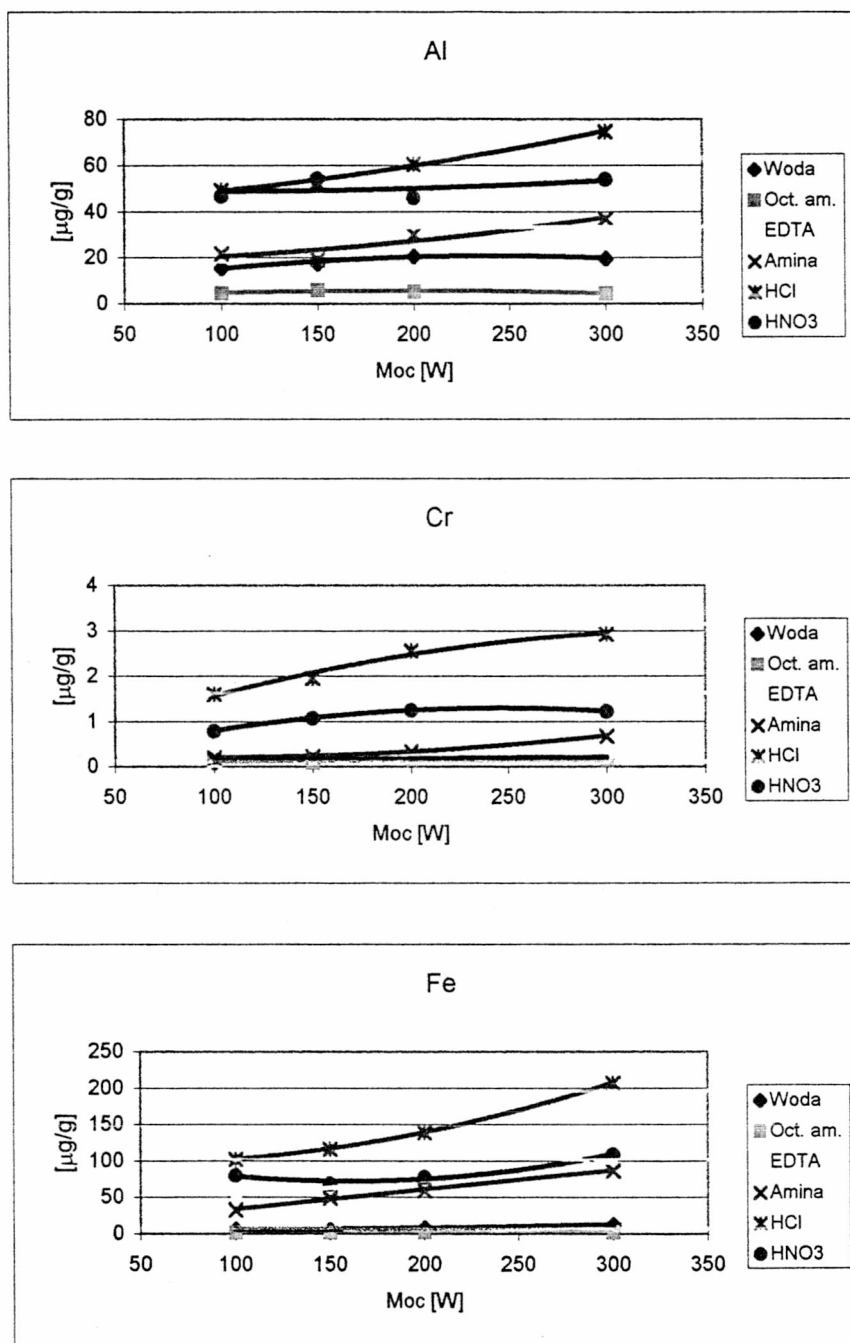
Trzeci etap badań związanych z zastosowaniem ekstrakcji w analizie pierwiastkowej igliwia obejmował wspomaganie tego procesu energią mikrofalową.

Przeprowadzono analizę efektywności procesu ekstrakcji wspomaganą mikrofalowo. Zbadano zależność między stężeniem wybranych pierwiastków w ekstraktach a: rodzajem ekstrahenta, czasem ekstrakcji i mocą promieniowania mikrofalowego. Przeprowadzono ekstrakcję z wodą dejonizowaną, octanem amonu (1 M), EDTA (0,1 M), chlorowodorkiem hydroksyaminy (0,1 M) oraz kwasem solnym (1 M) i kwasem azotowym (1 M). Sprawdzone zależności wydajności procesu od mocy promieniowania mikrofalowego dla 100, 150, 200 i 300 W. W celu ustalenia zależności między wydajnością procesu ekstrakcji wspomaganą mikrofalowo a czasem ługowania wykonano doświadczenia, w których igliwie poddane było działaniu ekstrahenta i promieniowania (moc 150 W) w czasie 2, 5, 10 i 15 minut.

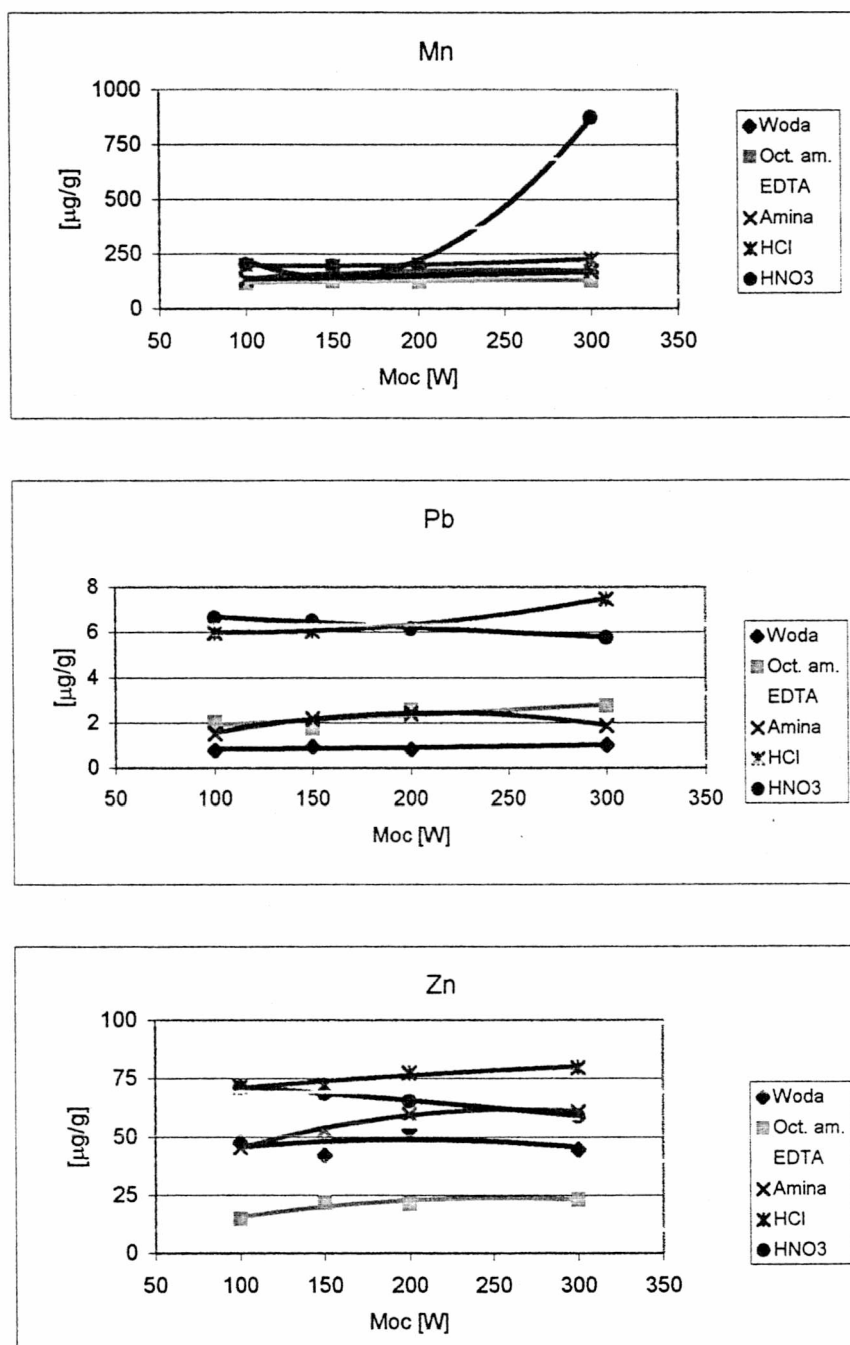
Na rysunkach 40 i 41 przedstawiono zależności między mocą promieniowania mikrofalowego a wydajnością procesu ługowania. Zauważono, że wzrost mocy promieniowania dostarczonej w czasie procesu ekstrakcji powoduje wzrost stężeń badanych pierwiastków w ekstraktach. Najwyraźniejsza zależność występuje dla Al, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, Sr i Zn. Nieoczekiwanie wzrost mocy dostarczonej w procesie ekstrakcji kwasem azotowym spowodował obniżenie sygnałów pomiarowych boru, baru, wapnia, magnezu, ołowiu, strontu i cynku. Można to wytłumaczyć oddziaływaniem w plazmie nierozłożonej matrycy organicznej na analit. W odróżnieniu do wcześniej omawianych technik w przypadku ekstrakcji wspomaganą mikrofalowo zaobserwowano znaczny wzrost wydajności ługowania przy użyciu badanych ekstrahentów wraz z wydłużeniem czasu dla chromu, żelaza i strontu (rysunki 42, 43 i 44). Taką samą zależność odnotowano dla glinu (w roztworach EDTA, aminy, kwasów solnego i azotowego), boru (woda, EDTA, amina i kwas azotowy), baru (w wodzie, octanie amonu, EDTA i aminie) oraz wapnia (ługowanego wodą, octanem amonu, EDTA i aminą).

W przypadku energii mikrofalowej trudno jest jednoznacznie określić wpływ mocy i czasu działania promieniowania na wydajność procesu ekstrakcji wspomaganą mikrofalowo, ponieważ wraz ze wzrostem mocy i wydłużaniem czasu wzrasta temperatura – a to oznacza możliwość zachodzenia częściowej mineralizacji. Zwiększenie mocy dostarczanego promieniowania i wydłużenie czasu ługowania wspomaganego mikrofalowo powoduje zmianę barwy ekstraktów. Roztwory octanu

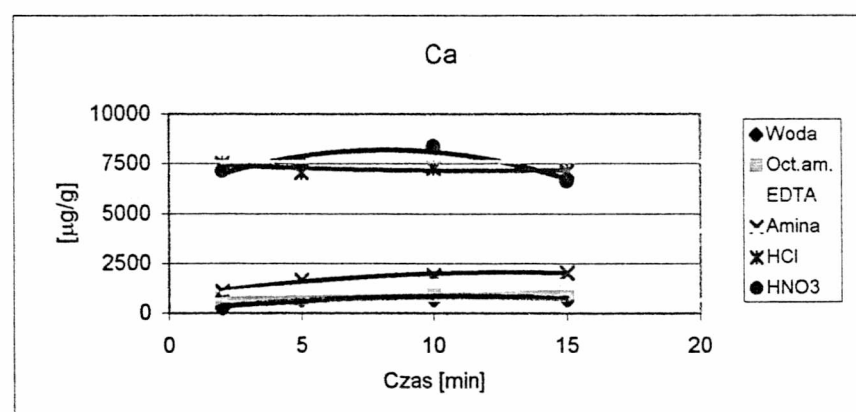
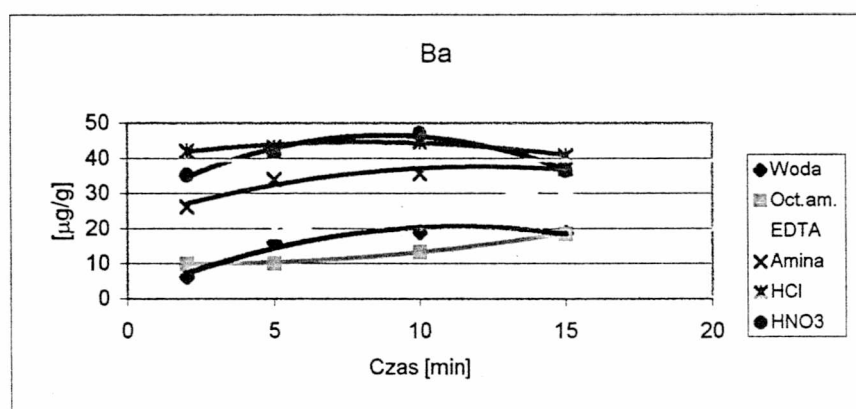
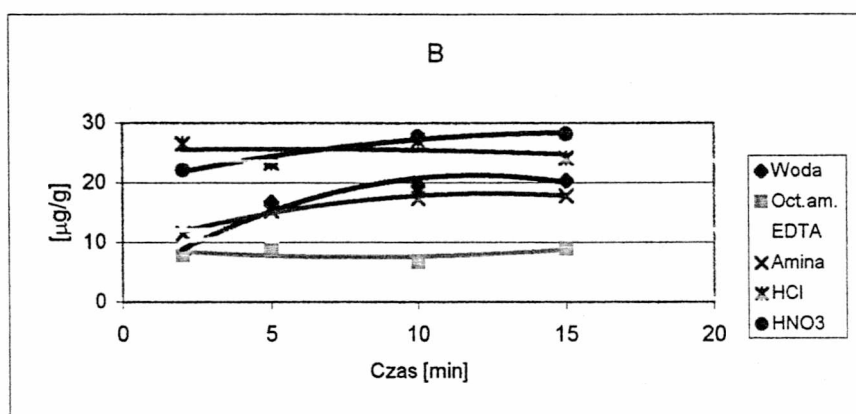
amonu i aminy - mętnieją, a ekstrakty HCl stają się ciemno brunatne. Tylko roztwory kwasu azotowego jaśnieją (zmiana barwy z brunatnej na żółtą) i stają się bardziej klarowne. Wskazuje to prawdopodobnie na przejście do roztworu ekstrahenta składników matrycy organicznej.



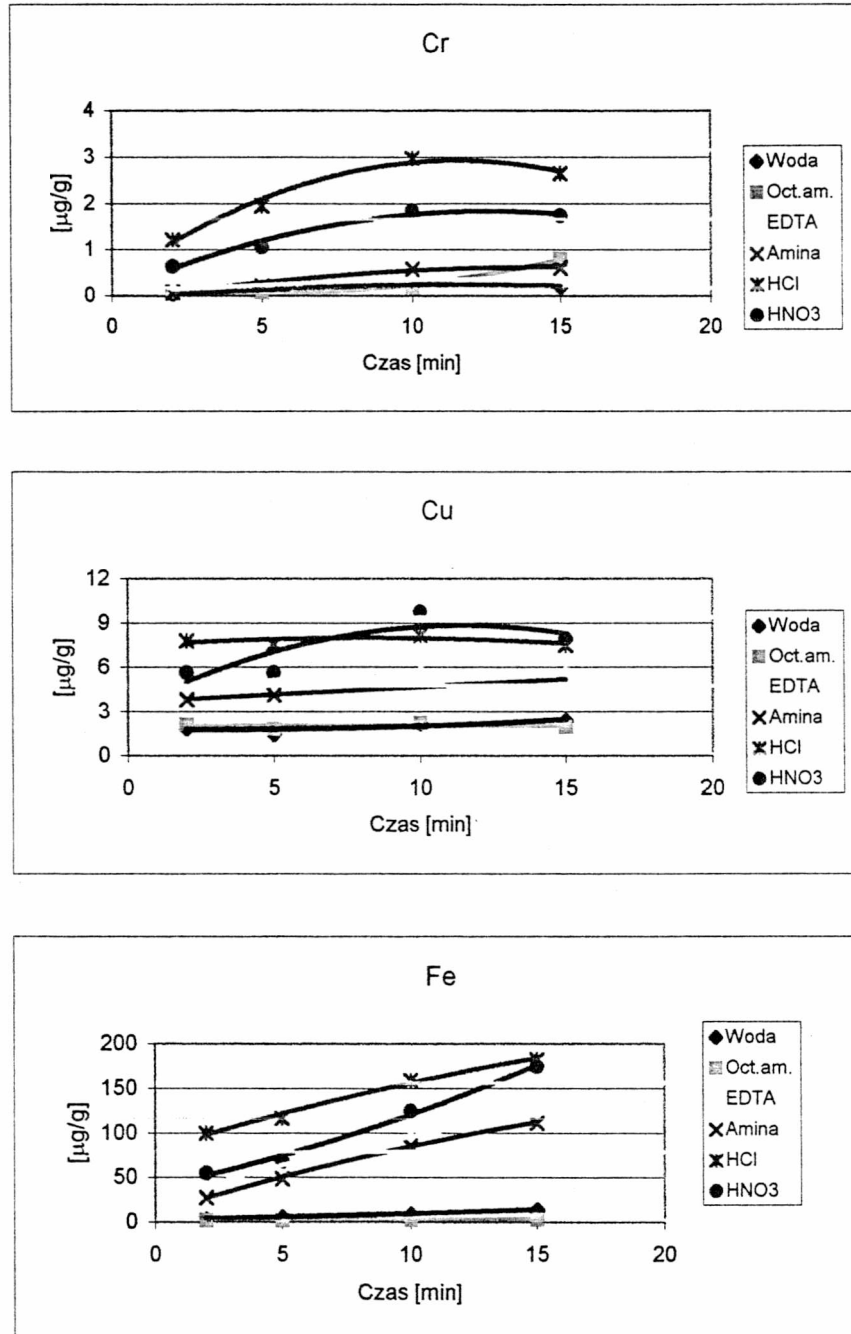
Rysunek 40. Porównanie wydajności ekstrahentów w zależności od mocy promieniowania



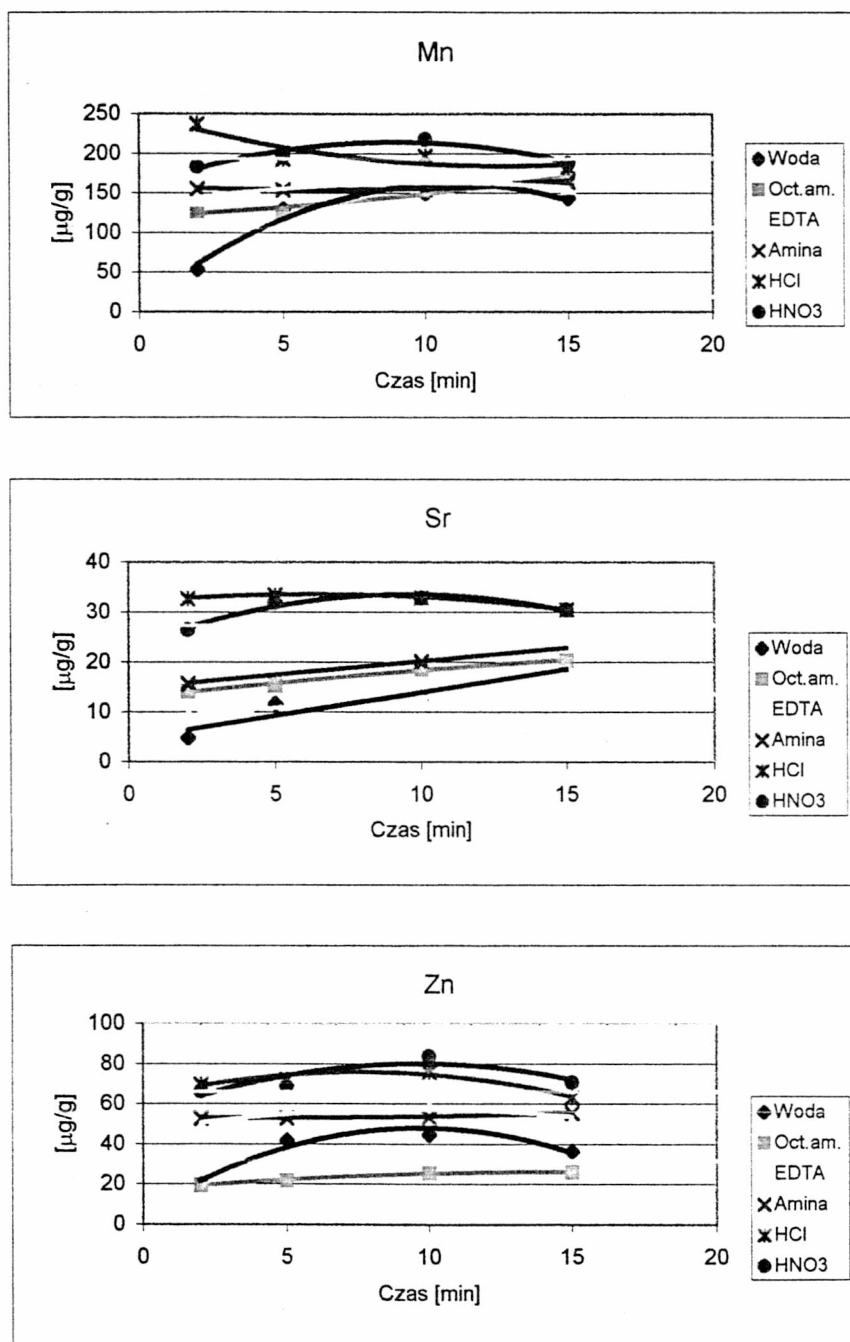
Rysunek 41. Porównanie wydajności ekstrahentów w zależności od mocy promieniowania



Rysunek 42. Wydajność ekstrahentów w zależności od czasu ekstrakcji



Rysunek 43. Wydajność ekstrahentów w zależności od czasu ekstrakcji

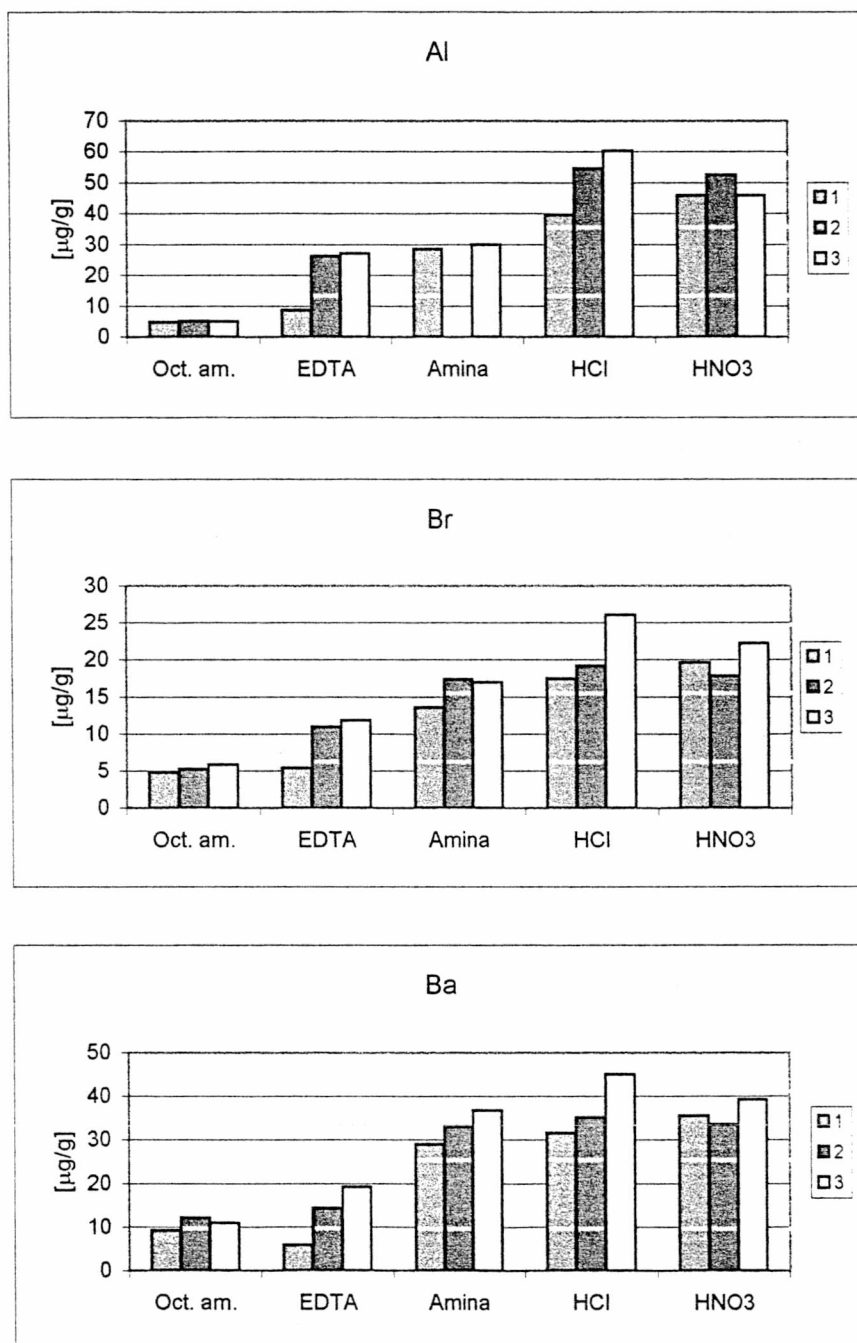


Rysunek 44. Wydajność ekstrahentów w zależności od czasu ekstrakcji

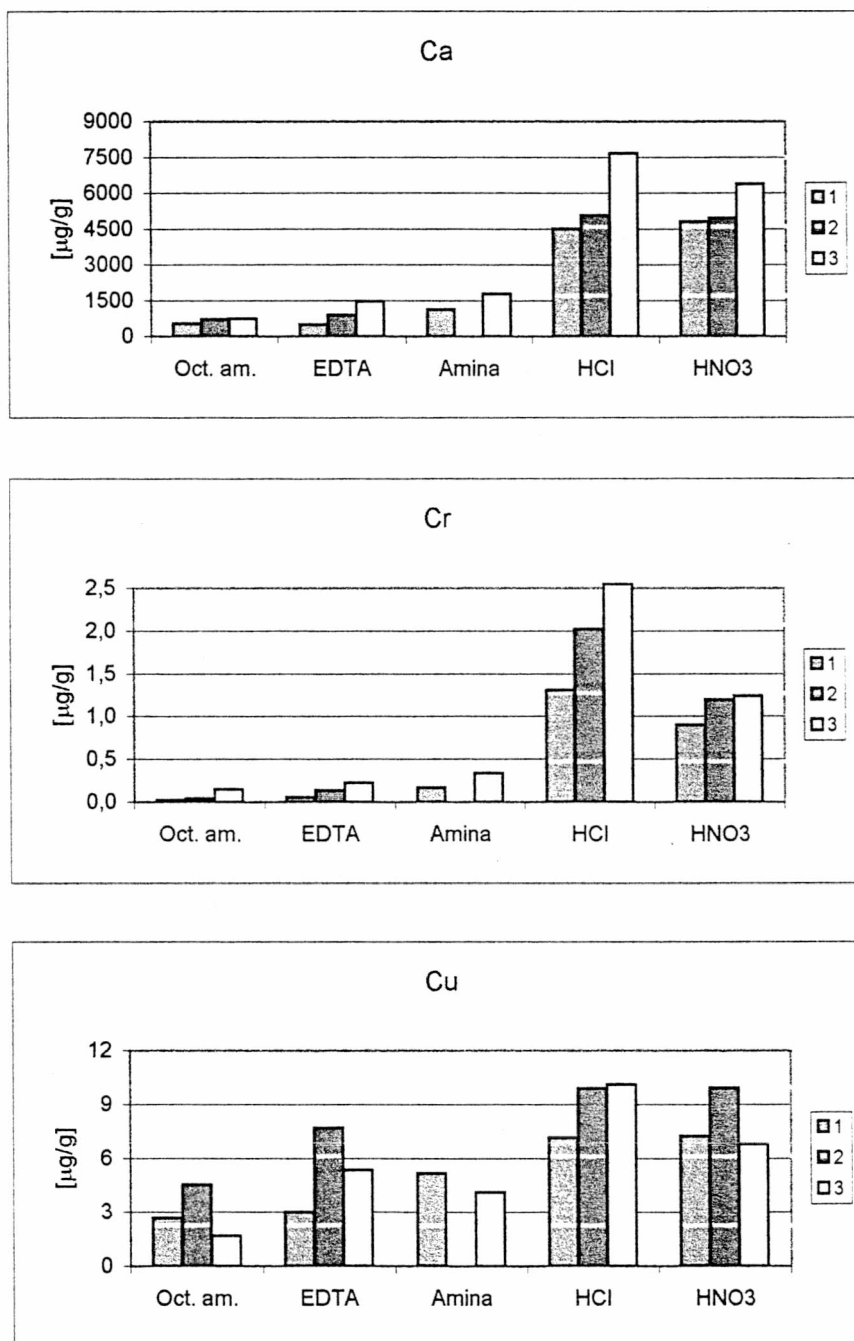
4.3.4. Porównanie efektywności ekstrakcji konwencjonalnej (z wytrząsaniem) oraz wspomaganej ultradźwiękami i mikrofalowo

Przeprowadzono porównanie wydajności procesu ekstrakcji konwencjonalnej i ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękowo i mikrofalowo. Porównano zawartości pierwiastków w ekstraktach (tj. octanie amonu, EDTA, aminie, kwasie solnym i azotowym) uzyskanych w procesie ekstrakcji konwencjonalnej (po dwóch godzinach wytrząsania), dwugodzinnej ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami (moc generatora - 200 W) oraz ekstrakcji wspomaganej mikrofalowo (5 minut, 200 W). Dla większości analizowanych pierwiastków zaobserwowano wzrost wydajności dwugodzinnego procesu ekstrakcji po zastosowaniu ultradźwięków (rysunki 45, 46, 47 i 48). Największe różnice stężeń zaobserwowano dla glinu (roztwory EDTA i kwasu solnego), baru (EDTA i amina), chromu (w kwasie solnym), miedzi, żelaza, magnezu (EDTA), manganu (EDTA), niklu (roztwory octanu amonu i obu kwasów), ołowiu (EDTA) i strontu (EDTA). Zastosowanie promieniowania mikrofalowego (o mocy 200 W) jako wspomaganie ekstrakcji powoduje dalszy wzrost wydajności procesu. Już po pięciu minutach ekstrakcji wspomaganej mikrofalowo uzyskano wyższe stężenia Al, B, Ba, Ca, Cr, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb i Zn w badanych ekstraktach.

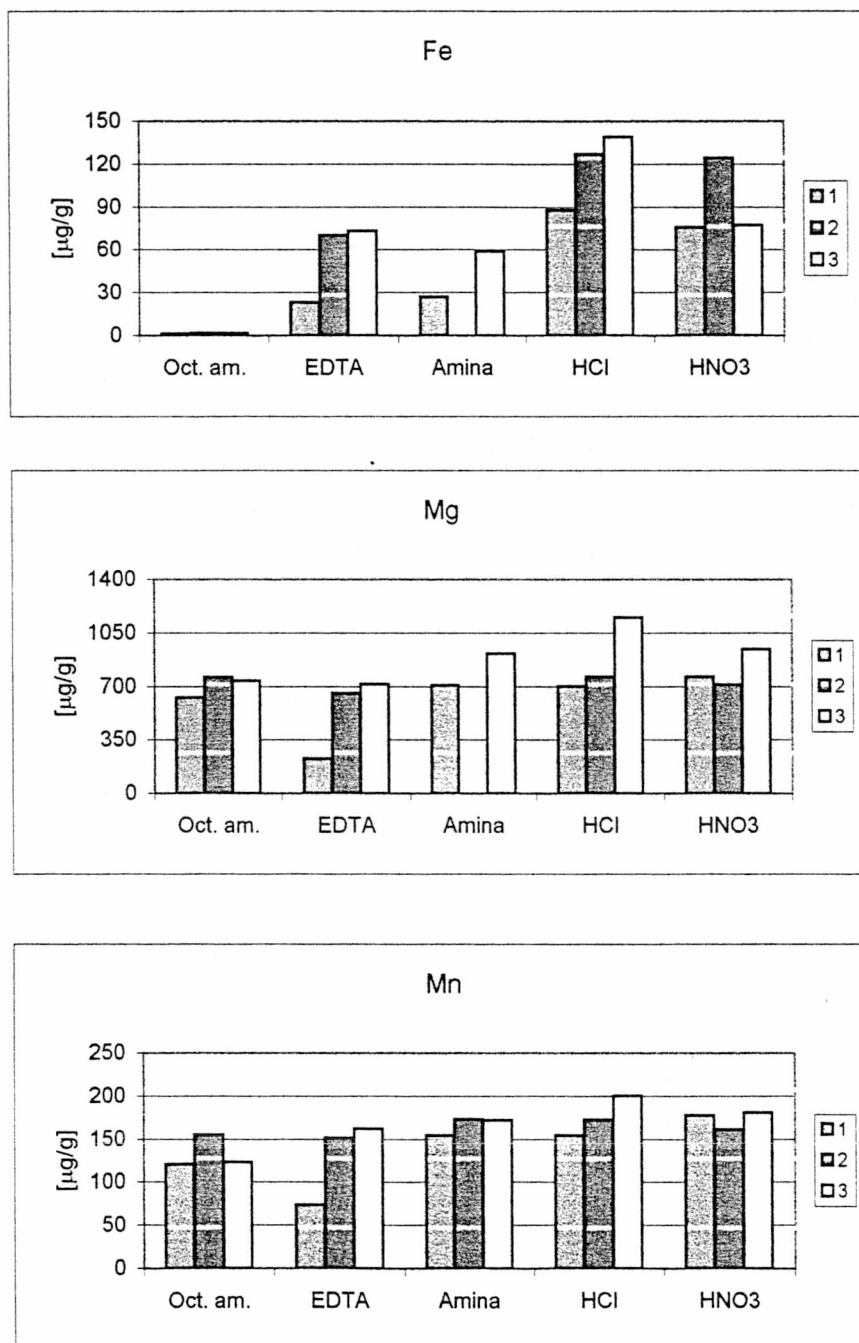
Tak więc można stwierdzić, że zastosowanie wspomaganie procesu ekstrakcji promieniowaniem ultradźwiękowym lub mikrofalowym pozwala znacznie skrócić czas ługowania. Należy jednak zaznaczyć, że w przypadku promieniowania mikrofalowego bardzo trudno jest określić wpływ mocy czy czasu na wydajność procesu w związku z wyraźnymi zmianami temperatury, której w naszym przypadku nie można mierzyć a tym samym kontrolować.



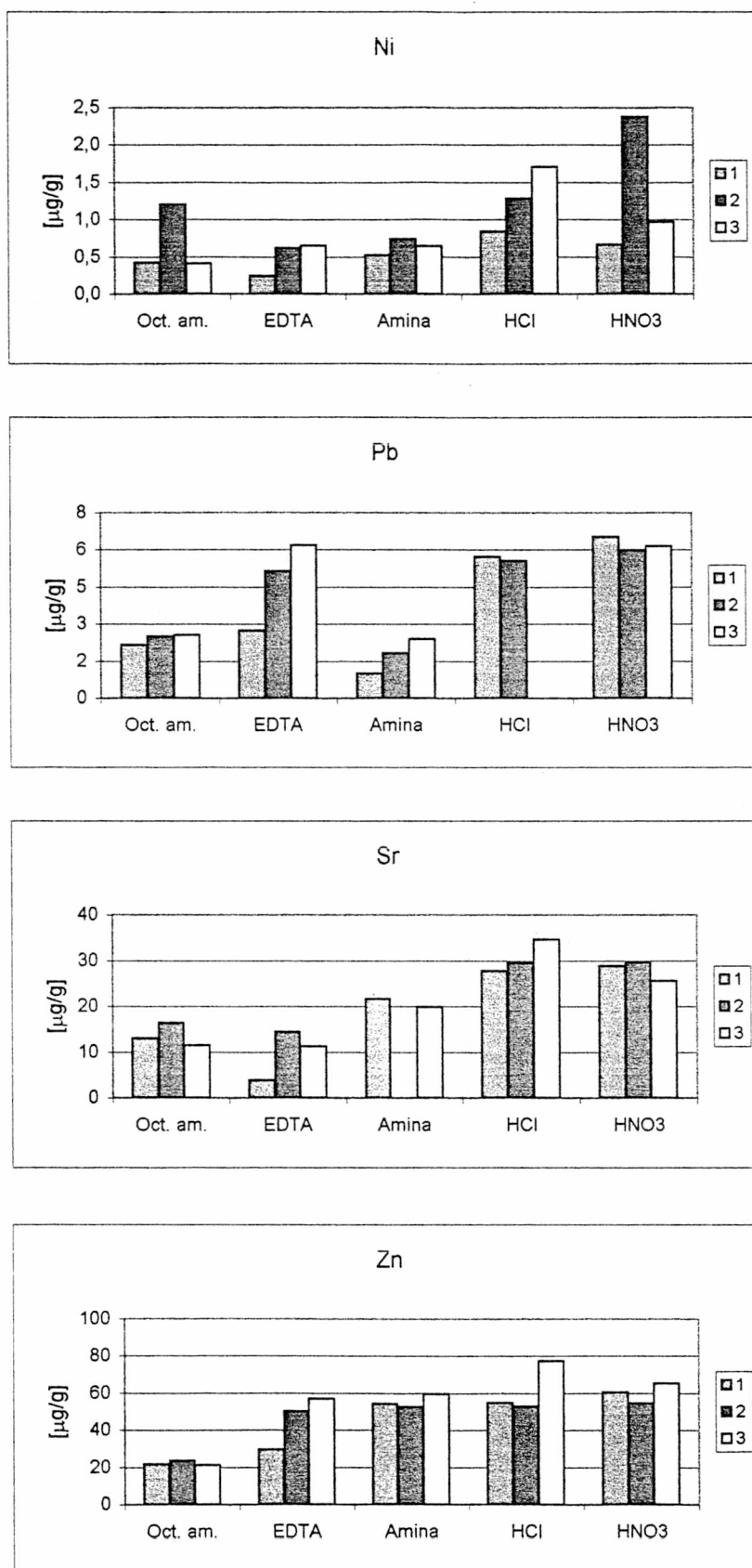
Rysunek 45. Porównanie efektywności różnych technik ekstrakcyjnych: 1- ekstrakcja konwencjonalna (2 h), 2 - ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (2 h, 200 W), 3 - ekstrakcja wspomagana mikrofalowo (5 min, 200 W)



Rysunek 46. Porównanie efektywności różnych technik ekstrakcyjnych: 1- ekstrakcja konwencjonalna (2 h), 2 - ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (2 h, 200 W), 3 - ekstrakcja wspomagana mikrofalowo (5 min, 200 W)



Rysunek 47. Porównanie efektywności różnych technik ekstrakcyjnych: 1- ekstrakcja konwencjonalna (2 h), 2 - ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (2 h, 200 W), 3 - ekstrakcja wspomagana mikrofalowo (5 min, 200 W)



Rysunek 48. Porównanie efektywności różnych technik ekstrakcyjnych: 1- ekstrakcja konwencjonalna (2 h), 2 - ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (2 h, 200 W), 3 - ekstrakcja wspomagana mikrofalowo (5 min, 200 W)

5. Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że metoda atomowej spektrometrii emisyjnej z plazmą sprzężoną indukcyjnie może być z powodzeniem zastosowana w analizie igliwia. Dzięki jej zastosowaniu możliwy jest jednoczesny pomiar zawartości pierwiastków śladowych oraz pierwiastków tworzących matrycę nieorganiczną szerokim zakresie stężeń. W tej pracy oznaczono pierwiastki śladowe i główne (Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Mg, Ni, P, Pb, Sr, Ti, V i Zn) w igliwii świerka, sosny i cisu. Wielopierwiastkowa analiza igliwia cisu została po raz pierwszy wykonana w tej pracy.

Ze względu na złożoność próbek materiału roślinnego, jakim jest igliwie, niezbędne jest zwrócenie szczególnej uwagi na zastosowane procedury przygotowania próbek do pomiaru.

Jednym z istotnych etapów wstępnego przygotowania próbek jest oczyszczenie materiału z przypadkowych zanieczyszczeń osadzonych na powierzchni tkanek. Porównanie metod mycia igliwia, które dotychczas stosowano wskazuje na znaczne różnice w ilościach pierwiastków usuwanych przez używane roztwory myjące. Ten problem nie był dotąd badany.

Kolejnym ważnym zagadnieniem analitycznym jest homogeniczność badanego materiału. Mielenia igliwia poprawiało homogeniczność próbki, choć igliwie okazało się materiałem bardziej jednorodnym niż analogiczny materiał drzew liściastych.

Porównano trzy metody przygotowania próbek do pomiaru: roztwarzanie klasyczne, mineralizacja mikrofalowa i spopielenie. Dla próbek igliwia najefektywniejszą okazała się mineralizacja mikrofalowa, która charakteryzowała się najwyższą precyzję uzyskiwanych wyników oraz niewielką ilością zużywanych odczynników i krótkim czasem roztwarzania. Zbadano także wydajność roztwarzania próbek igliwia z zastosowaniem mieszanin różnych kwasów. Porównanie zawartości pierwiastków w roztworach otrzymanych w wyniku roztwarzania igliwia z mieszaninami różnych utleniaczy (stężonego kwasu azotowego, mieszaniny kwasu azotowego i chlorowodorowego oraz mieszaniny kwasu azotowego i stężonego kwasu siarkowego) pozwala stwierdzić, że dla większości z nich uzyskano zgodne wyniki. Tylko dla kilku pierwiastków (takich jak: B, Ba i Pb) zmierzone stężenia różnią się znacząco.

Zastosowanie nowych procedur przygotowania próbek do analiz, wybór najefektywniejszych spośród już stosowanych oraz sprawdzenie poprawności wykonywanych oznaczeń wymaga przeprowadzenia walidacji. Wymaga to analizy certyfikowanych materiałów odniesienia oraz wykonywania analizy kilku (kilkunastu) próbek równoległych. Na podstawie tych analiz możliwe jest określenie precyzji, powtarzalności oraz dokładności metody pomiarowej. Wyniki oznaczeń Al, Mg, Mn, P, Zn, Cu i Fe w jedynym dostępnym na rynku materiale odniesienia - igliwiu świerka (CBR 101) - potwierdzają dużą dokładność metody ICP-AES, choć dla glinu i magnezu zgodności z wartościami certyfikowanymi uzyskano dopiero po użyciu do roztwarzania kwasu fluorowodorowego. Choć praktycznie nie stosowany do roztwarzania igliwia kwas fluorowodorowy jest niezbędny w przypadku oznaczania glinu. Należy podkreślić, że brak jest komercyjnych materiałów odniesienia dla igliwia cisu i aktualnie również sosny. W przypadku materiału referencyjnego CBR 101 brak jest wartości certyfikowanych dla wielu występujących w igliwiu i często oznaczanych metali śladowych.

Igliwie świerka pospolitego (*Picea abies*), sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*) i cisu pospolitego (*Taxus baccata*) można zastosować jako wskaźniki zanieczyszczeń chemicznych. Porównanie wyników uzyskanych tutaj z danymi literaturowymi wskazuje na zanieczyszczenia środowiska Oławy, szczególnie ołowiem i cynkiem. Wysoka zawartość kadmu w próbkach z Norwegii jest związana z dużą, naturalną zawartością tego pierwiastka w glebie [233].

Zbadano zależności między pierwiastkami w igliwiu świerka pospolitego. Zaobserwowano korelacje dodatnie pomiędzy: Al-Cd, Al-Fe, Al-Mg, Al-Pb, Al-Ti, Ba-Mn, Ba-Zn, Ca-Sr, Cd-Fe, Cd-Mg, Cd-Ni, Cd-Pb, Cd-Ti, Cu-Sr, Fe-Mg, Fe-Pb, Fe-Ti, Mg-Pb, Mg-Ti, Mn-Zn i Pb-Ti, natomiast antagonizm dla: Al-Ba, Ba-Fe, Ba-Ti, Ba-P i P-Zn.

Zastosowanie proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej do analizy igliwia oraz pozostałości po roztwarzaniu i popiołu (po raz pierwszy takie badanie dla materiału roślinnego wykonano w tej pracy) pozwala zarówno śledzić kolejne etapy przygotowania próbek jak i na szersze poznanie tego materiału.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów potwierdziły możliwość zastosowania ekstrakcji w układzie ciało stałe – ciecz jako nowej metody przygotowania próbek igliwia do pomiarów zawartości niektórych pierwiastków śladowych i głównych. Jednak wykorzystanie ekstrakcji zamiast konwencjonalnej mineralizacji wymaga dalszych badań w celu optymalizacji warunków przeprowadzania procesu tj. doboru stężenia ekstrahenta, wyboru temperatury i czasu ługowania. Wyniki badań nad parametrami wpływającymi na wydajność ekstrakcji (ługowania) wskazują, że najistotniejszy wpływ ma ekstrahent. Wpływ ten jest znacząco różny dla poszczególnych pierwiastków. Różnice w wydajności ługowania badanych pierwiastków przy użyciu roztworów różnych ekstrahentów, wskazują na możliwość zastosowania ekstrakcji w analizie specjacyjnej igliwia świerka.

Otrzymane wyniki badań, które rozszerzają zakres dotychczasowych prac nad ekstrahowaniem pierwiastków z materiałów roślinnych, należy jednak traktować jako punkt wyjściowy do zaawansowanych badań poświęconych analizie specjacyjnej.

6. Literatura

1. Kączkowski J., *Podstawy biochemii*, Wydawnictwa Naukowo –Techniczne, Warszawa 1996;
2. Harborne J.B., *Ekologia biochemiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997;
3. Falińska K., *Ekologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997;
4. Nason A., Dehaan R.L., *Świat biologii*, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1987;
5. Kabata-Pendias A., Pendias H., *Biogeochemia pierwiastków śladowych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999;
6. Kalac P., Niznznaska M., Bevilaqua D., Staskova I., *Sci. Total Environ.*, **177** (1-3), 251, 1996;
7. Haldimann M., Bajo C., Haller T., Venner T., Zimmerli B., *Mitt. Geb. Lebensmittelunters Hyg.*, **86** (5), 463, 1995;
8. Prado G., Alvarez-Leite E.M., De Oliveria M.S., *Bromatol. Chem. Toksykol.*, **51** (1), 37, 1995;
9. Schöppenthau J., Nölte J., Dunemann L., *Analyst (Cambridge U.K.)*, **121** (6), 845, 1996;
10. Marr K.M., Batten G.D., Blakeney A.B., *J. Sci. Food Agric.*, **68** (3), 285, 1995;
11. Awadallah R.M., Rashed M.N., *Acta Agron. Hung.*, **42** (3-4), 185, 1993;
12. Guenther K., von Bohlen A., Strompen C., *Anal. Chim. Acta*, **309** (1-3), 327, 1995;
13. Mustafa A.I., Ali K.M.I., Hossain M.A., Khan G.M., Amin M.N., *Dhaka Univ. J. Sci.*, **45** (2), 147 1997;
14. Anderson K.A., *materiały konferencyjne*, Pittcon 98', New Orleans, LA, USA, 1-5 marca 1998;
15. Szpunar J., Pellerin P., Makarov A., Doco T., Williams P., Lobinski R., *J. Anal. At. Spectrom.*, **14** (4), 639, 1999;
16. Tsuji A., Oka S., Sano Y., Matsushita R., Takada J., Sakurai H., *Biomed. Res. Trace Elem.*, **6** (2), 101, 1995;
17. Martin M.J., Pablos F., Gonzalez A.G., *Anal. Chim. Acta*, **358**, 177, 1998;
18. Sedrowicz L., Oledzka R., Czajkowska M., Gurdak E., *Bromatol. Chem. Toksykol.*, **29** (4), 353, 1996;
19. Odegard K.E., Lund W., *J. Anal. At. Spectrom.*, **12** (4), 403, 1997;
20. Marcos A., Fisher A., Rea G., Hill S.J., *J. Anal. At. Spectrom.*, **13** (6), 521, 1998;
21. Park C.J., Suh J.K., *J. Anal. At. Spectrom.*, **12** (5), 573, 1997;
22. Bonvehi J.S., Coll F.V., *Acta Aliment.*, **26** (3), 243, 1997;
23. Marzec A., Bulinski R., *Bromatol. Chem. Toksykol.*, **30** (2), 125, 1997;
24. Bulinski R., Bloniarz J., *Bromatol. Chem. Toksykol.*, **30** (2), 129, 1997;

-
25. Vadillo J.M., Milan M., Laserna J.J., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **355** (1), 10, 1996;
 26. Lodenius M., Tulisalo E., *Sci. Total Environ.*, **176**, 81, 1995;
 27. Bargagli R., *Sci. Total Environ.*, **176**, 121, 1995;
 28. Croch J.G., Severson R.C., Gough L.P., *Water, Air and Soil Pollution*, **63**, 253, 1992;
 29. Mersch J., Reichard M., *Arch. Environ. Contam., Toxicol.*, **34**, 336, 1998;
 30. Lobersli E.M., Steines E., *Water, Air and Soil Pollution*, **37**, 25, 1988;
 31. Lin Z.Q., Schuepp P. H., Schemenauer R.S., Kennedy G.G., *Water, Air and Soil Pollution*, **81**, 175, 1995;
 32. Ward N.I., *Sci. Total Environ.*, **93**, 393, 1990;
 33. Kozlov M.V., Haukioja E., Bakhtiarov A., Stroganov D.N., *Environmental Pollution*, **90**, 291, 1995;
 34. Kim N.D., Fergusson J.E., *Environmental Pollution*, **86**, 89, 1994;
 35. Bockheim J.G., Leide J.E., Frelich L.E., *Can. J. For. Res.*, **19**, 1543, 1989;
 36. Harju L., Lill J.-O., Saarela K.-E., Heselius S.-J., Hernberg F.J., Lindroos A., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **358**, 523, 1997;
 37. Huhn G., Schulc H., Stärk H.-J., Tölle R., Schüürmann G., *Water, Air and Soil Pollution*, **84**, 367, 1995;
 38. Rossbach M., Jayasekera R., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **354**, 511, 1996;
 39. Wytttenbach A., Bajo S., Tobler L., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **345**, 294, 1993;
 40. Wytttenbach A., Bajo S., Bucher J., Furrer V., Schleppi P., Tobler L., *Trees*, **10**, 31, 1995;
 41. Hovorka J., Marshall G.B., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **358**, 635, 1997;
 42. Burkhardt J., Eiden R., *Trees*, **4**, 22, 1990;
 43. Seneta W., *Drzewa i krzewy iglaste*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1981;
 44. Shepard M.R., Lee C.E., Woosley R.S., Butcher D.J., *Microchemical Journal*, **52**, 118, 1995;
 45. Audley D.E., Skelly J.M., McCormick L.H., Jackson W.A., *Water, Air and Soil Pollution*, **102**, 177, 1988;
 46. Arp P.A., Akerley C., Mellerowicz K., *Water, Air and Soil Pollution*, **48**, 277, 1989;
 47. Dion M., Loranger S., Kennedy G., Courchesne F., Layed J., *Water, Air and Soil Pollution*, **71**, 29, 1993;
 48. Hodson M.J., Sangster A.G., *Annals of Botany*, **82**, 375, 1998;
 49. Bryant K.N., Fowlkes A.J., Mustafa S.F., O'Neill B.J., Osterman A.C., Smith T.M., Shepard M.R., Woosley R.S., Butcher D.J., *Microchemical J.*, **56**, 382, 1997;
 50. Hodson M.J., Sangster A.G., *Annals of Botany*, **82**, 375, 1998;
 51. Houdijk A.L.F.M., Roelofs J.G.M., *Environmental Pollution*, **80**, 79, 1993;
 52. Hüttl R.F., Wisniewski J., *Water, Air and Soil Pollution*, **33**, 265, 1987;
-

-
53. Robrage W.P., Pye J.M., Bruck R.I., *Plant and Soil*, **114**, 19, 1989;
54. Edmonds R.L., Thomas T.B., *Can. J. For. Res.*, **25**, 1049, 1995;
55. Berg B., Ekbohm G., Söderström B., Staaf H., *Water, Air and Soil Pollution*, **59**, 165, 1991;
56. Sauerbeck D.R., *Water, Air and Soil Pollution*, **57-58**, 227, 1991;
57. Blanuša M., Prester Lj., Matek M., Kucak A., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **62**, 700, 1999;
58. Alvarado D., de Bauer L.I., Galindo J.A., *Environmental Pollution*, **80**, 115, 1993;
59. Santerre A., Mermet J.M., Villanueva V. R., *Water, Air and Soil Pollution*, **52**, 157, 1990;
60. Ke J., Skelly J.M., *Water, Air and Soil Pollution*, **74**, 289, 1994;
61. Carlson C.L., Carlson C.A., *Water, Air and Soil Pollution*, **72**, 89, 1994;
62. Gough L.P., Severson R.C., Jackson L.L., *Water, Air and Soil Pollution*, **74**, 1, 1994;
63. Opydo J., *Chem. Anal. (Warsaw)*, **42**, 123, 1997;
64. Kukkola E., Huttunen S., Bäck J., Rautio P., *Trees*, **11**, 378, 1997;
65. Wytenbach A., Bajo S., Tobler L., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **354**, 668, 1996;
66. Kazda M., Zvacek L., *Plant and Soil*, **114**, 257, 1989;
67. Maňková B., *Lesnictví-Forestry*, **43 (3)**, 117, 1997;
68. Boman J., Larsson C., Olsson M., Raitio H., *X-Ray Spectrometry*, **25**, 89, 1996;
69. Ines J.L., *Environmental Pollution*, **88**, 183, 1995;
70. Dmuchowski W., *Określenie składu chemicznego igieł sosny zwyczajnej jako metoda bioindykacji zanieczyszczenia środowiska*, praca doktorska, Warszawa 1990;
71. Cape J.N., Freer-Smith P. H., Paterson I.A., Parkinson J.A., Wolfenden J., *Trees*, **41**, 211, 1990;
72. Mandere M., Tuulmets L., *Water, Air and Soil Pollution*, **94**, 247, 1997;
73. Ogner G., *Environmental Pollution*, **82**, 197, 1993;
74. Cape J.N., *Environmental Pollution*, **82**, 167, 1993;
75. Moffat A.J., Matthews R.W., Hall J.E., *Can. J. For. Res.*, **21**, 902, 1991;
76. Ernst W.H.O., *Sci. Total Environ.*, **176**, 15, 1995;
77. MacNaeidhe F. *Sci. Total Environ.*, **176**, 25, 1995;
78. L. Tobler, S. Bajo, A. Wytenbach, M. Langenauer, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **350**, 85-88 (1994);
79. Namieśnik J., Łukasiak J., Jamrógiewicz Z., *Pobieranie próbek środowiskowych do analizy*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995;
80. Viksna A., Znotina V., Boman J., *X-Ray Spectrom.*, **28**, 275, 1999;
81. MacNaeidhe F. *Sci. Total Environ.*, **176**, 25, 1995;
82. Porter J.R., *Environ. Pollut. Ser. B*, **12**, 195, 1986;
83. Ernst W.H.O., *Chem. Rund.*, **31**, 32, 1978;
-

-
84. Wytttenbach A., Bajo S., Tobler L., Keller Th., *Plant Soil*, **85**, 313, 1985;
 85. Tomassini F.D., Pucket K.J., Nieoer E., Richardson D.H.S., Grace B., *Can. J. Bot.*, **54**, 1591, 1976;
 86. Fuchs C., Garty J., *Environ. Experimental Bot.*, **23**, 29, 1983;
 87. Kocman V., Peel T.E., Tomlinson G.H., *commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **22**, 2063, 1991;
 88. Houba V.J.G., Novozamsky I., van der Lee J.J., *Sci. Total Environ.*, **176**, 73, 1995;
 89. Market B., *Sci. Total Environ.*, **176**, 45, 1995;
 90. Bradsaw D., materiały konferencyjne, 24th FACSS, Providence, USA, 26-30 października 1997;
 91. Wytttenbach A., Schleppi P., Tobler L., Bajo S., Bucher J., *Plant and Soil*, **168-169**, 305, 1995;
 92. Houba V.J.G., Novozamsky I., van der Lee J.J., *Sci. Total Environ.*, **176**, 73, 1995
 93. Hoenig M., *Sci. Total Environ.*, **176**, 85, 1995;
 94. Roberntz P., Linder S., *Trees*, **14**, 17, 1999;
 95. Mohl C., Stoeppler M., *Fresenius J. Anal.Chem.*, **345**, 164, 1993;
 96. Koirtyohann S.R., Yates D.A., *Atomic Spectroscopy*, **15**, 167, 1994;
 97. Sahuquillo A., Rubio R., Rauret G., *Analyst (Cambridge U.K.)*, **124** (1), 1, 1999;
 98. Bettinelli M., Spezia S., Baroni U., Bizzarri G., *Spec. Publ. – R. Soc. Chem.*, **202**, 211, 1997;
 99. Sawidis T., *Acta Hortic.*, **437**, 153, 1997;
 100. Minger A., Krahenbuhl U., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **67** (1-4), 41, 1997;
 101. Zhou H., Liu J., *At. Spectrosc.*, **18** (6), 192, 1997;
 102. Chakraborti D., Burguera M., Burguera J.L., *Fresenius J. Anal.Chem.*, **347**, 233, 1993;
 103. Krachler M., Burow M., Emons H., *Analyst (Cambridge U.K.)*, **124** (5), 777, 1999;
 104. Curdova E., Szakova J., Miholowa D., Mestek O., *Analysis*, **26** (3), 116, 1998;
 105. Yin M., Li B., *Spektrochimica Acta Part B*, **53**, 1447, 1998;
 106. Alvarado J.S., Neal T.J., Smith L.L., Erickson M.D., *Anal. Chim. Acta*, **322**, 11, 1996;
 107. Clement A., Brechet C., Bitsch M., *Spectra Anal.*, **189**, 19, 1996;
 108. Madeddu B., Rivoldini A., *At. Spectrosc.*, **17** (4), 148, 1996;
 109. Hoenig M., *Sci. Total Environ.*, **176**, 85, 1995;
 110. Dedina J., Fara M., Kolihova D., Koreckova J., Musil J. Plsko E., Sychra V., *Selected Methods for Analytical Atomic Soectroscopy*, Czech Spectroscopic Society, Praga, 1987;
 111. Hoenig M., Vanderstappen R., *Analusis*, **6**, 312, 1978;
 112. Koplik R., Curdova E., Suchanek M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **36** (3-4), 449, 1998;
 113. Falandysz J., Bona H., Danisiewicz D., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **119**, 222, 1994;
 114. Falandysz J., Kotecka W., Bona H., *Bromatol. Chem. Toksykol*, **26**, 97, 1993;
-

-
115. Falandysz J., Kotecka W., Bona H., *Bromatol. Chem. Toksykol.*, **26**, 101, 1993;
116. Wu X.-d., He H.-j., Xue Y., *Gungpuxue Yu Guangpu Fenxi*, **14** (3), 67, 1994;
117. Hoenig M., Van Heoyweghen P., *Anal. Chem.*, **58**, 2614, 1986;
118. Hoenig M., Regnier P., Wollast R., *J. Anal. At. Spectrom.*, **4**, 631, 1989;
119. Zhang D.-Q., Li C.-M., Yang L.-I., Sun H.-W., *J. Anal. At. Spectrom.*, **13**, 1219, 1998;
120. Ozdemir Y., Gucer S., *Food Chem.*, **61**, 313, 1998;
121. Buliński R., Błoniarz J., *Bromatol. Chem. Toksykol.*, **31**, 39, 1998;
122. Balaji T., Chiranjeevi P., Naidu G.R.K., *Anal. Lett.*, **31**, 1081, 1998;
123. Kojima I., Katsuzaki M., *Anal. Sci.*, **13**, 1021, 1997;
124. Alvarado J., Cristiano A.R., Curtis A., *J. Anal. At. Spectrom.*, **10**, 483, 1995;
125. Takuwa D.T., Sawula G., Wibetoe G., Lund W., *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**, 849, 1997;
126. Amoedo L., Capelo J.L., Lavilla I., Bendicho C., *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**, 1221, 1999;
127. Gottelt U., Henrion G., Kalaehne R., Stoyke M., *Nahrung*, **41**, 53, 1997;
128. Walcerz M., Garboś S., Bulska E., Hulanicki A., Fresenius, **350**, 662, 1994;
129. Kovacs B., Daniel P., Gyori Z., Loch J., Prokisch J., *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **29**, 2035, 1998;
130. Sah R.N., Brown P.H., *Plant Soil*, **193**, 15, 1997;
131. Minger A., Krahebuhl U., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **28**, 51, 1997;
132. Masson P., Esvan J.M., *Analisis*, **23** (9), 437, 1995;
133. Tao S., Kumamaru T., *J. AOAC Int.*, **78**, 1134, 1995;
134. Pless A.M., Croslyn A., Gordon M.J., Smith B.W., Winefordner J.D., *Talanta*, **44**, 39, 1997;
135. Masson P., *Spectrochim. Acta, Part B*, **54**, 603, 1999;
136. Violante N., Petrucci F., Femmine P.D., Caroli S., *Microchem. J.*, **59**, 269, 1998;
137. Leopold I., Gunther D., Neumann D., *Analysis*, **26**, M28, 1998;
138. Koplik R., Mestek O., Fingerova H., Suchanek M., *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**, 241, 1999;
139. Krochackowa T., Gora R., Kandrak J., Hutta M., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **229**, 61, 1998;
140. Zhang L.-S., Combs S.M., *J. AOAC Int.*, **81**, 1060, 1998;
141. Hoffmam E., Lüdke C., Scholze H., Stephanowitz H., *materialy konferencyjne*, Winter Conference on Plasma Spektrochemistry, 8-13 stycznia 1996, Fort Lauderdale, USA;
142. Minamisawa H., Tatehaba Y., Arai N., Okutani T., *Anal. Sci.*, **12**, 947, 1996;
143. Alteyrac J., Augagneur S., Medina B., Vivas N., Glories Y., *Analisis*, **23** (10), 523, 1995;
144. Galbacs G., Vanhaecke F., Moens L., Dams R., *Microchem. J.*, **54**, 272, 1996;
-

-
145. Andrasi E., Szoboszlai N., Igaz S., Toth K., *Mikrochem. J.*, **58** (3), 262, 1998;
146. Hou X.L., Li C.S., Ding W.J., Qian Q.F., Chai C.F., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **360** (3-4), 423, 1998;
147. Damsgaard E., Heydorn K., *Sci. Total Environ.*, **176**, 93, 1995;
148. Cesaro R., Castellano A., Ceuvas A.M., *X-Ray Spectrom.*, **27**, 257, 1998;
149. Rautio P., Huttunen S., Lamppu J., *Chemosphere*, **37**, 271, 1998;
150. Richardson D.H.S., Shore M., Hartree ., Richardson R.M., *Sci. Total Environ.*, **176**, 97, 1995;
151. Schmeling M., Alt F., Klockenkaemper R., Klockov D., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **357** (8), 1042, 1997;
152. Calliari I., Caniglia G., Nardi S., Tollardo A.M., *X-Ray Spectrom.*, **24** (3), 143, 1995;
153. Boman J., Larsson C., Olsson M., Raitio H., *X-Ray Spectrom.*, **25** (2), 89, 1996;
154. Н. В. Луккиа, *Лесоводение*, **1-2**, 41, 1996;
155. Smith C.M.M., Robbin N., Littlejohn D., *J. Anal. At. Spektrom.*, **8**, 989, 1993;
156. Chakraborti D., Burguera M., Burguera J.L., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **347**, 233, 1993;
157. A. Wytenbach, S. Bajo, V. Furrer, M. Langenauer, L. Tobler, *Water, Air and Soil Pollution*, **94**, 417, 1997;
158. Doerfel K., „Statystyka dla chemików analityków”, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1989;
159. Czermański J.B., Iwasiewicz A., Paszek Z., Sikorski A., „Metody statystyczne dla chemików”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1992;
160. Łomnicki A., „Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999;
161. Cleophas T.J.M., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **50**, 1, 1996;
162. Rieger N.A., Sarre R.G., Saccone G.T.P., Schloithe A.C., Wattchow D.A., *Int. J. Colorect. Dis.*, **12**, 303, 1997;
163. Moon Ch.-S., Zhang Z.-W., Shimbo S., Watanabe T., Moon D.-H., Lee Ch.-U., Lee B.-K., Ahn K.-D., Lee S.-H., Ikeda M., *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **71**, 251, 1998;
164. Boscolo P., Di Gioacchino M., Sabbioni E., Benvenuti F., Conti P., Reale M., Bavazzano P., Giuliano G., *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **72**, 26, 1999;
165. Klein D., Michaelson S., Sato S., Luz A., Stampfl A., Summer K.H., *Arch. Toxicol.*, **71**, 340, 1997;
166. Burger J., Gochfeld M., Rooney A.A., Orlando E.F., Woodward A.R., Guillette L.J. Jr., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **38**, 501, 2000;
-

-
167. Samecka-Cymerman A., Marczonek A., Kempers A.J., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **33**, 162, 1997;
168. Oughton D.H., Salbu B., Riise G, Lien H., Østby G., Nøren A., *Analyst*, **117**, 481, 1992;
169. Evans E.J., Dekker A.J., *Can. J. Soil Sci.*, **49**, 349, 1969;
170. Gupta S.K., Aten C., *J. Environ. Anal. Chem.*, **51**, 25, 1993;
171. Novozamsky I., Lexmond T.M., Houba V.J.G., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **51**, 47, 1993;
172. Watmough S.A., Dicinson N.M., *Environ. Pollut.*, **90**, 135, 1995;
173. Györi Z., Goulding K., Blake L., Prokisch J., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **354**, 699, 1996;
174. Kheboian C., Bauer CF. *Anal. Chem.*, **59**, 1417, 1987;
175. Whitworth D.-J., Achtenberg E.P., Herzl V., Nimmo M., Gledhill M., Worsfold P.J., *Anal. Chim. Acta*, **392**, 3, 1999;
176. Lindsay W.L., Norvell W.A., *Soil Sci. Oc. Am. Proc.*, **22**, 129, 1978;
177. McLaren R.G., Crawford D.V., *J. Soil Sci.*, **24**, 172, 1973;
178. Ure A.M., Quevauviller P., Muntau H., Griepink B., *Intrn. J. Anal. Chem.*, **51**, 135, 1993
179. Evans E.J., Dekker A.J., *Can. J. Soil Sci.*, **49**, 349, 1969;
180. Schnug E., Fleckenstein J., Haneklaus S., *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **29**, 1891, 1998;
181. Csikkel-Szolnoki A., Kiss S.A. Veres S., *Magnesium Res.*, **7**, 73, 1994;
182. Russo V.M., Karmarkar S.V., *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **29**, 245, 1998;
183. Borkowska-Burnecka J., *Fres. J. Anal. Chem.*, **368**, 633, 2000;
184. Fitch A., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **28** (3), 267, 1998;
185. Zhou C.Y., Wong M.K., Koh L.L., Wee Y.C., *Talanta*, **43**, 1061, 1996;
186. Krachler M., Emons H., *Fres. J. Anal. Chem.*, **368**, 702, 2000
187. Wieteska E., Ziólek A., Drzewińska A., *Anal. Chim. Acta*, **330**, 251, 1996;
188. Wieteska E., Ziólek A., Drzewińska A., *Chem. Anal. (Warsaw)*, **42**, 837, 1997;
189. Chow P.Y.T., Chua T.H., Tang K.F., Ow B.Y., *Analyst*, **120**, 1221, 1995;
190. Asp T.N., Lund W., *Talanta*, **39**, 563, 1992;
191. Niazi S.B., Littlejohn D., Halls D.J., *Analyst*, **118**, 821, 1993;
192. Nyomora A.M.S., Sah R.N., Brown P.H., Miller R.O., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **357**, 1185, 1997;
193. Zhou Ch.Y., Wong M.K., Koh L.L., Wee Y.Ch., *JAAS*, **11**, 585, 1996;
194. Minocha R., Shortle W.C., *Can. J. For. Res.*, **23**, 1645, 1993;
195. Ahlgren M., Kontkanen A., Vattulainen K., Vehvilainen H., *Analyst*, **113**, 285, 1988;
196. Sahayam A.C., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **362** (3), 285, 1998;
197. El Azouzi H., Cervera M.L., de la Guardia M., *J. Anal. At. Spectrom.*, **13**, 533, 1998;
-

-
198. Lavilla I., Capelo J.L., Bendicho C., *Fres. J. Anal. Chem.*, **363**, 283, 1999;
 199. Amoedo L., Capelo J.L., Lavilla I., Bendicho C., *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**, 1221, 1999;
 200. Minami H., Honjyo T., Atsuya I., *Spectrochim. Acta B*, **51**, 211, 1996;
 201. Tessier, A., Campbell, P. G. C. i Bisson, M., *Anal. Chem.*, **51** (7), 844, 1979;
 202. Davidson C.M., Thomas R.P., Mc Vey S.E., Perala R., Litteljohn D., Ure A.M., *Anal. Chimica. Acta*, **219**, 277, 1994;
 203. Pérez-Cid B., Lavilla I., Bendicho C., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **73**, 79, 1999;
 204. Fiedler H.D., López-Sánchez J.F., Rubio R., Rauert G., Quevauviller Ph., Ure A.M., Muntau H., *Analyst*, **119**, 1109, 1994;
 205. Wang J., Ashley K., Kennedy E.R., Neumeister Ch., *Analyst*, **122**, 1307, 1997;
 206. Xiao-Quan S., Bin Ch., *Anal. Chem.*, **65**, 802, 1993;
 207. Hall G. E. M., Gauthier G., Pelchat J.-C., Pelchat P., Vaive J.E., *J. Anal. At. Spektrom.*, **11**, 787, 1996;
 208. Barona A., Romero F., *Water, Air and Soil Pollution*, **95**, 59, 1997;
 209. Davidson C.M., Ferreira P.C.S., Ure A.M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **363**, 446, 1999;
 210. Rauert G., López-Sánchez J.F., Sahuquillo A., Rubio R., Davidson C.M., Ure A.M., Quevauviller Ph., *J. Environ. Monit.*, **1**, 57, 1999;
 211. Marin B., Valladon M., Polve M., Monaco A., *Anal. Chimica. Acta*, **342**, 91, 1997;
 212. Belazi A.U., Davidson Ch. M., Keating G.E., Littlejohn D., *J. Anal. At. Spektrom.*, **10**, 233, 1995;
 213. Whalley C., Grant A., *Anal. Chimica. Acta*, **291**, 287, 1994;
 214. Sahuquillo A., López-Sánchez J.F., Rubio R., Rauert G., Thomas R.P., Davidson C.M., Ure A.M., *Anal. Chimica. Acta*, **382**, 317, 1999;
 215. Ruban V., López-Sánchez J.F., Pardo P., Rauret G., Muntau H., Quevauviller Ph., *J. Environ. Monit.*, **1**, 51, 1999;
 216. Mester Z., Cremisini C., Ghiara E., Morabito R., *Anal. Chimica. Acta*, **359**, 133, 1998;
 217. Pardo P., López-Sánchez J.F., Rauert G., *Anal. Chimica. Acta*, **376**, 183, 1998;
 218. Pérez-Cid B., Lavilla I., Bendicho C., *Anal. Chimica. Acta*, **378**, 201, 1999;
 219. Zufiaurre R., Olivar A., Chamorro P., Nerin C., Callizo A., *Analyst*, **123**, 255, 1998;
 220. Polyák K., Bódog I., Halavay J., *Talanta*, **41**, 1151, 1994;
 221. Fawaris B.H., Johason K.J. *J. Sci. Total Environ.*, **170**, 221, 1995;
 222. Florian D., Barnes R.M., Knapp G., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **362**, 558, 1998;
 223. Gulmini M., Ostacoli G., Zelano V., Torazzo A., *Analyst*, **119**, 2075, 1994;
 224. Campos E., Barahona E., Lachica M., Mingorance M.D., *Anal. Chimica. Acta*, **369**, 235, 1998;
-

225. Pérez-Cid B., Lavilla I., Bendicho C., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **363**, 667, 1999;
226. Pérez-Cid B., Lavilla I., Bendicho C., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **73**, 79, 1999;
227. Pérez-Cid B., Lavilla I., Bendicho C., *Anal. Chimica. Acta*, **360**, 35, 1998.
228. Hoenig M., Baeten H., Vanhentenrijk S., Vassileva E., Quevauviller Ph., *Anal. Chim. Acta*, **358**, 85, 1998;
229. Burden T.J., Powell J.J., Thompson R.P., *J. Anal. At. Spektrom.*, **10**, 259, 1995;
230. Recknagel S., Rösich U., Brätter P., *J. Anal. At. Spektrom.*, **9**, 1293, 1994;
231. Helrich K., *Official Methods of Analysis*, 15th Edition 1990, Arlington, Virginia, USA (i uzupełnieniu);
232. Griepink B., Maier E.A., Muntau H., *The certification of the content of Al, Ca, Mg, Mn, Zn, N, P, S and Cl in spruce needles (CRM 101)*, Bruksela 1990;
233. Ottesen R.T., Almklov P.G., Tijhuis L., *Inhold av tungmetaller og organiske miljøgifter i overflatejord fra Trondheim*, Raport nr TM 95/06;

