

Nyomelem speciáció oldószer mentes mikroextrakciós módszerekkel

1. Az összes krómtartalom meghatározására tengervízből izotóp hígításos nagyfelbontású induktív csatolású plazma-ionizációs tömegspektrometriás módszert dolgoztunk ki, melynél a mintabevitelt GC elválasztás után közvetlenül oldottuk meg TFAs derivatizációval. A minták összes krómtartalmát Cr III-á redukáltuk kéndioxiddal telített oldattal, majd tetrakis-acetil-acetonnal illékony Cr vegyületet derivatizáltunk. A derivatizált illékony króm vegyületet vagy hexánnal extraháltuk vagy szilárd fázisú mikroextrakciós módszert dolgoztunk ki, melynél palydimetilsziloxánnal bevont szilícium alapú tűn akkumuláltuk a minta Cr tartalmát. A tömegspektrometrián megfelelő elválasztáshoz közepes felbontást kellett alkalmazni, melynél az argid, az argon klorid és argon oxid zavaró hatását kiküszöbölhettük. Ezzel a módszerrel is kielégítő precizitást értünk el hiteles anyagminták visszamérésével, azonban az SPME technika alkalmazásával, melynél oldószer mentes közegben lehet dolgozni, nincs szükség a tömegspektrométer nagy felbontóképességére, tehát jóval határozottabb jel/zaj viszony érhető el. A kidolgozott technikáknál a módszerek kimutatási képessége a pg/ml tartományt éri el.
2. A módszert továbbfejlesztve összevetettük a határfokokat ECD EI-MS és ICP-MS detektálásnál. A kelátképződést minden esetben egyszerű vizes közegben végeztük. Az akkumulálás szempontjából alapvető SPME kinetikát headspace és folyadék fázis során hasonlítottuk össze, optimalva az extrakció időtartamát és megállapítva a lineáris tartományt. A kvantitatív analitika szempontjából alapvető derivatizációs folyamatot optimaltunk és határértékeket szabtuk meg. Megállapítottuk mely körülmények között szabályos a telítési görbe. Három, a feladat szempontjából összevethető detektálási technikát alkalmaztunk és hasonlítottunk össze kritikailag. Hiteles anyagmintát alkalmazva összevetettük a detektorokat, megállapítva, hogy a kidolgozott technika multielemes alkalmazása is lehetséges.
3. Megállapítottuk, hogy a metilhigany és etilhigany vegyületek eltérően viselkednek mikrohullámú besugárzás hatására, mely nagy mértékben befolyásolhatja a speciációs meghatározásukat. Az analitikai módszer kidolgozására egy egyszerű, viszonylag kis költségigényű, a GC-MS vagy ICP-MS műszeregyütteseknél jóval olcsóbb műszercsaládot építettünk ki, mely az alábbi alapvető részekből áll: egyszerű és olcsó SPME szál, bármilyen rutin feladatra alkalmazható GC, fűtő kemence illetve egy átfolyó küvettás nagyintenzitású higany lámpával ellátott atomfluoreszcens detektor (szűrős optika a 253.7 nm környékén lévő áteresztéssel) elegendő. A vizes metilhigany és etilhigany mintákat nártium tetraphenil boráttal derivatizáltuk. A minták elroncsolására az utóbbi időkben széles körben alkalmazott mikrohullámú roncsolót használtuk, melynek energia tartománya 20-160 W, míg időtartománya 2-10 percig terjed. A kísérletek során egyértelműen megállapítható volt, hogy a két vizsgált higany speciesz eltérően viselkedik a besugárzás hatására. Gyakorlatilag nem volt tapasztalható mérhető degradáció metil higany 120 W-os 8 perces illetve 160W-os 4 perces roncsolása alatt, míg etil higany esetén már 40W 2 perces alkalmazásnál instabilitások léptek fel. A

tapasztalatokat a C-Hg kötések eltérése igazolja. Nyilvánvaló, hogy a besugárzás sok egyéb paramétere (edényméret, oldószer, távolságok, stb.), további vizsgálatra szorul, az azonban már az eddigi kutatásokból is nyilvánvaló, hogy a módszer egy oldalról kiválóan megoldja a mintaelőkészítés kényes műveletét specieszelemzés előtt, más oldalról a megfelelő mátrixoknál és paramétereknél a specieszstabilitás tanulmányozandó.

4. Lúgos feltárás és fenilezési reakció kidolgozásával SPME-GC-AFS módszert dolgoztunk ki halminták higany-specieszeinek meghatározására.

A szilárd fázisú mikroextrakciót számos mikroelem meghatározásakor használják, mint gyors és szerves oldószerektől mentes mintaelőkészítési technikát. Ehhez az eljáráshoz illékonyra kell tenni a meghatározandó komponenszt. Az illékonyosság növelésének hagyományos módszere a Grignard-reakción alapult, ma már azonban inkább a vizes fázisban lejátszódó alkilezési (etilezés, fenilezés vagy propilezés) reakciókat részesítik előnyben. Szerves higany származékok mérése során háromféleképpen szokták előkészíteni a mintát: savas feltárással, lúgos feltárással vagy desztillációval. Mivel az élő szervezetek jól akkumulálják a metil-higanyt, sokan mérték már a tengeri halak, kagylók higany tartalmát, hiszen sok helyen ez az emberek fő tápláléka. Ezekben az élőlényekben a higany 90%-ban metil-higanyként van jelen és szárazanyagra vetített koncentrációja 50-500 ng/g között van.

Munkánk célja elsősorban az volt, hogy bizonyítsuk, az SPME-GC-AFS rendszerünk alkalmas a gyakorlati élet szempontjából fontos kis higany tartalmú élelmiszerminták metil-higany tartalmának meghatározására. Mindezek mellett hazánkban az édesvízi halfogyasztás is jelentős, és mivel egy édesvízi ökoszisztéma teljesen más mint egy tengeri, környezetvédelmi és egészségvédelmi szempontból fontosnak találtuk az itt élő szervezetek vizsgálatát.

A haltartalmú élelmiszermintákat OT-SAFE-QLK1-CT 2001-01437 számú Project keretében gyűjtöttük össze. Magyarországon 2000-ben statisztikai adatok szerint a három legnagyobb mennyiségben fogyasztott tengeri halból készített termékeket vizsgáltuk. A kiskereskedelmi láncolat 97%-át lefedő cégek kínálatából vettünk reprezentatív mintát, 5-8kg halat vásároltunk a beszállítóktól. Az argentin hekk (Merluccius hubbis) minta fagyasztott haltörzsként, a lengyel hering (Clupea harengus) ecetes pácban vagy paradicsomos illetve olajos konzervként, a thaiföldi szardínia (Clupea pilchardus) pedig olajos és paradicsomos konzervként van forgalomban. Forgóképes homogenizátorral homogenizáltuk, majd liofileztük mintáinkat. Az általunk vizsgált Afrikai harcsák a Tiszántúlról származnak. Füzesgyarmaton és Szarvason termál illetve recirkulációs vizekben tenyésztett halakról van szó, valamint Tukáról származó harcsa is van mintáink között. Élőhelyenként 10-10 halat vizsgáltunk, melyeket tisztítás és darabolás után liofilizáltunk, majd homogenizáltunk.

A mintaelőkészítés során 25%-os KOH-ot tartalmazó metanollal [5,8,12], illetve 17.6%-os NaOH-ot tartalmazó metanollal 3 órán át 75°C-on ultrahangos kezelésnek vetettük alá mintáinkat. A roncsolmányban a mérendő komponens MeHg⁺ ionként van jelen, mely ilyen formában nem alkalmas gázkromatográfiás elválasztásra. Származékképző reagensként nátrium-tetrafenil-borát (NaBPh₄) 1%-os oldatát használtuk, mely fenilezi a MeHg⁺ iont illékony MeHgPh molekulává. A derivatizációs reakcióhoz szükséges optimális kémhatást pH=5-ös Na-acetát puffer biztosította. A mérés megkezdéséig az így előkészített mintákat fénytől elzárva hűtőben tároltuk.

Ismert tény, hogy szilárd fázisú mikroextrakciós eljárás során egy kettős egyensúlyi rendszerrel van dolgunk. A mérendő komponens szempontjából egyensúlynak kell lennie az oldat és a gőzfázis között, valamint a gőzfázis és az SPME szál adszorpciós felülete között headspace módon történő mintavétel esetén.

Ezen egyensúlyi rendszer létrejöttéhez szükséges időt vizsgáltuk meg vizes standard oldatok esetén, mind oldatfázisból, mind gőztérből történő mintavétellel. Az eredményeket azt mutatják, hogy metil-fenil-higany esetén 10 perces extrakcióval mindkét mintavétel esetén elérjük a telítési szakaszt, tehát ez az idő az extrakció optimális idejének tekinthető. Hasonló az eredmény difenil-higany esetében is amennyiben oldatfázisból veszünk mintát, headspace mintavétel esetén azonban az alkalmazott körülmények között Ph₂Hg nem detektálható.

Megvizsgáltuk továbbá, hogy mennyi extrakciós idő szükséges ahhoz, hogy az alkalmazott paraméterek mellett a difenil-higany megjelenjen a gőztérben is. Azt találtuk, hogy az alkalmazott koncentráció tartományban 120 perc szükséges, hogy ezen komponens detektálható legyen gőztérben.

A mintaelőkészítés során használt lúgos metanolos közeg miatt a későbbi hígítási faktor függvényében eltérő az SPME-re előkészített oldatok metanol tartalma. Megvizsgáltuk a metanol tartalom hatását a jelintenzitásra. A metanol tartalom növekedésével exponenciálisan csökkent az intenzitás, 10% metanol tartalom esetén 4.5-szer kisebb jelet kapunk mint amikor oldatunk metilalkohol tartalma csak 1%-os volt. Vizsgálatokat végeztünk, melynél tanulmányoztuk a pH hatását a derivatizációs reakcióra

Ezen kísérlet során MeHgCl standard oldatot vittünk derivatizációs reakcióba NaBPh₄ reagenssel különböző pH-jú közegben és mértük a jelintenzitást. Az eredményeken jól látszik, hogy pH=4-5 az optimális kémhatás a fenilezési reakció szempontjából.

Módszerünket BCR 464- és TORT-2 CRM minták, valamint T34 LRM minta metil-higany tartalmának mérésével validáltuk. Az eredményeket az 1.táblázat tartalmazza.

Minta	Hitelesített MeHg konc. (µg/g)	Mért MeHg konc. (µg/g)
BCR 464	5.50 ± 0.17	4.73 ± 0.11
TORT-2	0.163 ± 0.013	0.157 ± 0.005

T34

0.117 ± 0.014

0.105 ± 0.004

1.táblázat. A validálás során mért MeHg-koncentrációk. A mintaelőkészítés során enzimes fehérjebontást is alkalmaztunk

A BCR 464 és a TORT-2 CRM minták, valamint a T34 LRM minta esetén rendre 86%-, 89%- és 77%-os kinyerési hatásfokot értünk el a validálás során. Az utóbbi két minta esetén sikerült 90%- illetve 96%-ban kinyerni a vizsgált komponenst, amikor a lúgos roncsolás előtt enzimesen elbontottuk a mátrix fehérjéit.

Az általunk megmért halminták metil-higany tartalma $0.060-0.200\mu\text{g/g}$ között volt. Összehasonlítva ezeket az értékeket a totál higany koncentrációkkal megállapíthatjuk, hogy hasonlóan a tengeri halakhoz az édesvízi halak higany-tartalma is 85-90%-ban metil-higany formában van jelen.

Kijelenthetjük, hogy rendszerünk alkalmas a gyakorlati analitika szempontjából és egészségvédelmi szempontból fontos koncentráció tartományban megbízhatóan metil-higany koncentrációt mérni.