

Doktori értekezés PhD fokozat elnyerésére



A HIGANYSPECIÁCIÓ LEHETŐSÉGEI

Jelölt : Jókainé Szatura Zsuzsanna

Témavezető : Dr. Fodor Péter

Készült :

Budapest Corvinus Egyetem

Alkalmazott Kémia Tanszék

Budapest, 2007

A doktori iskola

megnevezése : Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága : Élelmiszertudományok

Vezetője : Dr. Fodor Péter,
Tanszékvezető egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem

Témavezető : Dr. Fodor Péter
Tanszékvezető egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar,
Alkalmazott Kémia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

Az Iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása :

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2007. október 2-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi Bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG :

Elnöke

Biacs Péter, DSc

Tagjai

Hoschke Ágoston, CSc

Posta József, DSc

Borszéki János, CSc

Opponensek

Heltai György, CSc

Bartha András, PhD

Titkár

Hegedűs Attila, PhD

Édesapámnak nagy szeretettel....

***„Tum diu discendum est, quam divu vivas.”
(Seneca)***

„Míg élsz, egyre tanulj és soha abba ne hagyd.”

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	11
2. CÉLKITŰZÉSEK	15
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	17
3.1 A HIGANY	17
3.1.1 Általános fizikai és kémiai tulajdonságok.....	17
3.1.2 A higany története	18
3.1.3 A higany és a környezet	21
3.1.3.1 A higany előfordulása a környezetben	21
3.1.3.2 Globális higany-körforgás	22
3.1.3.3 Fontosabb szennyező források	24
3.1.4 A higanyvegyületek élettani hatása	28
3.1.4.1 Általános toxikológiai jellemzők.....	28
3.1.4.2 Az elemi higany és a szervetlen higany komponensek	30
3.1.4.3 Szerves higanyvegyületek	31
3.1.4.3.1 Metil-higany.....	31
3.1.4.3.2 Etil-higany	32
3.1.5 A higanytartalomra vonatkozó előírások.....	32
3.1.6 Halfogyasztás Európában és Magyarországon.....	34
3.2 A HIGANYMÓDOSULATOK ANALITIKAI MEGHATÁROZÁSA	36
3.2.1 Mintavétel.....	36
3.2.2 Minták tárolása, módosulatok stabilitása	36
3.2.3 Mintaelőkészítés összes higany mérése esetén.....	38
3.2.4 Mintaelőkészítés higanyspeciációs analízis során.....	39
3.2.4.1 Feltárás	39
3.2.4.2 Extrakciós eljárások.....	43
3.2.4.2.1 Oldószeres extrakció.....	43
3.2.4.2.2 Szilárd fázisú mikroextrakció	45
3.2.4.3 Származékképzés.....	48
3.2.5 Elválasztástechnika a higany módosulatanalitikában.....	52
3.2.6 Detektálás	55
3.3 MINŐSÉGBIZTOSÍTÁS A MÓDOSULATANALITIKÁBAN	58
3.3.1 Kalibrációs lehetőségek a higany módosulatanalitikában.....	59

3.3.2 Módszervalidálás	61
3.3.2.1 Hitelesített referenciaanyagok használata.....	61
3.3.2.2 Körelemzések.....	64
3.3.2.3 Teljes anyagmérleg készítése.....	65
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	67
4.1 MINTAELŐKÉSZÍTÉS HIGANYSPECIÁCIÓS ANALÍZISHEZ	67
4.1.1 Lúgos feltárást és SPME-t alkalmazó mintaelőkészítési eljárás.....	67
4.1.2 Savas hidrolízissel és oldószeres extrakcióval megvalósított mintaelőkészítés	68
4.2 A MÉRÉSEKHEZ HASZNÁLT VEGYSZEREK, STANDARDOK ÉS HITELES ANYAGMINTÁK.....	69
4.3 MINTÁK	70
4.4 A KÍSÉRLETEK SORÁN ALKALMAZOTT MŰSZEREK, BERENDEZÉSEK.....	72
4.4.1 Lúgos feltárás-SPME-GC-pirolízis-AFS módszer	72
4.4.2 Savas feltárás-oldószeres extrakció-GC-MS módszer	73
4.4.3 Összes higany meghatározás.....	74
4.5 A KÍSÉRLETEK HELYE	74
4.6 A MÉRÉSEK SORÁN BETARTOTT BIZTONSÁGI ÓVINTÉZKEDÉSEK	75
5. EREDMÉNYEK.....	77
5.1 LÚGOS HIDROLÍZIS-SPME-GC-PIROLÍZIS-AFS MÓDSZERFEJLESZTÉS.....	77
5.1.1 A gázkromatográfiás elválasztás optimalálása és az SPME kinetikájának vizsgálata	77
5.1.2 A fenilezési reakcióhoz szükséges optimális pH meghatározása	81
5.1.3 „Kis higanytartalmú” minták mérése során jelentkező nehézségek kiküszöbölése	82
5.1.3.1 Metanol tartalom hatása	82
5.1.3.2 A kálium hatása.....	83
5.1.4 A lúgos feltárás során alkalmazott ultrahangos kezelés időtartamának optimalálása	85
5.1.5 A módszer analitikai teljesítménye és validálása.....	86
5.2 A KIDOLGOZOTT MÓDSZER BIZONYTALANSÁGBECSLÉSE	87
5.2.1 A bizonytalansági források megnevezése, a számolások során alkalmazott törvényszerűségek, képletek ismertetése	87
5.2.2 A kísérletek menete, az eredmények és azok értékelése.....	91
5.3 A MÓDSZER MINŐSÉGBIZTOSÍTÁSA NEMZETKÖZI KÖRELEMZÉSEKBEN VALÓ RÉSZVÉTELLEL	96
5.3.1 CCQM-P39 és CCQM-P39.1 körelemzések.....	96
5.3.2 Minták	97

5.3.3 Eredmények	98
5.4 ÉLELMISZERMINTÁK METIL-HIGANY TARTALMÁNAK MEGHATÁROZÁSA	102
5.5 SÓSAVAS FELTÁRÁS-OLDÓSZERES EXTRAKCIÓ-GC-EI-MS MÓDSZER	107
5.5.1 Előzmények	107
5.5.2 A teljes anyagmérleg meghatározása	107
5.5.3 Etil-higany belső standarddal végzett vizsgálatok	112
5.6 A METIL-HIGANY ÉS AZ ETIL-HIGANY MÓDOSULATOK STABILITÁSÁNAK VIZSGÁLATA ..	114
5.6.1 Mikrohullámú feltárás lúgos-metanolos közegben	115
5.6.2 Mikrohullámú feltárás vizes közegben.....	119
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	123
7. ÖSSZEFOGLALÁS	125
8. SUMMARY	127
9. MELLÉKLETEK.....	129
IRODALOMJEGYZÉK	129

1. BEVEZETÉS

A higany történetének első lényeges fejezete az alkimisták ténykedéseire kapcsolódik. Szilárdan hittek benne, hogy ezen „anyagból” lehet legkönnyebben aranyat csinálni, vagy ahogy ők mondták : „a Merkur arannyá változik, ha sikerül szárnyait levagdalni” [Balázs 1996]

XV. század vége, szifiliszjárvány Európában. Az akkori felfogás szerint, a betegeket higanytartalmú balzsammal és higanygőzterápiával „gyógyították”.

1950-es évek, Minamata-öböl. Több száz ember halt meg metil-higannyal erősen szennyezett halak fogyasztása miatt. Ez az elhíresült eset, és egyéb higanymérgezéssel kapcsolatos sajnálatos események a XX. században végérvényesen megváltoztatták a higany megítélését. Korábbi gyógyítónak hitt hatásával ellentétben kifejezetten toxikus sajátossága vált ismertté. Az említett betegségek és halálesetek mindezen túlmenően még egy fontos dologra felhívták a figyelmet. Nevezetesen — és ez higany esetében mutatkozott meg először —, hogy ugyanazon elem eltérő oxidációs állapotú vagy eltérő ligandummal rendelkező formái különböző módon viselkedhetnek, különböző hatással lehetnek az élő szervezetekre. A higannyal nagyjából egyidőben folyó króm-élettani kutatások hasonló eredményeket hoztak, kiderítették, hogy a +6-os oxidációs állapotú formájának kiemelkedően rákkeltő jellege miatt toxikusnak tartott elem +3 oxidációs számú formája esszenciális, vagy évekkel később az arzén, mint „mérgező elem” egyik szerves formájáról, az arzenobetainról kiderült, hogy bizonyítottan nincs toxikus élettani hatása.

Mindezen kutatások igazolták, hogy egy elem összes koncentrációjának a meghatározása már nem nyújt elegendő információt az adott mintáról. Kialakult tehát az analitikai kémia egy viszonylag fiatal ága, a speciációs analitika, melynek célja és feladata az elemek különböző molekuláris formáinak, módosulatainak szelektív meghatározása.

Ma úgy tudjuk, hogy a higany eddig ismert összes létező formája mérgező az élő szervezetek számára, mégis elengedhetetlenül fontos az egyes módosulatok szelektív meghatározása, toxicitásbeli különbözőségük miatt.

A higany körforgásának, a természetben előforduló biotikus és abiotikus folyamatoknak a tanulmányozása, vagy a higanyvegyületek élettani hatása, különös tekintettel a humán metabolikus folyamatokra, mind a mai napig fontos és aktuális kérdései a biokémiai, élettani, orvosi, farmakológiai kutatásoknak.

A higannyal kapcsolatos speciációs kutatások egyik fontos területét azon toxikológiai vizsgálatok képviselik, melyek a higany különböző formáinak jelenlétét határozzák meg az

élelmiszerekben. Ezen kutatások szinte mindegyikében tengeri halakban és emberi fogyasztásra alkalmas más tengeri élőlényekben határozzák meg és mérik az előforduló higany módosulatok mennyiségét. Ennek egyik oka az a biometilációs folyamatsorozat, mely a vízi ökoszisztémákra jellemző, és melynek eredményeképpen a tápláléklánc tagjai — kezdve a planktonoktól, a növényevő halakon át egészen a ragadozó halakig — egyre növekvő koncentrációban tartalmazzák az élő szervezetek számára leginkább mérgező metilezett módosulatot. Másrészt ezen kutatások azért fontosak, mert éppen az előzőekből következően az emberi szervezetbe bejutó higany (metil-higany) 80-90%-ban táplálékeredetű, és a lakosság halfogyasztásával hozható összefüggésbe.

A témában megjelent több száz publikáció, mérési eredmény, valamint táplálkozási szokásokat elemző felmérés ellenére a nagy nemzetközi szervezeteknek, de még az Európai Uniónak sincs egységes állásfoglalása az emberek táplálkozásból eredő higany kitettségéről, arról a minimálisan elfogyasztott mennyiségről, ami már káros hatásokhoz vezethet. Tovább bonyolítja a kérdést, hogy más-más „toxicitási definícióval”, illetve határértékkel találkozhatunk az amerikai kontinensen és az Európai Unióban. Mindezek ellenére azonban főleg a múltbeli balesetek miatt az Európai Bizottság törvényileg [EC 221/2002] szabályozta az egyes élelmiszerekben és az ivóvízben megengedhető maximális higany koncentrációt. A szabályozás összes higany tartalomra vonatkozik, külön metil-higany koncentrációt nem említ a törvény.

A higany módosulatanalitika legnagyobb kihívását a minták igen kis higany koncentrációja jelenti. Olyan módosulatanalitikára alkalmas rendszereket kell tehát építeni, melyek érzékenysége és szelektivitása megfelel az adott feladat elvárásainak. Ugyanakkor az analitikai rendszerek és módszerek utóbbi években tapasztalható nagyléptékű fejlődése, a higany módosulatanalitikában kevésbé érvényesül. Vannak ugyan tömegspektrometriás újítások, a témával foglalkozó szakemberek nagy hányada azonban — kihasználva a higany azon tulajdonságát, hogy gőzfázisban stabilis szabad atomok formájában van jelen — még mindig hideggőzös atomspektroszkópiai eljárásokkal dolgozik. A gázfázisú, szabad atomok formájában történő, ezáltal nagy hatásfokú mintabevitel, valamint az atomfluoreszcens és atomabszorpció detektálás kiemelten szelektív jellege és nagy érzékenysége lehetővé teszi igen kis koncentrációtartományok megbízható mérését.

Léteznek ugyan kromatográfia nélküli higanyspeciációs technikák, az alkalmazott módszerek nagy részében mégis kromatográfiás egységből és higanyspecifikus detektorból álló kapcsolt rendszerekkel dolgoznak. Fontos hangsúlyozni, hogy mivel a természetben és főleg a biológiai mintákban gyakorlatilag csupán három esetleg négy módosulata létezik a

higanynak, elválasztástechnikai szempontból egyszerűbb helyzetben van az analitikus, mint mondjuk arzénmódosulatok mérése esetén.

A higany módosulatanalitikai eljárások csaknem 90%-ban gázkromatográfiás elválasztást alkalmaznak előzetes származékképzési reakciót követően. A sokféle derivatizációs megoldás közül a vizes fázisú, „in situ” alkalmazható alkilezési, arilezési reakciók utóbbi években történő térnyerését nem lehet vitatni. Ennek oka egyrészt a reakció egyszerű kivitelezhetősége, másrészt az, hogy alkalmazásával minden eddig vizsgált higany módosulattól nagy hatásokkal képezhetők viszonylag stabilis illékony apoláris molekulák.

A higanyval kapcsolatos speciációs feladatok megoldása során, a legnagyobb feladatot a komponensek kinyerése jelenti a mintákból. A különböző feltárási technikák hatásfoka, illetve az adott feladathoz való alkalmazhatósága napjaink erősen vitatott kérdése. Soktényezős problémával állunk szemben, igen kis mennyiségben jelen lévő higanykomponenseket kell kinyerni minél nagyobb hatásokkal az adott mintából, miközben egyes specieszek stabilitása igen kérdéses.

Végül szót kell még ejteni a mérések minőségbiztosításáról. A már létező és egyre szélesebb körű igényeket kielégítő speciációs technikák minőségbiztosítása aktuális, sürgető kérdés. Sok életbevágóan fontos döntés függ az analitikai adatok megbízhatóságától, így a speciációs eredmények megbízhatóságától is. A higany módosulatanalitikában alkalmazott metodikák többféle technikát ötvöznek. A feltárástól, az extrakción, a derivatizáción és az elválasztástechnikán keresztül az elemszelektív detektálásig. Ezeket a lépéseket egytől-egyig hibák terhelik, amik adódhatnak a kémiai módosulatok instabilitásából, az egyes folyamatok adott körülmények közti hatásfokából, nem kívánt mellékreakciók bekövetkeztéből, a mintamátrixból, vagy magából az analitikusból.

Napjainkban számos megoldás áll az analitikusok rendelkezésére méréseik minőségbiztosításának elvégzésére. Hitelesített anyagminták mérése, a módszer teljesítményjelzőinek meghatározása és folyamatos monitorozása, a standard oldatok stabilitásának ellenőrzése elengedhetetlenül fontos. Esetenként nemzetközi körelemzésekben történő részvétellel, anyagmérleg felállításával bizonyosodhatunk meg módszerünk helyességéről.

Dolgozatom készítése során alapvető célom volt, hogy amennyire a lehetőségek engedik részletes irodalmi áttekintést adjak a higanyról, kémiájáról, természetbeli előfordulásáról, élettani hatásáról, analitikájáról, hiszen e témában magyar nyelvű irodalom nem igen van. Ez az oka annak, hogy a disszertáció „Irodalmi áttekintés” című fejezete kicsit nagyobb terjedelmű a megszokottnál.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során élelmiszerminták és biológiai minták higanyspeciációs analízisével foglalkoztam. A témával kapcsolatban az alábbi célkitűzéseket fogalmaztam meg:

- Kifejleszteni egy gyors és viszonylag olcsó módszert, mellyel lehetővé válik élelmiszerminták metil-higany tartalmának rutinszerű meghatározása.
 - A feltárás időszükségletét csökkentő, hatékonyságát növelő eljárások vizsgálata.
 - Az alkalmazott származékképző reakció (fenilezés) optimális körülményeinek meghatározása, a származékok illékonyságának vizsgálata.
 - Az alkalmazott szilárd fázisú mikroextrakció kinetikájának vizsgálata.
 - Valódi (kis higanytartalmú) minták elemzése során felmerülő nehézségek kezelése és kiküszöbölése.
- A módszer minőségbiztosítása kapcsán elvégezni a fejlesztett módszer egészére kiterjedő bizonytalanságbecslést, feltárni a módszer ún. „gyenge pontjait”, meghatározni azokat a lépéseket, melyek legnagyobb mértékben járulnak hozzá eredményeim reprodukálhatóságához.
- A kidolgozott módszer minőségének ellenőrzése és minőségbiztosítása két nemzetközi körelemzésben való részvétellel is.
- A módszer alkalmazása élelmiszerminták metil-higany tartalmának meghatározására :
 - Magyarországon kereskedelmi forgalomban lévő, a magyar piac 97%-át lefedő, három legnagyobb mennyiségben fogyasztott tengeri hal tartalmú élelmiszer minta analízise.
 - Kereskedelembe kapható különböző eredetű tengeri halak illetve haltartalmú termékek vizsgálata.
 - Hazai tenyésztett halak higanyspeciációs analízise.
- Az előbbiektől független analitikai módszer alkalmazása, illetve minőségbiztosítása teljes anyagmérleg készítésével.
- A halmintákban szinte kizárólagosan előforduló metil-higany módosulat és a higanyspeciációs analízisben belső standardként gyakran használt etil-higany stabilitásának vizsgálata két különböző, egymástól független módszer alkalmazása során.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A higany

3.1.1 Általános fizikai és kémiai tulajdonságok

A higany a periódusos rendszer 80. eleme, a réz, az ezüst, az arany, a cink és a kadmium másodfajú fémek társaságában a d mezőben foglal helyet, vegyjele : Hg. Köznapi nevén folyékony fém, latinul hydrargyrum (vízezüst), régi nevén kéneső. Német neve visszavezethető az ónémet quecsilabar = elevenezüst (angolul quicksilver) kifejezésre. Más nyelvekben nevét a Merkur bolygótól, vagy a „kereskedő” istentől kapta, mert velük kapcsolatba hozták a fémet középkorban.

A higany a Föld legritkább elemei közé tartozik, a kémiai elemek gyakoriságának természetes előfordulási sorában a 62. helyen áll (a tallium és jód között). Legfontosabb ásványa a cinóber (HgS), ritkább, technikailag jelentéktelen ásvány a koloradoit (HgTe), a tiemannit (HgSe), a higanytartalmú kerargarit (Hg₂Cl₂) és a kokzinit (Hg₂I₂).

A higany az egyetlen, szobahőmérsékleten cseppfolyós fém, olvadáspontja : -38,87 °C, forráspontja : 356,58 °C, viszonylag kis mértékben oldódik vízben (25 °C-on 6 µg/100 ml víz).[Lindqvist 1985] Gőzfázisban atomos állapotban (Hg⁰) van jelen, relatív atomtömege 200,59, elektronegativitása 2,0. Természetes izotópjain — ¹⁹⁶Hg (0,146%), ¹⁹⁸Hg (10,02%), ¹⁹⁹Hg (16,84%), ²⁰⁰Hg (23,13%), ²⁰¹Hg(13,33%), ²⁰²Hg (29,80%), ²⁰⁴Hg(6,85%) — kívül még 19 mesterséges izotópja van (¹⁸⁵Hg.....²⁰⁶Hg), 50 s - 1,9 év közötti felezési idővel. Elektronkonfigurációja [Xe](4f)¹⁴(5d)¹⁰(6s)², oxidációs száma vegyületeiben +1 (merkuro-) és +2 (merkuri-) lehet ; a többnyire színtelen, vízben oldódó és mérgező higany(II)vegyületek a legállandóbbak.

Kémiai rokonsága a periódusos rendszerben függőlegesen felette álló kadmium,- és cinkfémekkel kevésbé szoros, mint a nemesfémekkel. Levegőmentes sósavban és hígított kénsavban nem oldódik, mert a nemesfémekhez hasonlóan a feszültségi sorban a hidrogéntől jobbra helyezkedik el, jól oldódik viszont oxidáló hatású savakban (királyvízben, salétromsavban és forró tömény kénsavban). A higany sok fémmel — az alkálifémekkel, az ólommal, ónnal, cinkkel, kadmiummal, alumíniummal, arannyal, rézzel, ezüsttel — amalgámot képez, melyek összetételüktől függően folyékonyak, pépesek vagy szilárdak lehetnek, a vas ellenben nem oldódik benne. Száraz levegőn szobahőmérsékleten nem oxidálódik, nedves levegőn lassanként vékony oxidhártya vonja be. Felületi feszültsége körülbelül 6-szorosa a vízének, így a víz nem nedvesíti.

Mind a higanygőzök, mind az oldható higanyvegyületek erősen mérgező hatásúak, általában a kétértékű higanyvegyületek mérgezőbbek, mint az egyértékűek. Szervetlen vegyületeinek toxikus hatása az anyag oldhatóságának mértékével nő, de általában kisebb mértékű, mint a szerves, különösen a metil-higany-vegyületeké. Akut mérgezések előfordulhatnak mind higanygőz, illetve higanytartalmú por belélegzése, mind nagyobb mennyiségű higanytartalmú vegyület orális bevétele esetén. Krónikus mérgezés kezdetben szájnnyálkahártya-gyulladást, ingerlékenységet és a kezek remegését okozza (ún. higanyreszketés), végül a szövetek károsodása miatt emlékezetkihagyást, vagy akár teljes kretenizmust és halált okoz.

A higanyt felhasználják barométerek, hőmérők töltésére (az EU napjainkra már betiltotta), (0...100°C között hőtágulási együtthatója közel lineáris), arany és ezüst kioldására nemesfémtartalmú homokból (amalgámozás), zárófolyadékként gázok felfogására, higanydiffúziós szivattyúkban, manométerekben, vérnyomásmérőkben, gázelemző készülékekben, higanygőzlámpákban, higanycsepp-elektrodként, katódanyagként az alkálil-klorid elektrolízishez, katalizátorként, a kohászatban fémkeverékek szétválasztására. Egyes vegyületeit - azok antiszeptikus és gombaölő hatása révén - a mezőgazdaságban gombaölő, - és növényvédő szerként (higanytartalmú csávázószer) alkalmazták. A higany igen alkalmas fogászati ötvözetek előállítására, ezeket az elsősorban ezüsttartalmú amalgámokat ma is széles körben használják rágófogak tömésére, mivel igen ellenálló, tartós anyag. A rendkívül lassú, de mégis nyomnyi mennyiségekben kimutatható higany kioldódás miatt e felhasználása ma már fogászati, toxikológiai vita tárgya, és a fejlettebb országokban használatát felváltották más korszerűbb anyagokkal.

A higany legnagyobb tömege cinóber alakban, mint merkuriszulfid fordul elő, legkiválóbb lelőhelyei Idria (Krajna), Almaden (Spanyolország), Horowitz (Morvaország), Kalifornia, Peru és Szerbia [Neumüller 1982].

3.1.2 A higany története

A higanyt és előállításának módját cinóberből már a régi görögök és rómaiak is ismerték, az arab nemesemberek spanyol kertjeinek legfőbb látványossága a „higany-tavak” voltak.

Az alkímisták a higanyt fontos anyagnak tartották az arany előállításához vezető úton. A VIII. században élő Geber (*Mussa-Dsafari-al-Sofi*) híres arab alkímista, előbb a higanyt és a ként, később ezeken kívül még az arzént nevezte elemnek: mindazonáltal bízott benne, hogy az arannyá történő átváltozás sikerül, mihelyt a "bölcsek kövét" megtalálják. Különösen nemes anyagnak tartották a kénesőt, mert egyik-másik amalgámjának színe és fénye az

ezüstre emlékeztetett, és mert — természetesen csak akkor, ha aranytartalmú ércel dolgoztak — az amalgám révén csekély mennyiségű színaranyra is bukkantak. Geber mindazonáltal a higanyt nem tartotta fémnek, Basilius Valentinus volt az első, ki fémes voltát felismervén, vele beható kísérleteket végzett. Nagy fajsúlya, halmazállapotának könnyű változékonysága, valamint az a tény, hogy a legtöbb fémmel amalgámot képez, keltette azt a hitet az alkimistákban, hogy ebből a fémből lehetne legkönnyebben aranyat csinálni.

Ma már tudjuk, hogy az alkimisták elképzelése a kéneső közreműködésével történő „aranycsinálásról” megvalósítható, ebben a folyamatban azonban a higany nem alakul át arannyá ahogyan azt ők gondolták, hanem az aranszemcsék kinyerése amalgám formájában történik a kimosott földből. A braziliai Amazonas vidékén többek között az okoz komoly környezeti károkat, hogy a folyó hordalékában lévő arany kinyeréséhez higanyt használnak, így ott évente több száz tonna higany kerül a környezetbe.

A higany történetének következő fejezete az orvoslás tudományához kapcsolódik, bár már az ókori Egyiptomban is használtak higany tartalmú kenőcsöket különböző bőrbetegségek gyógyítására. A XVI. században élő Paracelsust tekintik az orvosi kémia, vagy jatrokémia megalapítójának. Paracelsus a „kén, higany és só” hármas elvét vallotta: *„A vas, az acél, az ólom, a zafír, a kova semmi más, mint kén, higany és só... és az ember, hasonlóan a fémekhez, ugyancsak e háromból áll...”* Ami a fa égésekor ég, az a kén; ami elgőzölög, az a higany; ami visszamarad, az a só. A betegségek okát is e hármas elvben kereste. Amíg a három princípium a testben egyensúlyban van, addig a szervezet egészséges.



Paracelsus

Elkötelezett híve volt a higannyal való orvoslásnak, gyógyszerként alkalmazta a higanyt és annak több vegyületét: a szublimátot (higany(II)-klorid), a kalomelt (higany(I)-klorid), a „bázikus” higany-szulfátot és a higany-oxidot. Felismerte, hogy *„a mennyiség teszi a mérget.”*, eredeti német megfogalmazásban: *„Alle Ding' sind Gift und nichts ohn' Gift; allein die Dosis macht, das ein Ding kein Gift ist.”*, vagyis minden anyag méreg egy bizonyos mennyiség felett.

A higanyvegyületek gyógyszerként való felhasználásának egyik, talán legismertebb példájaként idézném a XV. század végét, amikor a kolumbuszi cserekereskedelem révén az amerikai kontinensről Európába is áthurcolt szifilisz okozta bőrelváltozások gyógyítására dietil-higany tartalmú balzsamot használtak. A kezelés során a pácienseket bőrét egyrészt kengették, valamint ún. higany kamrákban higany gőzzel kezelték. (1. ábra) A

„higanyterápiával” aztán hamarosan felhagytak, mihelyst felismerték a vegyület mérgező jellegét [Porter 2003].

1. ábra. Szifiliszben szenvedő betegek kezelése higannyal.



A fogszuvasodás gyógyítása hagyományosan a fog tömése. Az első amalgám-tömés egy Murphy nevű londoni fogorvos keze alól került ki több mint 150 éve. Hosszú évtizedeken keresztül emberek millióinak a szájában helyeztek el és helyeznek el ma is töméseket ebből a valóban igen ellenálló és erős tömőanyagból, amely tulajdonképpen ezüstpor és higany eldörzsölésével előállított ötvözet. Mivel higany tartalma kb. 50%, jogosan felmerülhet a kérdés, vajon hosszú távon nem károsítja-e egészségünket a rágás során belőle kipárolgó higanygőz. Történelmi szerepét tekintve azonban nem lehetünk igazságtalanul szigorúak az amalgámmal, hiszen korábban nem rendelkezünk megfelelő alternatívával, így valószínűleg rengeteg embert mentett meg ez az anyag a szuvasodás következményeitől.

Az utóbbi időben sokat lehet hallani az oltóanyagokba, kontaktlencse folyadékba, állatgyógyászatban használt vakcinákba kevert ún. tiomersal vegyületről. Ez az anyag tulajdonképpen etil-higany származék (Na-etilhigany-tioszalicilát), melyet konzerváló és sterilizáló hatása miatt használnak a gyógyszeriparban. Az ilyen módon történő higanyterhelésről a mai napig vitatkoznak a szakemberek.

A XX. század elején a rövid-szénláncú alkil-higany vegyületek (metil-higany, etil-higany) gombaölő és sterilizáló tulajdonságának felismerése vezetett ezen módosulatok mezőgazdasági felhasználásához. Sajnos ebben az esetben sok balesetet, mérgezést és halálesetet vont maga után elsősorban az ismeretek hiányából, tudatlanságból, de az emberi felelőtlenségből is fakadó alkalmazás.

3.1.3 A higany és a környezet

3.1.3.1 A higany előfordulása a környezetben

A higany a környezetben (1) elemi állapotban (Hg^0), (2) szervetlen sók és ásványi anyagok —elsősorban –kloridok, -jodidok, -oxidok, -szulfidok — formájában, és (3) szerves módosulatokként — metil-higany (CH_3Hg^+), etil-higany ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$), és fenil-higany ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$) sók — fordul elő ; megtalálható a légkörben, a szárazföldi és a vízi ökoszisztémákban is.

A légkörben túlnyomórészt elemi állapotban, a talajban, a vizekben, az üledékekben, a növényekben és az állati szervezetekben szervetlen sók formájában, vagy szerves módosulatokként (elsősorban metil-higany) lelhető fel.

A vízzoldható szervetlen higany +1 és +2 oxidációs állapotban létezik, melyek közül az utóbbi a természetben inkább előforduló módosulat [Loux 1998]. A legtöbb irodalmi tanulmány így a szervetlen higanyt a Hg(II) -vel azonosítja, mely megtalálható szabad Hg^{2+} ion, vagy Hg-komplexek (klorid-, hidroxid-, szulfid-, oldott szerves anyag és egyéb ligandumok alkotnak komplex vegyületet higannyal) formájában [Morel 1998].

A szerves higanyvegyületek két kategóriába sorolhatók : (1) kovalens kötésű szerves higanyvegyületek, mint a metil-higany, etil-higany vagy a higany metabolizmusban kisebb jelentőségű dimetil-higany (MeHgMe); valamint (2) a higany szerves vegyületekkel (pl. a talaj huminsav komponenseivel) alkotott komplexei.

Yudovich összefoglaló cikkére hivatkozva [Yudovich et al. 2005b] a levegő higany koncentrációja Európa és Észak-Amerika felett 3 ng/m^3 ; az Atlanti-óceán felett 2 ng/m^3 ; a déli félteke atmoszférikus higany tartalma pedig elsősorban a kisebb mértékű antropogén kibocsátás miatt csak mintegy 1.3 ng/m^3 . A legtöbb természetes víz Hg-tartalma általában alacsony, 50 ng l^{-1} körülre tehető, esővíz esetén ugyanezen érték $2\text{-}20 \text{ ng l}^{-1}$ közé esik.

A higany a Földkéreg mélyebb rétegeiben 21, a felszínhez közeli régiókban 56 ppb koncentrációban [Wedepohl 1995], főleg elemi állapotban és HgS ásványok formájában található. Annak ellenére azonban, hogy ezen ásványok vízben rosszul oldódnak (100 ml víz 10^{-6}g -ot old cinóberből) [Weast 1973], mégis a kioldódó „higanytermékek” képesek egymásba átalakulni, oxidációs számukat változtatni, esetleg fémorganikus vegyületekké alakulni biotikus és abiotikus folyamatok révén.

Legszembetűnőbb megnyilvánulását észlelhetjük ezen „interspeciesz” folyamatoknak tengerekben és édesvizekben, ahol a jelenlévő mikroorganizmusok egyes képviselői különböző természetes és emberi tevékenységhez kötött forrásokból származott szervetlen higanyt képesek metilálni, előállítva ezzel az élő szervezetekre nézve legtoxikusabb metil-

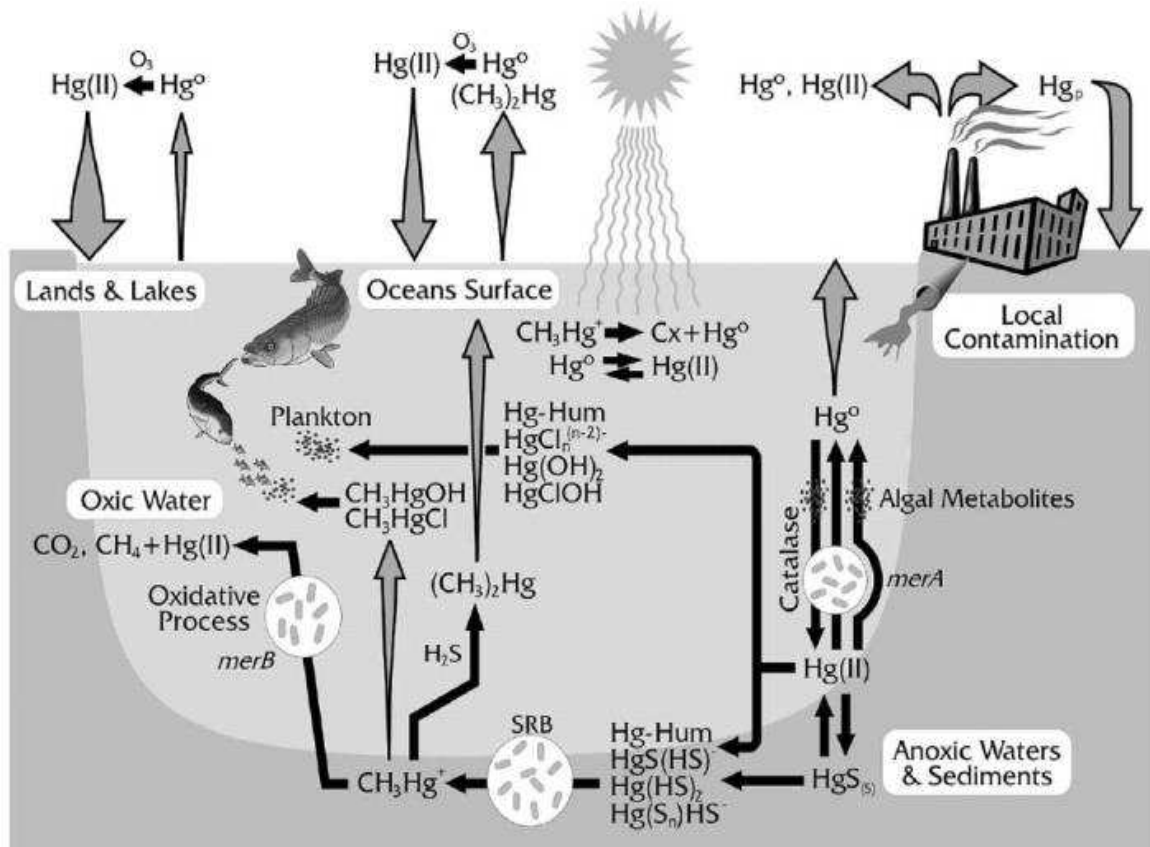
higany módosulatot. Ez az első lépése annak a bioakkumulációs folyamatsornak, melynek során a keletkezett metilezett módosulat képes beépülni a helyi ökoszisztémára jellemző tápláléklánc egyes szintjeit képviselő organizmusok szervezetébe, kezdve a planktonoktól a növényevőkön, húsevőkön át egészen a csúcsragadozókig (cápák, kardhalak, ragadozó halak, ragadozó tengeri emlősök, vagy édesvizekben pl. csuka sügér...stb). Míg a tengervíz összes higany tartalmának csak mintegy 5%-a a metil-higany, a fitoplanktonok esetében ugyanez az érték már 15%, zooplanktonok esetében 20%. A fent említett folyamatok eredményeképp a csúcsragadozók szervezetében halmozódik fel legnagyobb mértékben a metil-higany; a tengeri halak átlagos higany tartalma $0,05-0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ — melynek 90-100 %-a metil-higany [Joiris et al. 1999, Kamps 1972, Storelli 2002, Falter et al. 1994a] —, de előfordulnak szennyezett vizekben néhány $\mu\text{g g}^{-1}$ nagyságrend tartományba eső értékek is. A halakban így általában 10^6 –szor nagyobb lehet a MeHg koncentrációja, mint a vízben, ahol csaknem teljes mértékben szerves formában van a higany.

3.1.3.2 Globális higany-körforgás

A Föld bioszféráját évente újabb 5000-7000 tonna higany szennyezi, mely 50%-a Ázsiából (Kína, India, Észak-, és Dél-Korea) származik [Pacyna 2002]. A teljes kibocsátott mennyiség 50-75%-a (3400-4500 tonna) emberi tevékenységhez köthető, a természetes úton légkörbe kikerült higany éves mennyisége 1500-2500 tonna [Nriagu 1990]. A múltbeli kibocsátások létrehoztak a környezetben egy „globális higanykészletet”, amelynek egy része folytonosan mobilizálódik, lerakódik, majd újra mobilizálódik részben abiotikus átalakulások révén, részben élőlények közreműködésével. Ehhez a globális készlethez további kibocsátások adódnak, a levegő, a víz, az üledék, a talaj és az élővilág között cirkulálva. Ezen biotikus és abiotikus folyamatok eredményeként a higany a környezetben egy biogeokémiai körforgást mutat, melyet globális higany körforgásnak is hívnak (2. ábra).

Míg a különböző vizekben, talajokban, üledékekben, növényekben és állatokban szinte teljes mértékben szerves vagy különböző szerves módosulatokként lelhető fel a higany, addig a légkörben található higany gőz — mely nem más mint stabilis egyatomos gáz — a szárazföld és az óceánok felületének kipárolgásából, vulkáni tevékenységből, és különböző emberi tevékenységekkel összefüggésbe hozható forrásokból származik. Tartózkodási ideje a légkörben kb. 1 év [Clarkson 1997]; ez a tény, valamint nagy stabilitása lehetővé teszi, hogy globális eloszlást mutasson, a szennyező forrástól nagy távolságra is fellelhető legyen a légkörben. Mindemellett az elemi higany képes vízzeloldható Hg^{2+} ionná oxidálódni a felső léggrétegekben, amit viszont az esővíz visszajuttat a földfelszínre. Ezen globális körforgás eredményezi a higany eloszlását a Földön, jelenlétét bolygónk szinte minden szegletében.

2. ábra Globális higany körforgás [Morel 1998]



Az **1. táblázatban** összefoglaltam a higany természeti körforgását eredményező főbb folyamatokat. Ezen mechanizmusokkal foglalkozó irodalmi alkotások száma több száz, melyek közül néhányat a táblázatban jelöltem.

1. táblázat. A higany átalakulása biogekémiai körfolyamatokon keresztül [Barkay et al. 2003].

Reakció	Folyamat	Mechanizmus
Hg(II) metiláció	biotikus	Anaerob körülmények között leginkább szulfát-redukáló baktériumok (<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> , SRB) közreműködésével CH_3^- csoport átvitel valósul meg sok lépésben; bonyolult enzimatikus reakciók során acetyl-CoA-n, metil-tetrahidrofoláton, metilkobalaminon keresztül történik a szerves higany enzimatikus metilálása. A folyamat szubsztrátja a HgS , a metilcsoport szerinből származik. [Choi et al. 1994]
	abiotikus	Metiláció humin- és fulvosavak, karboxilsavak és a mezőgazdaságban gombaölő- és tartósítószerként

		alkalmazott alkilált ón komponensek közreműködésével. [Weber 1993, Falter 1999]
CH ₃ Hg(I) demetiláció	biotikus	Anaerob körülmények között, üledékekben mikroorganizmusok végzik. Részben redukzív demetiláció, mely CH ₄ -t és Hg(0)-t eredményez, ez utóbbi aztán atomos gőzként a légkörbe léphet ; részben oxidatív folyamat, melynek mechanizmusa ismeretlen, CO ₂ és azonosítatlan Hg-komponens (valószínűleg Hg(II)) a terméke, mely viszont szubsztrátja lehet a szediment anaerob körülményei között egy „újrametilációs” folyamatnak. [Oremland 1991, Begley 1986]
	abiotikus	Fotodegradáció (200-400 nm). Ezen demetilációs folyamatok főleg jó fényviszonyok mellett lápos-mocsaras területeken, tavak és óceánok felszíni rétegeiben fordulnak elő, míg a fent említett biotikus metil-higany bontó folyamatok üledékekben, vizek mélyebb, fénynek kevésbé kitett rétegeiben dominálnak.[Seller et al. 1996, Suda 1993]
Hg(II) redukció	biotikus	A Hg(II)→Hg(0) átalakulás előfordul természetes vizekben, talajokban, a keletkező elemi higany nagy része kikerül a légterbe. Bakteriális higany reduktáz segítségével és algák közreműködésével zajlik a folyamat, a mechanizmus felderítetlen. [Ogunseitan 1998, Devars 2000]
	abiotikus	Az abiotikus Hg(II) redukció végbemehet fotokémiai átalakulások során illetve „sötét” reakcióban is, szerves és szervetlen szabadgyökök közreműködésével. Diszproporció : 2 Hg(I)→ Hg(II) + Hg(0) [Nriagu 1994, Baltisberger et al. 1979]
Hg(0) oxidáció	biotikus	Oxidáció mikrobák, növények és állatok hidroxidáz enzimjének közreműködésével. [Smith et al. 1998, Magos et al. 1978]
	abiotikus	Különböző oxidánsok és szabadgyökök által végzett fotooxidáció, illetve sötét oxidáció O ₂ közreműködésével. [Lindberg et al. 2002, Amyot et al. 1997]

3.1.3.3 Fontosabb szennyező források

Egy a 2004-es évben megjelent összefoglaló irodalom [Wang et al. 2004] az USA Környezetvédelmi Hivatalának álláspontjára hivatkozva [USEPA 1997] megállapítja, hogy

három alapvető módon juthat higany a környezetbe: (1) természetes úton, (2) emberi tevékenységgel összefüggő módon és (3) a már természetben lerakódott készlet újra mobilizálódásával.

A természetben végbemenő folyamatok, mint szennyező források közül kiemelkedő fontosságú az ásványi üledékekből, vízi és szárazföldi rendszerekből történő gázkipárolgás (Hg^{2+} redukció során képződő Hg^0), vulkáni tevékenység, erdőtüzek [Nriagu 1994, Camargo 2002], higany tartalmú talajok eróziója, légköri higany lerakódása a szárazföldre és a vizekbe. Ezen természetes jelenségek közös jellemzője, hogy nem lokális szennyeződést okoznak, a kibocsátott higany nagy területeken viszonylag egyenletes eloszlást mutat, ellentétben az emberi tevékenységekhez, iparhoz köthető folyamatokkal, mely általában a szennyező forrás környékén okoz észlelhető károkat.

A légköri higany lerakódása egy fontos, esetenként a legnagyobb mértékű forrása a szennyezésnek [Hermanson 1998, Wang et al. 2004]. A légkörben a higany apró részecskék formájában vagy vízcseppekhez kötötten, de leginkább (80%-ban) gáz állapotban van jelen [Lindqvist 1985]; ez utóbbi nagymértékű illékonyságának köszönhetően hosszú időn át változatlan formában meg is marad ott [Slemr 1992]. Oxidációs folyamatok, mint a már említett fotokémiai reakció hatására a $\text{Hg}(0)$ átalakulhat $\text{Hg}(\text{II})$ -vé a légkörben lévő aeroszol és folyadékcseppecskék felszínén [Lindqvist 1985], a keletkező módosulat azonban ellentétben az elemi higannyal nem marad a légkörben, hajlamos kiválni, kiüledni a szárazföldi és vízi környezet felszínén [Venkataraman 2000]. Komplex problémáról van szó, alapvetően a higany légkörben történő szállítási és átalakulási folyamatai szabják meg a lerakódás mértékét, ez utóbbi folyamatokat azonban befolyásolják a szezonális változások [Mason et al. 2000], topográfiai viszonyok, a szél [Fang et al. 2001], a nedvességtartalom [Lindqvist 1985].

A talajerózió – melynek mértéke jelentős lehet, különösen azokon a területeken, ahol földműveléssel, intenzív fakitermeléssel együtt járó erdőirtás folyik - mint természeti jelenség szintén meghatározó szennyező veszélyforrás lehet elsősorban a vízi ökoszisztémákra nézve. A talaj, eróziónak kitett felső rétege szennyezett lehet a légköri higany lerakódás, vagy mezőgazdasági-, ipari tevékenységek, esetleg iszapráhordás miatt. Az USA-ban például a körforgásba belépő higany 95%-ban a szárazföldre, talajokba lerakódott forrásokból származik [USEPA 1997]. Talajerózió okozza a szennyezést például Brazíliában az Amazonas vidékén, ahol a kiterjedt erdőirtás miatt $200\text{--}4600\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ higany kerül évente a lemosódó talajból a környező vizekbe [Roulet et al. 2000].

Az emberi tevékenységekkel összefüggő higanykibocsátás kapcsán meg kell említeni, mint forrást, a szilárd (városi és gyógyászati) hulladék elégetését, megsemmisítését; széntartalmú és olaj tüzelőanyagok égetését [Yudovich et al. 2005a] ; a mezőgazdaságban használatos néhány növényvédő- és gombaölő szert; egyes fémipari és kohászati technológiákat; higany és arany termelést [Pirrone et al. 2001, Wang et al. 2004]. Találunk bőven példát higany használatára az orvostudományban is, gondolok itt a már korábban is említett, fogászatban egykor „egyeduralkodó”, mára már egyre inkább háttérbe szoruló, inkább csak alternatív megoldást nyújtó amalgámos tömőanyag alkalmazására, vagy több a humán és állatgyógyászatban is ismert tartósító hatású mertiolát tartalmú oltóanyag használatára [Clarkson 1997].

Az alábbi folyamatok közül a széntartalmú tüzelőanyagok használata és a hulladék (elemek, fénycsövek, egyes festékek) égetés teszi ki az éves globális higanykibocsátás több mint felét [Pirrone et al. 1996, Carpi 1997]. Ezen ipari és kommunális tevékenységek a higanyt általában a levegőbe juttatják, — elsősorban (50-80%-ban) HgCl_2 -ként, a maradék 20-50 % pedig elemi higany — ahonnan nagy része lerakódik a környező vizekbe és a szárazföldre, a légkörben maradó hányad pedig belép a regionális vagy globális körforgásba. Ázsiában például a széntartalmú tüzelőanyagok égetése jelenti a legfőbb emissziós forrást [Pacyna 2002, Wang 2000], mi sem bizonyítja ezt jobban, mint az a tény, hogy a „kínai szenek” átlagos higanytartalma $0,22 \text{ mg kg}^{-1}$ körüli érték [Wang 2000], vagy Szibéria környékén ez az érték $0,03\text{-}0,07 \text{ mg kg}^{-1}$ -ra tehető [Yudovich et al. 2005a].

Az emberi tevékenységgel kapcsolatba hozható szennyező források közül kiemelkedő fontosságú egyes kémiai üzemek a szigorú szabályozásoknak köszönhetően egyre inkább már csupán történelmi jelentőségű tevékenysége is. Gondolok itt Szibéria nehéziparban érintett, higanykatódot használó egyes régióira, ahol 1998 előtt az üzemek által kibocsátott szennyvíz nagy károkat okozott és okoz a mai napig is a környező vízi ökoszisztémákban [Koval et al. 1999], vagy európai klór-alkáli üzemekre, melyek az 1980-as években folytatott tevékenységük révén felelőssé tehető az összes antropogén eredetű szennyezés 18%-ért [Pacyna 1991]. Az Európai Unióban bevezetett szigorú intézkedéseknek köszönhetően azonban a klór-alkáli ipar által kibocsátott higany mennyiségét sikerült szignifikánsan csökkenteni [Pacyna 2002]. Kanadában az ércekből történő fémkinyerés (vas, ólom, cink) talán az egyetlen jelentős szennyező forrás, itt évente kb. 24 tonna higanyt emittál a környezetbe a bányászati és fémipari szektor [Innanen 1998].

A fentiekén kívül azonban szerte a világon számos más ipari tevékenység is érintett a globális „higany-problémában”, úgymint a cementipar, a papíripar, fénycsőgyártás, hőmérőgyártás...stb [Beim 1992, USEPA 1997].

A mezőgazdaságban hosszú idő óta alkalmazott higanytartalmú növényvédő,- rovarirtó- és gombaölő szerek a művelt területek talajaiban jelentős mértékű szennyezést okozhatnak. Az 1960-as években világviszonylatban 2100 tonna higanyt használt fel a mezőgazdaság, melyből 1600 tonnát Japán juttatott a környezetbe [Smart 1968]. Annak ellenére azonban, hogy ezen szerek használatát ma már szigorúan szabályozzák és korlátozzák szinte minden országban, a korábbi években okozott emelkedett higanykoncentráció viszonylagos állandóságával jellemezhetők ma is a környékbeli talajok, üledékek, vizek és vízi élőlények. Ez a jelenség tapasztalható például a Mississippi egyes mezőgazdasági művelés alá vetett régióiban olyannyira, hogy a felszínhez közeli talajréteg emelkedett higanytartalma ($55 \mu\text{g kg}^{-1}$) tekinthető a térség fő szennyező forrásának [Cooper et al. 2001, Knight et al. 1996].

Az arany,- ezüst, -ólom- és higany bányászat történelmi jelentőségű a környezet higany terhelése szempontjából, gondoljunk csak az „aranycsináló” alkimisták ténykedéseire. Manapság jól ismert tény, hogy Brazíliában, az Amazonas vidékén az 1980-as és 1990-es években, ma már főleg csak kisipari, kiskereskedelmi méretekben folytatott amalgámképzésre alapozott aranybányászat, amellet, hogy jelentős mennyiségben juttatott higanygőzt a légterbe, szennyezte a környezetet a technológia során keletkezett és elvezetett víz emelkedett higany tartalma révén is [Nriagu 1993, Lacerda 1997].

A fémkinyeréssel kapcsolatos környezeti terhelés egy lényeges összetevője a higanybányákból elfolyó szennyvíz magas szervesetlen higany-, metil-higany- és szulfát koncentrációja. A probléma összetett, hiszen a magas szulfát koncentráció (1000 mg l^{-1}) jó táptalaja a higany-metiláció folyamatában kulcsszerepet játszó szulfát-redukáló baktériumoknak, maga után vonva a metilációs folyamatok mértékének fokozódását, így nagy mennyiségben kerül ki a higanynak e különösen toxikus módosulata a környezetbe [Rytuba 2000].

Dél-Amerikában az ezüstabányászat volt felelőssé tehető évi 400 tonna higany kibocsátásért a 16. század vége és a 20. századelő között [Aula et al. 1995].

Európa sem mentes a bányászattal kapcsolatos környezetszennyezés felelőssége alól, hiszen például a Prága közelében található csehországi Příbramban az ólombányászat és kohászat okozza a környező talajok 7-vagy akár 40-szeres higany koncentrációját a háttérértékhez képest [Rieuwerts et al. 1996].

További problémát jelent, hogy a már akár több mint 100 éve üzemben kívül lévő, inaktív bányák mind a mai napig fenyegető szennyező források lehetnek a környékbeli vízi ökoszisztémákra nézve.

Annak ellenére, hogy minden eddig említett higany szennyezést okozó jelenséget és az ipari,- mezőgazdasági tevékenységek többségét napjainkban már szigorú környezetvédelmi előírások szabályozzák, még hosszú időnek, akár évszázadoknak kell eltelnie ahhoz, hogy a korábban erősen szennyezetté vált vízi ökoszisztémákban (a vízben, az élőlényekben, az üledékekben) a higany koncentráció az előírt határérték alá, biztonságos koncentráció tartományba visszatérjen.

3.1.4 A higanyvegyületek élettani hatása

3.1.4.1 Általános toxikológiai jellemzők

A XX. század elején, kémikusok, akik az egyes fémek vegyértékeit próbálták meghatározni és kísérleteikhez metil-higanyt szintetizáltak, váratlanul mentális panaszokkal kórházba kerültek, majd röviddel ezután meghaltak. Az orvosok értetlenül álltak az esetek előtt egészen addig, míg 1940-ben Hunter és Russel beszámolt higanytartalmú gombaölő szert előállító gyárban dolgozó munkások haláláról. A tragédiát higany mérgezéssel magyarázták, a kórkép pedig innentől kezdve „Hunter-Russel-szindróma” néven vált ismertté [Powell 1991].

1956 május, helyszín : Minamata-öböl. Négy gyári munkást agykárosodásból fakadó panaszokkal vettek fel a helyi Kunamoto Egyetemi Kórházba, ahol az orvosok tanácstalanul álltak az eset előtt, és mivel a helyi lakosok egyre növekvő számban jelentkeztek hasonló tünetekkel, fertőző betegségekre gyanakodtak, a kórképet pedig „Minamata-betegség”-nek nevezték el. 1959 októberében került felszínre a tragédia valódi oka : egy közeli, acetaldehidet és vinil-kloridot gyártó cég metil-higanyt is tartalmazó szennyvizét tisztítás nélkül engedte az öbölbe az elmúlt negyven évben. A sekély tengervízbe került közel 150 tonna metil-higany feldúsult a táplálékláncban, és mivel a helyiek fő táplálékát adó halak károsodása nem volt észrevehető, az emberek gyanútlanul fogyasztottak ezekből a halakból továbbra is. A halászatot sajnos csak 1965-ben állították le; és bár megtiltották az üzemnek, hogy metil-higany tartalmú szennyvizét az öbölbe engedje, szervesen higannyal tovább szennyezte a térséget — arra ugyanis a tiltás nem vonatkozott egészen 1968-ig—, hiszen nem tudták akkor még, hogy biometilációs folyamatok révén a szervesen higany jelentős részéből is metil-higany képződik [Graeme Md et al. 1998].

Irakban az 1971-72-es években mintegy 6000 ember került kórházba, közülük 450-en meghaltak metil-higany tartalmú növényvédőszerrel kezelt gabona alapanyagú kenyér fogyasztása miatt. Az érintettek esetében ugyanolyan idegrendszeri károsodásokat és anomáliákat találtak, mint amit korábban a Minamata-betegség kapcsán lejegyeztek. 1969-ben

Mexikóban egy család, köztük egy állapotos nő jelentkezett hasonló kórképpel a helyi kórházban, akik "higanyos" gombaölőszerral kezelt gabonával hízlalt disznót fogyasztottak [Graeme Md et al. 1998].

Az említett példák is mutatják, hogy bár a higanyt a múltban gyógyszerként is használták — gondoljunk csak a 15. század végén tomboló szifilisz járványra — a 19-20. században már egyre inkább kifejezetten toxikus voltáról szóltak az írások.

A higany egészséget károsító hatásának mértéke, súlyossága különböző faktorok függvénye, úgymint a higany kémiai formája (elemi, szervetlen, vagy szerves komponens), a mennyiség, az expozíciós idő, a szervezetbe kerülés módja (szájon át, belélegzéssel, injekció révén, bőrön keresztül adszorpcióval,...stb.), és nem utolsósorban az érintett személy életkora, egészségi állapota.

A fenti felsorolt tényezők közül természetesen a szervezetbe bejutott mennyiségen túl talán a fém kémiai formája a legfontosabb faktor, hiszen az egyes módosulatok élettani hatása, metabolizmusa eltérő, transzportjuk és kiürülésük más-más módon megy végbe a szervezetben (lásd 3.1.4.2. és a 3.1.4.3. fejezetet), ebből adódóan toxicitásuk mértéke is különbözik. Nem szabad azonban elfeledkezni arról, hogy a módosulatok át tudnak és folyamatosan át is alakulnak egymásba, így ismereteink szerint minden higany-módosulat mérgező valamilyen mértékben az élő szervezetek számára.

Az egészséget károsító hatás egyrészt arra vezethető vissza, hogy a higany, mint Pearson-féle „soft sav” nagymértékű affinitást mutat a szervezetben található „soft bázisok” iránt, így tiol-csoportok révén képes membránfehérjékhez vagy enzimekhez kötődve azok működését gátolni. Másrészt a szerves módosulatokban a Hg-C kötés nagy stabilitású, a szerves csoport jelenléte miatt pedig ezen módosulatok könnyen áthatolnak a sejtmembránokon.

A higany élettani hatásainak kutatása során összefüggést találtak a higanymérgezés és a szív-, és érrendszeri betegségek kialakulása között. A higany csökkenti a szervezetben a szelén szuperoxid-dizmutáz antioxidáns kapacitását, elősegítve ezzel káros szabadgyökök képződését és a zsír peroxidációt.

A különböző higanymódosulatok biológiai viselkedésének tanulmányozása nehéz feladat, még akkor is, ha korszerű speciációs analitikai módszerek állnak a rendelkezésünkre. A módosulatok emberi szervezetre gyakorolt hatásai jelenleg csupán *in vitro* tanulmányozhatók, amely modell messze áll a valóságtól – elsősorban a valódi biokémiai folyamatok hiánya miatt. Állatkísérleteket végeznek a valódi élettani folyamatok modellezésére. A vegyületek toxicitásának kifejezésére az LD₅₀ érték szolgál, melyet elemi higanyra 10-40 mg kg⁻¹-os, szervetlen higany komponensekre 40-200 mg kg⁻¹-os, metil-

higanyra 10-30 mg kg⁻¹-os értékben állapítottak meg. Az adatok patkányokra, és orális adagolásra vonatkoznak [ATSDR 1989].

3.1.4.2 Az elemi higany és a szerves higany komponensek

Az elemi higany (Hg⁰) toxikológiai szempontból talán legfontosabb tulajdonsága, hogy szobahőmérsékleten folyékony halmazállapotú, viszont nagyon illékony, így gőzei rövid idő alatt megtöltik a rendelkezésre álló teret.

Mérgezést elsősorban gőzeinek belélegzése okozhat, de veszélyes lehet higanytartalmú hintőporok, festékek használata, vagy akár az amalgám fogtömésekből való higany kipárolgás is.

A belélegzett Hg⁰ gőz 80%-a adszorbeálódik a tüdőben, átdiffundál az alveolusok membránján, majd belépve a vérkeringésbe a vörösvértestekhez kötődve szállítódik, miközben nagy része oxidálódik: $\text{Hg}^0 \rightarrow \text{Hg}_2^{2+} \rightarrow \text{Hg}^{2+}$ kataláz enzim és H₂O₂ közreműködésével. Az oxidált forma képes szulfidril csoportokhoz kötődni, ezáltal akkumulálódni az agyban, májban és a vese kéregállományában. Nők esetében a terhesség alatt belélegzett Hg⁰ gőz adszorbeálódik az anyai szövetekben, majd átdiffundálva a placentán felhalmozódhat a magzat agyában, súlyos maradandó idegrendszeri károsodást és fejlődési rendellenességeket okozva.

A belélegzett elemi higany felezési ideje 60 nap, leginkább vizelettel és széklettel, kisebb mértékben kilélegzéssel, vagy verejtékezéssel ürül ki a szervezetből [Counter et al. 2004].

A higannyal nem szennyezett területeken az emberi szervezet számára a legfőbb „elemi higany beviteli forrást” az amalgám fogtömések jelentik. Ezek tömegének 50 %-a fémhigany (Hg⁰), mely rágás közben „kipárolog” a tömőanyagból, belélegezve adszorbeálódhat a tüdőben, majd bekerülve a véráramba a fent vázolt folyamatban eljut és raktározódik a létfontosságú szervekben.

Szerves higany szennyező forrásként a már említett természetes folyamatok és antropogén tevékenységek, egyes higany-tartalmú gyógyszerek, hintőporok, fertőtlenítő szappanok, vagy a kalomel-tartalmú bőrápoló krémek szolgálnak. Nem szabad elfeledkezni azonban arról a fontos tényről sem, hogy minden szervezetbe bekerülő módosulat (elemi higany és szerves módosulatok is) Hg²⁺ formává metabolizálódik. A szerves forma elsősorban a széklettel ürül ki a szervezetből.

3.1.4.3 Szerves higanyvegyületek

3.1.4.3.1 Metil-higany

Metil-higany elsősorban a táplálékkal, főleg halak és haltartalmú élelmiszerek fogyasztása révén kerülhet szervezetünkbe. Az étkezés útján bekerülő higany 85 %-a halakból származik, és az ily módon felvett higany 90-100 %-a metil higany formájában van. Az „elfogyasztott” mennyiség mintegy 90-100 %-a felszívódik a bélrendszerből, bekerülve a véráramba eljut szinte minden fontos szervünkhöz. Metil-csoportja révén könnyedén áthatol a sejtmembránon, a vér-agy-gáton, fő raktározó szerve az agy. A szerves higany-vegyületek képesek a vörösvértestekbe bejutva a hemoglobin molekulához kötődni, ily módon bekerülhetnek a placenta vérkeringésébe is, majd felhalmozódhatnak a fejlődő magzat vérében és agyában, súlyos idegrendszeri károsodást, fejlődési rendellenességet okozva ezzel [Clarkson 1997]. Az agyban a MeHg demetilálódik, szervetlen higany komponens lesz belőle, valószínűleg ez utóbbi a felelős az idegrendszeri károsodásokért. Az összes higany módosulat közül a metil-higanyt tekintik a legtoxikusabb formának, melynek oka a fent említett sajátságain kívül az a tény, hogy rendkívül hosszú idő alatt, elsősorban a széklettel ürül ki a szervezetből; felezési ideje az élő szervezetben 60-70 nap, a hajban 65-80 nap [Counter et al. 2004, WHO 1990]. A sejtekből glutation-komplex formában „pumpálódik” ki, ilyen formában választódik ki az epébe, ahol egy része cisztein komplex-szé degradálódik, ami pedig a májkapu-érrendszeren keresztül visszajut a májba. Az epében maradó hányad, egyes bélrendszerben élő mikroorganizmusok demetilációs tevékenységének eredményeként szervetlen formává alakul és távozik a széklettel. Míg a felnőtt emberek idegrendszerét a metil-higany általában lokálisan támadja, például a neuronok egy része elpusztul (a pusztulás mértéke persze függ a mérgezés fokától), addig a gyermekek fejlődésben lévő agyában diffúz, nagy területre kiterjedő károsodást okoz.

A MeHg nagyfokú toxicitását elsősorban nagymértékű mozgékonyságának köszönheti, könnyen át tud jutni a bélnyálkahártyán és a sejtmembránon, akkumulálódni képes a sejtekben. Mobilitásának okait kutatva ellenmondásokba ütközhet az olvasó, ugyanis egyes vélemények szerint a metil csoport jelenléte zsírolékonnyá teszi a módosulatot, ami magyarázhatja a sejtmembránokon való átjutást. Más írások ugyanakkor arról számolnak be [Clarkson 1997, Kerper 1992], hogy a szervezetben a tiol csoportokhoz nem kötött MeHg vízben oldódó formában, cisztein komplexként van jelen. Mivel ezen komplex szerkezete hasonlít egy neutrális aminosav, a metionin szerkezetéhez, így a cisztein komplexként

megkötött MeHg membránokon való átjutásáért egy nagy, neutrális aminosav hordozó molekula közreműködésével megvalósuló aktív transzport folyamat a felelős.

3.1.4.3.2 Etil-higany

Az etil-higany a már korábban említett tiomersal, vagy más néven mertiolát ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-Hg-S-C}_6\text{H}_4\text{-COOH}$) alkotórészeként kerülhet leginkább kapcsolatba az emberi és állati szervezetekkel. Ezen vegyületet, mint tartósító,- és antiszeptikus adalékanyagot, gyógyászati segédanyagot adnak hozzá bizonyos humán oltóanyagokhoz (pl. diphtheria-pertussis-tetanus (DPT), hepatitis B, bizonyos b típusú Haemophilus influenzae vakcinák,...stb) és egyes állatgyógyászati termékekhez [Counter et al. 2004].

Az etil-higany élettani hatása nagy dózisú mérgezés esetén hasonló a metil-higanyéhoz. Néhány alapvető különbség azonban van a kétféle módosulat sajátságai és hatásmechanizmusa között. Nevezetesen, mint már említettem, egyes feltételezések szerint a metil-higany vér-agy gáton való áthaladásáért egy aminosav-transzfer rendszer a felelős, ilyen aktív-transzport mechanizmust etil-higany esetében nem találtak. Fontos megemlíteni továbbá, hogy ez utóbbi molekula mérete nagyobb, a C-Hg kötési energia kisebb, így kevésbé stabilis, azaz gyorsabban bomlik szervesetlen higannyá, mint a metilezett módosulat [Magos 2001]. Az irodalom a fentiek alapján összességében az etil-higanyt kevésbé tartja toxikusnak, mint a másik szerves módosulatot.

3.1.5 A higanytartalomra vonatkozó előírások

Sokszor ellentmondásos, regionálisan különböző adatokkal, nem mindig egyértelmű „toxicitási” definíciókkal találja magát szemben az olvasó, amikor határértékek után kutakodik. Nem tisztem bírálni a következőkben ismertetett adatokat, viszont a témához kapcsolódó néhány vitatható dologra szeretném felhívni ebben a fejezetben a figyelmet.

A humán expozícióban jól ismert az Elfogadható Napi Felvétel (Acceptable Daily Intake, ADI) meghatározás, amelyet a kérdéses kémiai anyag mg vagy µg mennyiségében fejeznek ki az exponált személy testsúly kg-jára vonatkoztatva naponta (kémiai anyag µg/testsúly kg/nap). Az ADI koncepciója a FAO és WHO Élelmiszer-adalékok Tudományos Közös Bizottságától (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, a továbbiakban JECFA) származik és főleg mesterséges és természetes színezékekre és ízesítőkre állapították meg.

A különböző élelmiszerszennyező anyagokra, elsősorban toxikus elemekre, fémekre azonban a JECFA bevezette a kevésbé ismert, Időlegesen Elfogadható Heti Felvétel

(Provisional Tolerable Weekly Intake, a továbbiakban PTWI) fogalmát és az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (European Food Safety Authority, EFSA) ezen értéket tartja irányadónak. A PTWI bevezetésének a koncepciója az volt, hogy ezzel meghatározzák egy populáció bizonyos kémiai anyagtól elszenvedett expozícióját, az „elfogadható” terminológia pedig tulajdonképpen azt a bevitt mennyiséget jelenti, amelyet az élelmiszer elkerülhetetlenül tartalmazhat.

1972-ben a JECFA által megállapított PTWI érték 5 µg/ testsúly kg volt összes higanyra és ennek nem több mint két harmada, 3,3 µg/ testsúly kg volt metil-higanyra [WHO 1972]. Megerősítendő, ez utóbbi metil-higanyra vonatkozó PTWI értéket hagyták jóvá később 1989-ben és 2000-ben is [WHO 1989, WHO 2000].

Mindeközben az EU-ban elfogadott és használt PTWI helyett az USA-ban az amerikai Környezetvédelmi Hivatal (U.S. Environmental Protection Agency, a továbbiakban U.S.EPA) által meghatározott ún. referencia dózissal (RfD) fejezik ki a kémiai szennyező anyagok okozta humán expozíciót. Ezen mennyiséggel egészségünk károsítása nélkül naponta terhelhetjük szervezetünket. A referencia dózis nem jelent éles határvonalat biztonság és toxicitás között, inkább egy küszöbérték, ami felett nagyobb valószínűséggel következnek be egészséget károsító folyamatok. Az 1997-ben megállapított és a mai napig érvényben lévő RfD érték metil-higanyra 0,1 µg / testsúly kg/nap, egy hétre számolva 0,7 µg testsúly kilogrammonként [EPA 1997, Honlap 1, Honlap 2].

Az eddigi adatokból látható, hogy bár más-más definiált egységben állapítják meg a határértékeket az amerikai kontinensen és az Európai Unióban, és így az adatok összevetése, egymásnak megfeleltetése nehézkes, mégis levonható azon következtetés, hogy az EPA által meghatározott dózis jóval szigorúbb az európai értékekhez képest. Az ellentmondást részben feloldani látszik, az a tény, hogy míg az EPA az RfD értékek megállapításánál kalkulált a metil-higany terhelés szempontjából veszélyeztetettebb csoportokkal is — hiszen a terhes nők valamint gyerekek esetében a megengedett dózis „elfogyasztása” nagyobb higanyterhelést jelent, az előbbieket esetében a magzat szempontjából, az utóbbi esetben a gyerekek kisebb testtömege, valamint fejlődő idegrendszerük okozza a nagyobb kockázatot —, addig a JECFA által megszabott PTWI érték egy átlagos populációra vonatkozik. Figyelembe véve e veszélyeztetettebb népcsoportokat is, 2003-ban a JECFA felülírta korábbi álláspontját és metil-higanyra 1,6 µg/testsúly kg PTWI értéket állapított meg, mely a mai napig érvényes [Honlap 3]. Ez egy átlagosan 70 kg-os emberre számolva 112 µg metil-higany „elfogyasztását” engedélyezi hetente.

A JECFA által megállapított PTWI és az EPA RfD értéke között a még így is megmaradó különbség oka pedig feltételezhetően a témához kapcsolódó járványügyi tanulmányok kissé eltérő értelmezése, és az ebből adódó másféle kalkuláció [EFSA 2004].

Mindazon tények ellenére, hogy a metil-higanynak egyre több káros, toxikus élettani hatása válik ismertté, nehéz felmérni, sőt megbecsülni is a higany-tartalmú élelmiszerek fogyasztásából eredő kockázatot. Az EU-nak még napjainkban sincs egységes tudományos állásfoglalása az élelmiszerek higanytartalmáról, arról a minimálisan elfogyasztott mennyiségről, ami már káros hatásokhoz vezethet. Mégis, a higany vegyületek nagymértékű toxicitása és a múltbeli balesetek miatt az Európai Bizottság törvényileg [EC 221/2002] szabályozta az egyes élelmiszerekben megengedhető maximális higany koncentrációt. A szabályozás összes higany tartalomra vonatkozik, külön metil-higany koncentrációt nem említ a törvény. Az ivóvíz minőségének szabályozására vonatkozó előírást, illetve a különböző szennyezőanyagokra előírt határértékeket az Európai Bizottság 1998-ban kiadott direktívája [EC 98/83] figyelembevételével készített 201/2001.(XI.25) Kormányrendelet tartalmazza.

2. táblázat. Megengedhető maximális higany koncentrációk haltartalmú élelmiszerekben és ivóvízben

	Kereskedelmi forgalomban lévő halak, haltartalmú élelmiszerek, rákok, kagylók	Egyes csúcsragadozó halfajok (cápa, kardhal, csuka tonhal...stb.)	Ivóvíz
Határértékek (összes higany koncentráció, mg/kg nedves tömegre számítva, ivóvíz esetén mg/l),	0,5 (221/2002/EC direktíva)	1 (221/2002/EC direktíva)	0,001 (98/93/EC) direktíva)

3.1.6 Halfogyasztás Európában és Magyarországon

Az Európai Bizottság felkérésére az EFSA élelmiszerláncot szennyező anyagokat vizsgáló tudományos szakértői testülete (Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain, CONTAM) vizsgálta az európai fogyasztók táplálkozási szokásait, felmérte a táplálékeredetű higany illetve metil-higany felvételt az egyes országokban, és elkészítette tudományos kooperációs kockázatbecslő tanulmányát (SCOOP 3.2.11.) a témával kapcsolatban [EC 2003]. Az eredmények összes higany tartalomra vonatkoznak (az egyes módosulatokra külön-külön nincsenek adatok) — ennek oka az, hogy az egyes nemzeti ellenőrző laborokban higanyspeciációs analitikát nem alkalmaznak rutinszerűen —viszonyítási alapként azonban az 1,6 µg/testsúly kg/hét PTWI (JECFA) és a 0,7 µg/testsúly kg/hét (EPA) értékeket használták,

melyek metil-higanyra vonatkoznak. Az ellentmondást részben feloldja az a tény, hogy a halak és tengeri élőlények higany tartalmának 90-100%-a metil-higany formájában van jelen, vagyis a mért összes Hg koncentráció többé-kevésbé megfelel a MeHg tartalomnak; ugyanakkor nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a MeHg toxicitása jóval nagyobb mértékű a többi módosulathoz képest.

A tanulmány szerint az uniós polgárok által fogyasztott halak és haltartalmú élelmiszerek átlagos higany koncentrációja nedves tömegre számolva : $109 \pm 845 \mu\text{g kg}^{-1}$. A nagy standard deviációs érték az eltérő régiókból származó és eltérő fajú vagy fajtájú halminták esetenként szélsőségesen különböző higany koncentrációjából adódik. Éppen e tényből következik, hogy az ilyen általánosított adatoknál jobban értelmezhetőek és informatívabbak az egyes országokra (a portugálok által fogyasztott halak a legszennyezettebbek, átlagosan : $380 \mu\text{g kg}^{-1}$ -os higany koncentrációval), vagy az egyes halfajokra (a csúcsragadozó fajok - pl. tonhal, cápa - higany koncentrációja elérheti az $1\text{-}5 \text{ mg kg}^{-1}$ -os értéket is) lebontott eredmények.

Az átlag halfogyasztás Európában hetente $70\text{-}560 \text{ g}$, a legtöbb halat Norvégiában eszik, ahol vannak heti akár másfél kiló halat fogyasztó emberek is. Amennyiben a JECFA által megállapított $1,6 \mu\text{g}/\text{testsúly kg/hét}$ PTWI értéket vesszük alapul, kiszámítható, hogy az átlagos halfogyasztók esetében így a heti higanyterhelés a viszonyítási alapként szolgáló PTWI érték legfeljebb 50%-át éri el, míg a kiemelten sok, vagy az átlagosnál szennyezettebb halat evő emberek heti higany felvétele meghaladhatja, sőt akár többszöröse is lehet ennek. Jó példa erre Portugália, ahol a heti átlagos higany felvétel kiemelkedően magas (a PTWI érték 100%-a), holott jóval kevesebb halat fogyaszt a lakosság, mint mondjuk Norvégiában. Érdekes ugyanakkor, hogy míg a köztudatban és az irodalmi források zömében is a halfogyasztást tartják szinte az egyedüli fő higanyterhelési forrásnak, addig pl. Franciaországban, Hollandiában, Németországban a gyümölcsök, zöldségek és főleg gombafélék fogyasztása jelenti a fő szennyező forrást, elsősorban abból adódóan, hogy ezen népek étrendjében a zöldségek gyümölcsök nagyságrendekkel nagyobb mennyiségben szerepelnek mint a halhús.

A magyarországi halhús termelés alapvetően a halastavi tenyésztéshez kötődik, ahol a faji összetételt tekintve meghatározó a ponty. Évről évre jelennek meg a piacon a ponty mellett az intenzív halnevelő telepek fajtái : köztük az afrikai harcsa, angolna, pisztráng, kecsge és egyéb tokfélék. A pisztráng a helyi piacok ellátásában jelentős, míg az afrikai harcsa az elmúlt években az áruházláncok vásárlóinak egyik kedvelt halfaja lett.

Ma a világon talán mi magyarok eszünk a legkevesebb halat, fejenként átlagosan 3 kg -ot évente, így hazánk lakossága nem tartozik a viszonylag magas halfogyasztás által

közvetlenül veszélyeztetett népcsoportba. Az évi feldolgozott halmennyiség 60-70%-a hazai édesvízi hal, 30-35%-a import tengeri hal, ez utóbbi hányad mintegy 30%-a viszont az EU-n kívülről sokszor (bár az egyre szigorúbb ellenőrzéseknek köszönhetően egyre ritkábban) bizonytalan eredettel jön. Mindezen tényekből adódóan Magyarországon is van létjogosultsága a kereskedelmi forgalomban lévő halak és haltartalmú élelmiszerek metil-higany koncentrációjának rutinszerű mérésének és ellenőrzésének.

3.2 A higanymódosulatok analitikai meghatározása

Míg az elemanalitikai meghatározások során egy adott elem összes koncentrációját mérjük, addig a speciációs analízis célja, hogy a mintában található elem egyes módosulatainak koncentrációját határozzuk meg.

3.2.1 Mintavétel

Az analízis menetének minden egyes lépése során, kezdve a mintavételtől, a mintaelőkészítéssel át egészen a konkrét mérésig, információváltozással, esetleg információvesztéssel kell számolnunk. Ezen információvesztés sokszor éppen a mintavétel során a legnagyobb mértékű. Akár elemanalitikai feladat, akár módosulatanalitikai eljárás tehát a célunk, pontos és reprodukálható eredményekhez csak megfelelően végzett mintavétellel jutunk. Az eljárást úgy kell elvégezni, hogy az elemzésre szánt mintarészlet reprezentálja a teljes mintát. Abban az esetben, ha viszonylag homogén rendszerrel állunk szemben az átlagmintavétel megoldható egyszeri lokális mintavétellel, ez azonban nagyon ritka. Inhomogén minták esetén több ponton kell mintavételezni. Egyes elemzéseknél (pl. grafitkemencés atomabszorpció), ahol kis mintamennyiségek (0.01g) szükségesek, fontos, hogy a heterogenitásból adódó eltérések okozta hiba az analitikai mérés hibahatárán belül legyen. A homogenizálási művelet folyadék és gáz minták esetében nem okoz különösebb gondot, szilárd mintáknál, amennyiben szükséges, a szemcseméret drasztikus csökkentését jelenti (pl. darálás).

3.2.2 Minták tárolása, módosulatok stabilitása

Módosulatanalitikai méréseknél a tárolás és mintaelőkészítés során esetlegesen bekövetkező veszteségek kiküszöbölésén túl, meg kell őriznünk mintáink fizikai-kémiai állapotát, eredeti módosulat mintázatát. Ez különösen nagy kihívást jelent higanyspeciációs

analízis során, hiszen a környezeti, biológiai és főleg az élelmiszerminták higany tartalma általában nagyon kicsi.

A minták higanyvegyületeinek koncentrációváltozása bekövetkezhet szennyezés révén, a tárolóedény falára történő adszorpció miatt, a higany elpárolgása vagy a módosulatok egymásba való átalakulása során.

A mintákban és standard oldatokban lévő szervetlen higany és szerves higany módosulatok stabilitását különböző fizikai és kémiai paraméterek befolyásolják, úgymint a (1) mátrix, (2) az adott módosulat koncentrációja, (3) a tároló edény fala, (4) a tárolási hőmérséklet, (5) a mintaoldat pH-ja és (6) a fény [Yu et al. 2003].

Az irodalom szerint [Lansens et al. 1990a] a mintákat és az analízisre szánt oldatokat teflon (PTFE) vagy üvegedényekben kell tárolni, a polietilén és PVC edény nem megfelelő az adszorpció veszélye miatt.

Sötétben való tárolással kiküszöbölhető a higany vegyületek (különösen szerves módosulatok) fény hatására bekövetkező fotokémiai bomlása, így a minták és a standard oldatok tárolása is fénytől védett helyen szükséges.

Úgy tűnik, hogy a módosulatok stabilitásában a hőmérsékletnek a fénynél kisebb szerepe van; a metil-higany meglehetősen stabilnak mutatkozik még akár 80-100°C-ra való melegítés során is [Ahmed 1986], a minta oldatokat azonban már csak a fotokémiai bomlás megakadályozása miatt is célszerű hűtőszekrényben tartani.

Szilárd minták mikrobiológiai szempontból történő tartósítására, vagy folyékony halmazállapotú minták koncentrálására jó megoldást jelenthet a minták liofilezése (fagyasztva szárítás). Az eljárás kíméletes voltára jellemző, hogy megőrzi a minta eredeti struktúráját, módosulateloszlását.

Gamma besugárzást referencia minták sterilizálására alkalmaznak általában, ily módon stabilizálni tudják halakból, üledékekből, emberi hajból származó referencia anyagok metil-higany koncentrációját [Quevauviller 1998]. Ugyanakkor míg halminták szárítva vagy nedvesen is jól eltarthatók, addig pl. vérminták fagyasztása illetve az azt követő felolvadás során metil-higany veszteséget észleltek [Horvat 1992].

Vízminták higany módosulatainak stabilitása sokat vitatott kérdés, az azonban bizonyított tény, hogy az alacsony pH és a nagy ionerősség gátolja kationok lerakódását az edény falára, oxidálószer esetleg komplexképző ágens jelenléte pedig segít megőrizni az eredeti (Hg^{2+}) oxidációs állapotot [Yu et al. 2003]. Víz és szennyvízminták konzerválására standard módszerként kálium-bikromátot és salétromsavat használnak [MSZ 2002].

Mind standard oldatok, mind minta extraktumok esetében az oldat koncentrációjának csökkentésével nagymértékben csökken a stabilitás, legyen szó bármilyen módosulatról

[Rosain et al. 1973, Lansens et al. 1990a]. Saját tapasztalataink azt mutatták, hogy a sötét és hűvös helyen tárolt 1000 ppm-es MeHgCl törzsoldat 2-3 hónapig, a 10 ppm-es 1 hétig használható, a hígabb standard oldatokat viszont naponta kell frissen elkészíteni. A mintaelőkészítés során nyert extraktumokat célszerű 24 órán belül analizálni, addig sötét hűvös helyen tárolni.

3.2.3 Mintaelőkészítés összes higany mérése esetén

A mintaelőkészítés elsődleges célja: a mintát olyan halmazállapotba hozni, mely az alkalmazott mérési módszerhez hozzárendelhető. Léteznek olyan technikák, melyeknél a mintaelőkészítés a minták szárítására, homogenizálására korlátozódik, és nem követelik meg a minták folyékony halmazállapotát. Ilyen mérési technika például a neutronaktivációs analízis vagy a kifűtéses atomabszorpciós módszer. Porlasztásos, vagy gázfázisú mintabevitel esetében azonban a mintákat folyékony halmazállapotúvá kell alakítanunk.

A teljes higanytartalom meghatározására esetenként tetrametil-ammónium-hidroxidos (TMAH, képlete : $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$) kezelésre alapozott mintaelőkészítési eljárások [Barbosa 2004, Tao 1998], gyakrabban különböző oxosavakkal (HNO_3 , H_2O_2 , H_2SO_4 , HClO_4), savelegekkel (pl.királyvíz) végzett, megnövelt nyomáson és hőmérsékleten lejátszódó nedves roncsolásos technikák terjedtek el [Evans 2003, Zhou 1996, Bluska 1995, Hight et al. 2005]. Bár az említett nagy hőmérsékletet, olyan hagyományosnak mondható módszerekkel is el lehet érni, mint a laboratóriumi nyomástartó edényzet, a mikrohullámú berendezések térnyerését nem lehet vitatni. Ez utóbbiak esetében nem csupán a mintaelőkészítési idő csökkentése, hanem nagyfokú automatizáltságuk és az akár mintahelyenként szabályozható, dokumentálható és reprodukálható paramétereik (nyomás, hőmérséklet, reflux) igazolják elterjedésüket.

Ezen roncsolásos eljárások célja kettős: egyrészt arra törekszünk, hogy a minta szerves anyag tartalmát tökéletesen elimináljuk, másrészt higany mérésre gyakran alkalmazott hideggőzős technikák esetében fontos, hogy a mintában található higanymódosulatokat azonos formába (Hg^{2+}) hozzuk. Hideggőzős technikák alkalmazása során ugyanis redukáló hatású ón-klorid (SnCl_2) vagy nátrium-borohidrid (NaBH_4) segítségével állítanak elő a roncsolt mintaoldatban lévő Hg^{2+} ionból elemi higany gőzt (Hg^0). Mivel azonban az ón-klorid szelektíven csak Hg^{2+} iont képes kvantitatíven atomos higany gőzzé redukálni, a redukciót megelőzően a mérendő módosulatokat Hg^{2+} -vé kell konvertálni [Oda 1981, Susana Rio-Segade 1999].

A roncsolás során bekövetkező lehetséges veszteségek elkerülésére a zárt berendezések alkalmazásán túl gyakran sósav vagy NaCl használatával segítik elő a Hg^{2+} ion klorid komplexének kialakulását, ezzel oldatban tartását [Adeloju 1987, Louie 1983].

3.2.4 Mintaelőkészítés higanyspeciációs analízis során

A teljes feltárással ellentétben, ahol csak az esetlegesen bekövetkező veszteséget okozó hatásokat kell kiküszöbölni, módosulatanalitikai mintaelőkészítés során meg kell őriznünk az eredeti módosulatokat. Úgy kell kezelni a mintát, hogy a mérni kívánt vegyületek ne szenvedjenek bomlást, ne oxidálódjanak/redukálódjanak, ne alakuljanak át egymásba stb., hiszen a speciációs analitika elsődleges feladata a mintában jelenlévő módosulatok azonosítása. Könnyen belátható, hogy az elemanalitikai meghatározások esetében alkalmazott „drasztikus” beavatkozásokat kerülni kell, ugyanakkor elengedhetetlen követelmény a minél nagyobb kinyerési hatásfok elérése. Amennyiben higanymódosulatok analitikai mérése a feladatunk, a mintavételt követően a következő egymás utáni lépéseket kell elvégeznünk: (1) **feltárás**, melynek során a mátrixban kötött komponenszt felszabadítjuk, (2) **extrakció**, a felszabadított módosulatot elválasztjuk a mátrixtól, — ez sok esetben komponensünk feldúsulását is jelenti az adott fázisban —, (3) a kinyert **módosulatok elválasztása**, (4) végül ezek **detektálása**.

A higanyspeciációs analízis folyamatában igen gyakran alkalmaznak ún. **származékképzési reakciókat**, melyek elsődleges célja gázkromatográfiás elválasztás esetében a komponensek illékony formává alakítása. Nem szabad elfeledkezni azonban azokról a módszerekről sem, ahol a derivatizálás a mintamátrixtól való elválasztást biztosítja; ennek során a detektálást zavaró mátrixhatásokat küszöböljük ki és a komponens mintabeviteli hatásfokát is növeljük egyben.

3.2.4.1 Feltárás

Első lépésében fel kell tehát tárnunk a mintát, vagyis a kötések felbontásával, de az adott módosulat eredeti formájának megtartásával fel kell szabadítanunk a mérendő alkotót a mátrixból, ugyanakkor meg kell akadályozni, hogy a mérendő és a mátrix újból kölcsönhatásba lépjen, readszorbeálódjon.

Biológiai mintákban jelenlévő specieszek felszabadítására leggyakrabban savas kioldást [Ortiz 2002, Rodil et al. 2002, Ipolyi et al. 2004], vagy lúgos feltárást [Cai et al. 1995, Cai 1998, Caricchia et al. 1997, Tseng 1997] alkalmaznak, majd ezt követően egy vagy több extrakciós lépésben választják el a kinyert komponenseket a mátrixtól. A kvantitatív kinyerés eléréséhez elengedhetetlenül fontos, hogy a teljes biológiai szövetet feloldjuk, az adott speciesz (biológiai mintákban főleg metil-higany) és a mátrix szerves anyagai (elsősorban tiol csoportot tartalmazó lipidek és fehérjék) közötti kötések felbontsuk, a szerves mátrixból adódó zavaró hatást minél jobban redukáljuk.

A savas vagy a lúgos hidrolízis valamelyikével „szimpatizáló” szakemberek publikációi pro és kontra sorakoztatják fel érveiket az adott módszer mellett.

Sósavas feltáráson és az azt követő szerves oldószeres extrakciós lépéseken alapuló eljárások voltak az első próbálkozások (lásd később Westöö módszer) higanymódosulatok biológiai mintákból történő kinyerésére.

A sósavas hidrolízis eredményeképpen a minta monoalkil-higany tartalma alkil-higany-klorid (R-Hg-Cl) formában szelektíven extrahálható szerves oldószerbe. A módszer legnagyobb előnyeként tartják számon, hogy gyakorlatilag transzalkilációs folyamatoktól (mintaelőkészítés közben véletlenszerűen bekövetkező pl. szervesetlen higany $\rightarrow$ metil-higany átalakulás) mentes [Bloom 1997, Hintelmann 1999]. Ugyanakkor, a módosulatok integritása mégsem biztosított, hiszen metil-higany degradációról, esetenként párolgási veszteségekről, vagy akár nem megfelelő feltárási hatékonyságról számolnak be egyes források [Tseng 1997]. Sósav helyett salétromsavat alkalmazva, a módosulatok oxidálódhatnak a folyamat során, ecetsavval végezve a hidrolízist pedig nem valósul meg a biológiai szövet teljes feloldása, ami alacsony kinyerési hatásfokot eredményez [Tseng 1997].

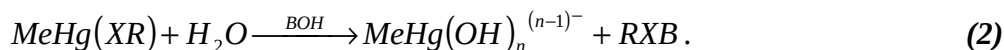
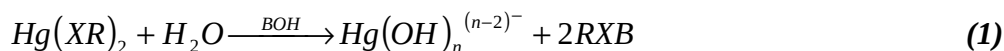
Amennyiben oldószeres extrakciót alkalmazunk a mintaelőkészítés további lépéseiben, a sósavas feltárást nem elég hatásos Hg^{2+} kinyerésére [Tseng 1997], hiszen az eljárás során keletkező HgCl_4^{2-} komplex nem extrahálódik a szerves fázisba.

Végül a módszer legnagyobb hátránya az, hogy mint említettem, a savas kioldást általában több lépéses, szerves oldószeres, majd vizes fázisú „back” extrakciós lépések követnek, így a mintaelőkészítés igen hosszadalmassá, bonyolulttá és hibaforrásoktól terheltté válik. A lépések és ezzel együtt a hibalehetőségek számát tovább növeli, hogy a savas hidrolízis a minták zsírtartalmát (halminták esetében ez igen jelentős lehet) nem távolítja el, vagyis be kell iktatnunk a mintaelőkészítés menetébe egy vagy több zsírtalanítási műveletet is [Ipolyi et al. 2004].

Bár egyes publikációk közel 100%-os extrakciós hatásfokról számolnak be [Ortiz 2002], más közlemények biológiai minták (elsősorban halminták) esetében inkább a lúgos feltárások valamelyikét ajánlják [Tseng 1997, Harrington 2000].

Lúgos közegű feltárást esetében 25%-os metanos KOH reagens oldattal [Cai et al. 1995, Grinberg 2003a, Ramalhosa 2001, Tseng 1997], vagy 25%-os vizes vagy metanos TMAH oldattal [Tseng 1997, Gerbersmann et al. 1997, Ortiz 2002, Qvarnström 2002] kezelik a mintát.

A lúgos hidrolízis során végbemenő kémiai változást szemlélteti a következő két egyenlet, ahol $X : S^{2-}, O^{2-}, N^{3-}$, $B : K^+, TMA^+$: [Tseng 1997]



Az eljárás előnye egyrészt az, hogy a KOH és TMAH reagensok által szolgáltatott erősen lúgos közeg stabilizálja a módosulatok hidroxid formáját, megelőzve ezzel destruktív hatású redoxfolyamatok lejátszódását. Másrészt mindkét lúg kitűnő „szövet-elfolyósító szer”, így alkalmazásuk során megvalósítható a minta teljes feloldása.

Lúgos hidrolízissel, akármelyik reagensről van is szó, nagy zsírtartalmú biológiai minták feltárása is megvalósítható külön zsírtalanítási lépés (pl. toluolos extrakció) beiktatása nélkül.

A higanyspeciációs analízis mintaelőkészítése során alkalmazott lúgos feltárás legnagyobb veszélyforrásának az eljárás során esetlegesen bekövetkező transzalkilációs folyamatokat tartják, melyek eredményeképpen a valóságosnál magasabb metil-higany koncentrációt (pozitív hiba) tulajdonítunk a mintának [Horvat 1999]. Ortiz és munkatársai [Ortiz 2002] dimetil-higany műtermék képződését tapasztalták lúgos hidrolízissel előkészített halminták analízise során, ugyanezen mintákból sósavas feltárással nem jelent meg ez a módosulat. A jelenséget az előkészítési folyamat során véletlenszerűen bekövetkező metilációs folyamatokkal magyarázzák. Más szerzők ugyanakkor nem tapasztaltak hasonló jelenséget és közel 100%-os kinyerési határfokokról számolnak be hiteles anyagminták analízise során [Grinberg 2003a, Liang et al. 1996, Horvat et al. 1993, Tseng 1997].

Esetenként a feltárás folyamatát, akár savas akár lúgos közegben történik, szobahőmérsékleten alkalmazzák. Ezekben az esetekben az eljárás legalább 4-5 óra időtartamot igényel, közben folyamatosan rázatva a mintákat [Yang 2003, Cai 1998, Hardy et al. 1997]. A higanyvegyületek, különösen a szerves formák azonban igen erősen kötődhetnek a mátrixhoz, ezért a feltárás folyamata hatékonyabb és gyorsabb lehet energiabehatásra. Ennek megfelelően, ritkábban hagyományos melegítéssel [Liang et al. 1996, Bulska et al. 1991, Logar 2000], gyakrabban ultrahangos [Cai et al. 1995, Falter et al. 1994b, Segade 1999, Ortiz 2002, Ipolyi et al. 2004] vagy mikrohullámú kezeléssel [Ramalhosa 2001, Tseng 1997, Gerbersmann et al. 1997] kombinálják a savas vagy lúgos kezelést, természetesen szigorúan ellenőrzött és előzetesen optimált paramétersereg mellett.

Ipolyi és munkatársai [Ipolyi et al. 2004] és Segade és munkatársai [Segade 1999] szerint ultrahangos vízfürdőt sósavas feltárással kombinálva 15-30 perc elegendő a minta hatékony feltárására, miközben a módosulatok stabilitása biztosított. Ultrahangos kezeléssel kiegészített lúgos hidrolízis alkalmazása esetén 1-3 óra az optimális feltárási idő, mely kvantitatív kinyerést eredményez és melynek során stabilisak a komponensek [Cai et al. 1995, Fischer et al. 1993].

Mikrohullámú kezeléssel még tovább csökkenthető a feltárás időszükséglete, olyan „enyhe intenzitású”, azaz kis teljesítményű és minél rövidebb idejű behatásnak kell kitenni mintáinkat, mely a módosulatok integritásának megőrzése mellett minél nagyobb hatásfokú feltárást eredményez. Ramalhosa és munkatársai [Ramalhosa 2001] 25%-os metanolos KOH reagens felhasználásával 80-90 W teljesítmény alkalmazása mellett 1 perces, Tseng és munkatársai [Tseng 1997] 40-60 W teljesítmény beállítása esetén 2-4 perces kezelési időt állapított meg hiteles anyagminták felhasználásával. Az eljárás során sem bomlási (metil-higany→szervetlen higany átalakulás) folyamatokat, sem evaporációs veszteséget nem tapasztaltak, 95% feletti hatásfokkal nyerték ki a metil-higanyt a mintákból. Amennyiben savas feltárást mikrohullámú kezeléssel kombinálnak, mind bepárlási veszteség, mind nehezen ellenőrizhető bomlási folyamatok előfordulhatnak, magasabb szervetlen higany koncentrációt eredményezve. Ezt kivédendő, „enyhébb” körülményeket alkalmazva viszont a biológiai szövet nem elég hatékony feltárása okozza az alacsony kinyerési hatásfokokat [Tseng 1997]. Talán ez utóbbi megállapításból adódik, hogy a mikrohullámú kezeléssel kiegészített savas hidrolízis nem tartozik a higanyspeciációs analitika gyakran alkalmazott mintaelőkészítési eljárásai közé.

A feltárás időtartamának csökkentésére egy másik alternatíva lehet a viszonylag újabb keletű ún. fókuszált ultrahangos szonda használata [Perez-Cid et al. 1998]. Cabanero és munkatársai [Cabañero et al. 2005] állati minták szelénmódosulatainak kinyerésére, míg Abranko és munkatársai [Abranko et al. 2007] halminták higanyspeciációs analízise során használták ezen technikát. Az eljárás során a szonda belemerül a mintaoldatba, ott indukál adott amplitúdóval és frekvenciával rezegve ultrahang hullámokat, így közvetlen (nem az edény falán keresztül) és ebből adódóan nagyobb hatásfokú energiaátadás valósulhat meg (szemben az ultrahangos fürdőben végzett, vagy a mikrohullámú feltárással). Elsősorban ez az oka annak, hogy kevesebb idő elegendő a komponensek kinyerésére. A módszer hátrányai között kell említenuünk, hogy egyszerre csak egy minta vizsgálatára alkalmas, valamint a szonda és a mintaoldat közvetlen érintkezése miatt és a minták között nem megfelelően végzett tisztítási művelet eredményeképpen nagy az esetlegesen bekövetkező keresztszennyeződések, memóriahatások veszélye.

Végül fontos megjegyezni, hogy bármilyen fajta energiaközlési módot is választunk a mintaelőkészítés során, az energiaátadás hatásfoka az alkalmazott időtartamon és az energia típusán túl, függ a mintatartó edényzet anyagától, az együtt kezelt minták számától, a roncsolást végző berendezés beállítási paramétereitől, a mintaoldat térfogatától és nem utolsósorban a feltárást végző közegtől.

Az eddig tárgyalt hagyományos melegítéssel, ultrahangos vagy mikrohullámú kezeléssel kiegészített savas, illetve lúgos közegű feltárási eljárások mellett elsősorban környezeti minták, talajok és üledékek higanyspeciációs analízise során, hatékony mintaelőkészítési megoldás lehet a desztilláció [Horvat et al. 1993], illetve a szuperkritikus extrakció CO₂-vel [Emteborg 1996, Lin et al. 1995] is. A desztillációs eljárás kétségtelenül legnagyobb előnye, hogy a mátrixból adódó zavaró hatásokat kiküszöböli, hátránya viszont, hogy a minta szerves alkotórészei alkilálási folyamatokat indukálhatnak a folyamat során, műtermékként keletkező, például metilált higanykomponenseket eredményezve [Bloom 1997]. Etilezéses származékképző reakcióval és hideggőzös atomfluoreszcens (CVAFS) detektálással kombinálva, mindenesetre, mint alacsony kimutatási határokkal jellemezhető szelektív módszert sikeresen alkalmazták talaj,- üledék- és növényi minták analízisére [Liang et al. 1994]. A szuperkritikus extrakciós eljárás magas fokon automatizálható, gyors, és csekély a vegyszerigénye, viszont hatásfoka erősen mátrixfüggő (az üledékek kén- és szerves szén tartalma igen különböző lehet) és általában alacsonyabb a desztillációs módszernél.

Mivel doktori munkám során biológiai és élelmiszerminták vizsgálatával foglalkoztam, az itt nem jellemző desztillációs és szuperkritikus extrakciós mintaelőkészítési eljárások további tárgyalásától eltekintek.

3.2.4.2 Extrakciós eljárások

3.2.4.2.1 Oldószeres extrakció

A feltárást követően a mintából felszabadított mérni kívánt komponenseket el kell választanunk a mátrixtól, erre a célra különböző oldószeres és szilárd fázisú extrakciós technikák szolgálnak.

A higanymódosulatok analízise során alkalmazott, úttörőnek számító oldószeres extrakciós módszert Westöö dolgozta ki az 1960-as években [Westöö 1968]. Vizsgálatait talaj és iszapminták felhasználásával végezte, azóta azonban, kisebb változtatásokkal ugyan, de a Westöö módszer az elterjedt eljárások közé tartozik biológiai minták mérése során is. A folyamat lényege a következő : a minta alkil-higany tartalmát savas feltárást követően, alkil-higany-halogenid (R-Hg-X, ahol X leginkább Cl) formában szelektíven (mint már volt róla

szó a szervesetlen higanyból képződő klorokomplex nem megy át szerves fázisba) szerves oldószerbe extrahálják, kezdetben benzolt, később elsősorban egészségügyi okokból adódóan toluolt használtak erre a célra. Tisztítási célzattal a szerves fázisban lévő módosulatokat ezek után hidroxidként, vagy valamilyen vizes közegben működő komplexképző ágens — leginkább cisztein, tioszulfát vagy valamilyen tiol-tartalmú reagens [Puk 1994a] — segítségével vissza-extrahálják vizes fázisba. Végül a gázkromatográfiás elválasztáshoz, tömény sósav hatására keletkező illékony alkil-higany-klorid formában juttatták vissza a komponenseket a szerves fázisba. A Westöo által kidolgozott első változat óta számos alternatíva látott napvilágot, egyesek más szerves oldószert (pl. hexánt, toluolt, diklór-metánt), mások egyéb kén tartalmú komplexképzőt alkalmaznak a vizes fázisú „back” extrakciós lépésben. Az eljárás utolsó vizes fázis → szerves fázis átmenetét megkönnyítendő, gyakran CuSO_4 adagolásával szorítják ki a metil-higanyt a cisztein komplexből. A módszer egy további változata szerint tömény sósav helyett valamilyen alkil,- vagy aril-származékképző reagenst használnak, melynek eredményeképpen a módosulatok apoláris alkilezett (pl. etilezett) vagy arilezett (fenilezett) származékokként extrahálódnak a szerves fázisba [Ipolyi et al. 2004]. Gázkromatográfiától eltérő elválasztástechnika — HPLC [Hempel 1992, Harrington 2000], kapillár-elektroforézis [Gaona et al. 2003, Hardy et al. 1997] — alkalmazása esetén lehetőség van a vizes fázisból közvetlenül mérni a komponenseket.

Szerves oldószeres extrakció lúgos közegű feltárást is követhet. Ilyenkor a szerves fázisba való átvitelt megelőzően a feltárt mintaoldatot savanyítják általában koncentrált sósavval, vagy sósavas KBr oldattal, melynek célja, hogy a komponenseket jól extrahálható klorid-, vagy bromid formára alakítsák. Minél nagyobb mértékű a savanyítás annál szelektívebb az extrakció metil-higanyra nézve, vagyis annál kevésbé vihető át szervesetlen higany a szerves fázisba [Liang et al. 1996].

Egyes módszerekben az extrakciós lépések során a szerves fázis → vizes fázis átmenetet a szerves oldószer N_2 áramban való elpárologtatásával valósítják meg [Ramalhosa 2001]. Ilyenkor alacsony forráspontú szerves oldószert (pl. diklór-metán, $\text{Fp. } 40^\circ\text{C}$) és alacsony párolgási hőmérsékletet kell alkalmazni, hogy az evaporáció során a könnyen párolgó higany komponensek ne illanjanak el.

Az extraháló oldószer a relatív dúsítás szerepét is elláthatja az előkészítés technikájában. Egy konkrét példával szeretném szemléltetni ezen megállapítást. Ipolyi Ildikó doktori munkája során [Ipolyi 2003], metil-higany biológiai mintákból való meghatározására sósavas feltárást és toluolos extrakciót alkalmazott. A 0,5 g mintához első lépésben 5 ml sósavat, majd 10 ml nátrium-kloridot adott és a kinyert komponenseket aztán 2x4 ml toluolba vitte át. A továbbiakban a vizes fázisban történt ciszteines komplexképzés, majd NaBPh_4 -tal

való derivatizálást követően a metil-higanyt 1 ml hexánban koncentrált. Jól látható, hogy 0,5 g bemért minta metil-higany tartalmát 1 ml hexánban dúsította, vagyis ezen extrakciós technika csupán 2-szeres hígítást eredményez, szemben az elemanalitikai meghatározásokkal, ahol a teljes roncsolások során általában 20-50-szeres hígítási faktorral dolgozunk. Annyira kell a mérendő komponenst az extraktumba koncentrálni, hogy annak koncentrációja az alkalmazott módszer kimutatási határánál nagyobb legyen, és módszerünk lineáris tartományába essen.

3.2.4.2.2 Szilárd fázisú mikroextrakció

Szilárd fázisú mikroextrakciót (solid phase microextraction, SPME), mint egy gyors, oldószermentes extrakciós technikát, az 1990-as évek elején dolgozták ki és alkalmazták először [Arthur et al. 1990, Pawliszyn 1997], „népszerűsége” analitikai körökben azóta is töretlen. Alkalmazási köre folyamatosan bővül, kezdetben csupán illékony szerves komponensek extrakcióját volt hivatott elvégezni, fémorganikus vegyületek módosulatanalitikai meghatározása során történő alkalmazása viszonylag újabb keletű [Mester et al. 2001].

Az SPME — mint azt az elnevezése is tükrözi — két dologban alapvetően különbözik a hagyományos szerves oldószeres extrakciós technikáktól. Az egyik különbség az extraháló fázis halmazállapotában keresendő. Az SPME esetében ugyanis valamilyen nagy fajlagos felületű szilárd adszorbens, vagy nagy molekulatömegű polimer „folyadék” — ami termodinamikailag valóban folyadék, de hasonlóan a kapilláris GC oszlopokhoz szilárd jellegű bevonatként jelenik meg — szolgál extraháló fázisként, és nem valamilyen hétköznapi értelemben vett folyadék, mint pl. toluol, vagy hexán. A másik alapvető különbség a hagyományos oldószeres extrakcióhoz képest az extraháló fázis térfogata, mely SPME esetében kisebb mint 1 μ l, vagyis az extrakció valóban mikroméreteken zajlik.

Az extraháló fázisként funkcionáló szorbens réteg egy néhány centiméter hosszú kvarcórda felületére van felhordva. Ez az aktív szál egy ún. SPME tartóban van elrejtve, melynek részben védelmi szerepe van, másrészt segítségével abból kitolható, illetve visszahúzható az extraháló fázist hordozó kvarcszál.

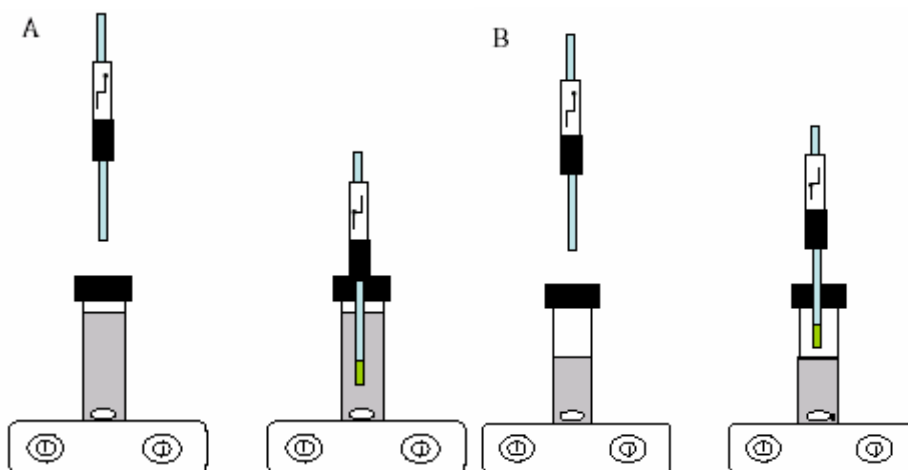
Az SPME elméleti hátterének és kinetikájának leírása megtalálható doktorandusztársam Abrankó László doktori disszertációjában [Abrankó 2006], én részletesebben az alkalmazásával kapcsolatos gyakorlati kérdéseket taglalom. Néhány alapvető elméleti evidenciát azért fontosnak tartok megemlíteni. A szilárd fázisú mikroextrakció többfázisú rendszerekben kialakuló egyensúlyokon alapul. Az extrakció során az egyes komponensek a fázisok között vándorolnak mindaddig, míg az egyensúly be nem áll.

Ekkor a meghatározandó komponens extrahált anyagmennyisége állandó, és független attól, hogy melyik fázisból történt a mintavételezés. A szerves oldószeres, folyadék-folyadék extrakció és az SPME közötti, mintabeviteli hatékonyság szempontjából fennálló lényeges különbség az alkalmazott térfogatarányokra vezethető vissza. Az extraháló fázis és a minta térfogatarányának csökkentésével ugyanis a szorbens rétegben fennálló koncentráció növekszik. Ez azt is jelenti, hogy az SPME esetében alkalmazott mikro-méretű térfogatokban nagyobb lesz a mérendő komponens koncentrációja, mintha az extrakciót nagyobb térfogatú folyadékkal végeznénk. Többek között éppen ebben rejlik az SPME hallatlan előnye a hagyományos oldószeres eljárásokhoz képest.

Fontos megállapítás továbbá, hogy SPME során, ellentétben a hagyományos oldószeres extrakciós eljárásokkal, nem törekszik az analitikus a kérdéses komponens kvantitatív kinyerésére, a legtöbb esetben a néhány ml térfogatú mintából kivont anyagmennyiség csupán 1-10% [Pawliszyn 1997].

Az extrakció gyakorlati megvalósítása során a szilárd vagy folyadék állapotú mintát egy szeptummal lezárt üvegedényben tároljuk. Az extrakció során a szeptumon való áthatolást követően az SPME aktív része, a kvarcszál, a mintaközegbe merül, a kérdéses komponensek megkötődnek, vagy „beleoldódnak” az extraháló fázisba. Az extrakciót végezhetjük a minta feletti gőztérből (headspace módon), vagy közvetlenül a folyadékfázisból (immerziós módon). Ezt szemlélteti a **3. ábra**.

3.ábra. SPME eljárás : (A) folyadékfázisból, (B) gőztérből.



A megkötött mintarészlet és a kérdéses komponensek ezek után általában GC fűtött injektorába kerülnek, ott a magas hőmérséklet hatására gyorsan deszorbeálódnak. Értelmszerűen olyan injektor hőmérsékletet kell alkalmazni, melynek hatására a

komponensek még nem bomlanak, de lehetőleg maradéktalanul lefűtődnek az SPME szálról. Ritkábban ugyan, de előfordul, hogy szilárd fázisú mikroextrakciót folyadékkromatográfiás elválasztással kombinálnak, ilyenkor az SPME-vel kinyert komponenst ún. „liquid” deszorpciós eljárással gyakorlatilag vissza-extrahálják valamilyen oldószerbe [Jia 1998].

Akár gőztéri, akár immerziós módszert fejlesztünk, számos tényező hatását szükséges vizsgálni, a paramétereket kontroll alatt tartani, optimalni kell. Ilyen paraméterek : a szorbens réteg minősége, a következő fejezetben tárgyalandó származékképzési reakciók minősége, az extrakciós idő, a hőmérséklet, a mintaoldat pH-ja, ionerőssége, a mintaoldat mátrixának polaritása, a mintaoldat/gőztér aránya...stb.

Az általánosan használt SPME töltetekről a témával kapcsolatban megjelent összefoglaló irodalmakból [Mester et al. 2001, Mester et al. 2005] nyerhetünk áttekintést. A megfelelő töltet kiválasztása alapos körütekintést igényel, elsősorban az extrahálandó komponens polaritásához és illékonyságához kell igazítani módszerünket. Alkilezett metil-higany komponensek vizsgálatához például az illékony apoláros komponensek extrakciójára szolgáló polidimetil-xiloxán (PDMS) töltet a megfelelő, ugyanakkor a polárosabb metil-higany-klorid származékot polidimetil-xiloxán/divinil-benzol (PDMS/DVB) szorbens réteg vonja ki jó hatásfokkal a mintából [Mester 2000]. Az extrakció mechanizmusa a szorbens réteg minőségétől függ. „Polimer folyadék” szorbens réteg esetén — ilyen az előbb említett PDMS is — adszorpció jellegű folyamatok zajlanak, komponensünk gyakorlatilag beoldódik az extraháló fázisba. Szilárd töltetek — pl. PDMS/DVB — alkalmazásakor ellenben felületi kötődés, adszorpció révén extrahálódnak a komponensek. Az adszorpcióra alapozott technika sokkal specifikusabb, a kérdéses komponens szelektív kivonására alkalmas bonyolult mátrixból is. A kevésbé szelektív adszorpciós töltetek használatát viszont erősen limitálja, ha az adott körülmények között több extrahálható komponens is van a mintában.

Jól reprodukálható eredmények eléréséhez törekedni kell arra, hogy az extrakciót egyensúlyi rendszeren hajtsuk végre. Ez azt jelenti, hogy meg kell várni, míg gőztéri mintavétel esetében a mintaoldat és a gőztér, illetve a gőztér és az SPME szál között, immerziós módszernél a mintaoldat és az SPME szál között beáll az egyensúly. Ilyenkor ugyanis az extrahált komponens mennyisége állandóvá válik. A kérdéses vegyületek, diffúziós sebességüktől függően, különböző idő alatt jutnak egyensúlyi állapotba, így az egyes komponensek esetében különböző extrakciós idővel kell számolnunk. Az egyensúly beállításához szükséges időt általában mechanikus behatás (pl. mágneses keverés) alkalmazásával csökkentik.

A pH változtatásával növelhetjük az extrakciós hatásfokot savas vagy bázikus karakterű komponensek esetében. Ez abból a tényből következik, hogy a szilárd fázisú

mikroextrakció — hacsak nem ioncserélő töltetet használunk — semleges (nem ionos) módosulatok extrakcióját hivatott elvégezni. Megfelelő pH beállításával pedig elérhető, hogy gyenge savak és bázisok semleges formában álljanak rendelkezésre.

A mintaoldat ionerősségét növelve (pl. NaCl oldat adagolásával) is fokozható az illékony apoláris származékok extrakciója [Moens et al. 1997]. A folyamat hajtóereje a fázisok közti „magnövelt” polaritás különbség. Könnyen párologó szerves oldószer bizonyos koncentráció feletti (kb. 1%) jelenléte viszont csökkenti a kérdéses komponens extrakciójának hatásfokát. Ennek oka, részben a fázisok közti csökkent polaritás különbség, részben az a tény, hogy az oldószer párolgása révén nagy hányadban lesz jelen a gőztérben, így versenyhelyzetbe kerül az SPME szál kötőhelyeiért [Pawliszyn 1997].

Illékony komponensek extrakcióját célszerű gőztérből, headspace módon végezni. Az ilyen extrakciós eljárásnak több előnye van, mindegyik abból a tényből származik, hogy az SPME szál és a mintamátrix nem érintkezik, sok esetben szinte tökéletes mátrix szeparációt biztosítva. Az extraháló fázis védve van a mátrix egyéb szerves és nem illékony komponenseinek károsító hatásáról, lehetőség van pl. a mintaoldat pH-ját akár extrém módon is változtani az SPME szál károsodása nélkül. Az eljárás hátránya, hogy kevésbé illékony komponensek esetében esetleg irreálisan hosszú extrakciós idővel kell számolnunk.

Folyadékfázisból történő extrakció esetében az SPME szál és a mintaoldat közvetlen érintkezése miatt nagyobb a veszélye a károsodásnak, a mátrixtól való szeparáció is nehezkesebb. Mindazonáltal sok kevésbé illékony komponens hatékony extrakciója valósítható meg ilyen módon.

A fentiek alapján, illetve a leírtakat kiegészítve fontos hangsúlyozni, hogy az SPME során egy lépésben valósul meg az extrakció, egy igen nagymértékű dúsítás és a mintabevitel. Ebből adódóan gyors, egyszerűbb mintaelőkészítést tesz lehetővé, ezáltal hibalehetőségektől kevésbé terhelt, mint a hagyományos oldószeres extrakciós eljárások. Alkalmazásával kiküszöbölhető a sokszor költséges és egészségtelen szerves oldószerek használata. Egyes szakemberek hátrányként említik, hogy használatával esetenként nem kielégítően reprodukálható (10% RSD) eredmények születnek [Yang 2003, Martos et al. 1997], mely az SPME szálak inhomogenitásával és elhasználódásával magyarázható. Az SPME szálak átlagos „életideje” egyébként 100-150 extrakcióra terjed ki.

3.2.4.3 Származékképzés

A mérendő komponens derivatizálását több dolog teheti ajánlatossá vagy szükségessé az analízis során. Az eljárás elsődlegesen gázkromatográfiás elválasztást megelőzően, a mérendő komponensek illékony származékokká alakítását szolgálja. Ugyanakkor számos

speciációs technika megköveteli a folyadékkromatográfiás módszerrel elválasztott alkotók derivatizációját a technika érzékenységének növelése érdekében. A származékképzés sok esetben azonban az extrakciós folyamat részeként a mátrixtól való szeparációt is biztosítja.

A származékképzési módszerek lényege, hogy a feltárt mintaoldatban található kérdéses komponensekből, valamilyen kémiai reakció segítségével könnyen, esetleg szelektíven extrahálható származékot, illetve amennyiben gázkromatográfiás elválasztással dolgozunk, illékony terméket képezzünk. Ez utóbbi esetben az illékony származék vagy szerves oldószerben oldva, vagy a folyadékfázisból kihajtva gázfázisú mintaként kerül elválasztásra.

Higanyspeciációs analízis során alkalmazott különböző derivatizációs eljárásokról a **3. táblázat** kíván összefoglaló áttekintést adni.

Az előzőekben a Westöö módszer kapcsán érintőlegesen említettem már a módosulatok klorid formává, vagy egy másik alternatíva esetében alkilezett származékokká való átalakítását, melynek célja a mátrixtól való szeparálás. Ilyenkor a gázkromatográfiás elemzésre szánt szerves fázist (pl. hexán) a származékképzővel egyidejűleg adagoljuk, mely a keletkező komponenseket — lévén ezek illékony apoláris molekulák — oldja [Ipolyi et al. 2004].

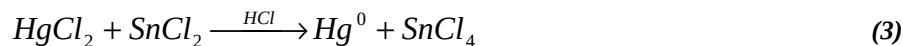
Mivel doktori munkám során elsősorban szilárd fázisú mikroextrakciót alkalmaztam a mintaelőkészítések során, így a fent említett derivatizációs eljárások közül az SPME-vel leggyakrabban kombinált reakciókkal foglalkozom bővebben.

Az SPME legkiterjedtebb alkalmazási köre az apoláris illékony komponensek extrakciója, melyet értelemszerűen általában gázkromatográfiás elválasztás követ. Higany komponensek esetében ugyan találunk példát közvetlen, derivatizáció nélküli SPME-ra — pl. dimetil-higany mérése gáz kondenzátumokból [Snell 1996] — az esetek döntő többségében azonban az extrakciót megelőzi, a feltárt mintaoldatban sokszor ionos állapotban lévő komponensek illékony semleges molekulákká történő átalakítása. A **4. táblázat** áttekintést ad az SPME-vel kombinált derivatizációs eljárásokról higanymódosulatok mérése esetében.

3. táblázat. Higanyspeciációs analízis során alkalmazott derivatizációs eljárások.

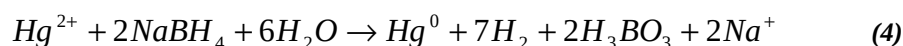
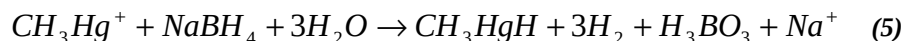
1. **Atomos higany gőz (Hg^0) előállítása** szervesetlen higanyból

- sósavas ón-klorid ($SnCl_2$) oldattal (a reakció szelektíven csak szervesetlen higannyal megy végbe) [Hatch et al. 1968, Segade 1999]



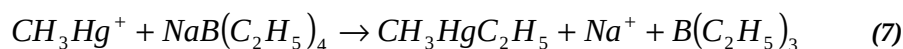
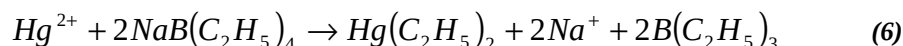
Érdemes megemlíteni, hogy noha ezen reakciót sósavas közegben szokták végezni, a folyamat erősen lúgos közegben is végbe megy. Geológiai minták mérése során például, így sikerült a nemes fémek okozta zavaró hatásokat kiküszöbölni [Bartha et al. 1982].

- sósavas nátrium-tetrahidroborát ($NaBH_4$) oldattal [Tseng 1997]

2. **Hidridfejlesztés** metil-higanyból sósavas $NaBH_4$ oldattal [Tseng 1997]3. **Higany-kloridok előállítása**, melynek során a szervesetlen higanyból $[HgCl_4]^{2-}$ komplex, metil-higanyból illékony $MeHgCl$ keletkezik [Fragueiro 2004]4. **Alkilezés, vagy arilezés**

- Grignard reagenssel szerves fázisban [Emteborg et al. 1999]
- tetraalkil(vagy aril)borátos vizes fázisban [Grinberg 2003a, Cai et al. 2000, Fischer et al. 1993, Palmieri 2000],

— *etilezés* nátrium-tetraetil-boráttal ($NaBEt_4$), *propilezés* nátrium-tetrapropil-boráttal ($NaBPr_4$), vagy *fenilezés* nátrium-tetrafenil-boráttal ($NaBPh_4$) ; példaként az etilezés reakcióegyenletét mutatom be :



Az etilezett, fenilezett vagy propilezett származékok a leginkább alkalmasak szilárd fázisú mikroextrakcióra, hiszen stabilabbak a hidrideknél és apolárosabbak a kloridoknál. Mindezekén túl a nátrium-tetraalkil/tetraaril-borát reagenssek mind a szerves, mind a szervesetlen módosulatokból nagy hatásfokkal képeznek származékot. Vizes oldatban alkalmazhatóak, egyrészt lehetővé téve ezáltal az *in situ* alkalmazást ; másrészt biztosítva az apoláris illékony komponensek SPME-vel történő elválasztásához szükséges poláris, adott esetben nagy ionerősséggel bíró, az apoláris komponensek gőztérbe való kilépését segítő mintaközeget.

4 táblázat. Származékképzéssel kombinált SPME alkalmazások a higanyspeciációs analízisben.

származék	az extrakció módja, (ajánlott szorbens réteg)	forrás
kloridok	gőztéri ill. immerziós (PDMS/DVB)	[Mester 2000] [Fragueiro 2004]
hidridek	főleg gőztéri (PDMS)	[Fragueiro 2004] [He 1998]
etilezett származékok	főleg gőztéri (PDMS)	[Grinberg et al. 2003b] [Cai et al. 1995]
fenilezett származékok	főleg gőztéri (PDMS)	[Grinberg 2003a] [Delgado et al. 2007]
propilezett származékok	főleg gőztéri (PDMS)	[Grinberg 2003a] [Yang 2003]

A származékképzést többnyire savas vagy lúgos hidrolízist követően a feltárt oldatban, vagy vizes extraktumban végezzük. A tapasztalat azt mutatja, hogy ennél a technikánál a mintaoldat pH-ja és a származékképző reagens koncentrációja a kritikus paraméter. Az utóbbit illetően a származékképző reagenst mindig több nagyságrendnyi feleslegben adagolják, ugyanis *in situ* alkalmazásnál a mátrix egyéb komponenseinek származékképző hatását is kompenzálni kell. A pH-t és a reagens stabilitását figyelembe véve a fenilációs és a propilációs eljárás robosztusabb megoldást jelent a legelterjedtebben alkalmazott etilezésnél. A NaBPh₄ és NaBPr₄ reagensek viszonylag nagy pH intervallumban, míg a NaBEt₄ szigorúan pH=5-nál működőképes. Az előbbieket stabilabbak az utóbbinál, bár egy idő után azok is inaktívvá válnak [De Smaele et al. 1998]. A NaBEt₄ „népszerűségét” annak köszönheti, hogy nagy affinitással képez minden higany módosulattól igen illékony, jól extrahálható és viszonylag stabil származékokat. Hátrányként szokták említeni ugyanakkor, hogy használatával nem lehet különbséget tenni a minta szervesetlen higany, és etil-higany tartalma között — hiszen mindkettőből dietil-higany képződik a derivatizáció során — noha az utóbbi nem igen fordul elő biológiai mintákban. A fenilezési reakció lassabb a másik kettőnél, előnye viszont, hogy használatával megkülönböztethető a szervesetlen- és az etil-higany, valamint hogy a NaBPh₄ reagens jóval olcsóbb a másik kettőnél. Grinberg és munkatársai szerint [Grinberg 2003a] a NaBPr₄ használatával véghezvitt propilezés tekinthető a legjobb megoldásnak higany alkotók illékonná tételére, mert bár ez az eljárás a legdrágább, ezen

reagens a NaBEt_4 -hez hasonlóan nagy affinitással képez minden módosulatból illékony származékot az etilezéshez képest robosztusabb körülmények között.

Mint korábban már volt arról szó, gyakran szükséges ún. dúsítási lépést beiktatni az analízis folyamatába. Ezt a lépést vagy a minta kis higanytartalma, vagy éppen a rendelkezésre álló mérőműszer nem kielégítő érzékenysége követeli meg. Sokszor az extrakciós folyamat látja el a relatív dúsítás szerepét, utalnék itt akár az oldószeres eljárások, de még inkább az SPME kapcsán leírtakra. A származékképzés során többé-kevésbé megvalósuló mátrixmentesség, valamint a mintabevitel nagy hatásfoka már önmagában is megnöveli módszerünk érzékenységét, mely még tovább növelhető kriogén csapdázással [Tseng 1997, Fischer et al. 1993] vagy különböző szorpciós eljárásokkal [Lee et al. 1989, Lansens et al. 1990b]. Kevésbé népszerű dúsítási megoldás lehet még az elektrokémiai elődúsítás [Ergucyener 1988].

3.2.5 Elválasztástechnika a higany módosulatanalitikában

A higanyspeciációs analízisben a módosulatok elválasztására az esetek túlnyomó részében gázkromatográfiás, kisebb részében folyadékkromatográfiás eljárások szolgálnak. Mindezeknél akadnak kapillár elektroforézist (CE) [Medina et al. 1993, Hardy et al. 1997] felhasználó technikák, illetve nem-kromatográfiás elven alapuló szeparációs módszerek. Ez utóbbiak nyilván csupán egy vagy két módosulatot tartalmazó minták analízise során alkalmazhatók hatásosan. Ide tartoznak többek között azon szelektív oldószeres extrakciós eljárások is, melyek csak az egyik módosulatot viszik át az analizálandó fázisba (pl. klorid-formaként csak a metil-higany megy át szerves fázisba, a szervesetlen higany nem). A szervesetlen higany és a metil-higany ón-kloriddal szemben mutatott eltérő viselkedése — nevezetesen, hogy az SnCl_2 szervesetlen higanyt képes elemi higannyá redukálni, metil-higanyt nem — ugyancsak lehetővé teszi a két módosulat nem-kromatográfiás szeparációját. A komponensek SnCl_2 -dal végzett szelektív redukciója általában áramoldatos rendszerben (flow injection) „on-line” történik, melyet valamilyen hideggőzős atomspektroszkópiai detektálás (CV-AAS, vagy CV-AFS) követ [Segade 1999, Ortiz 2002]. Hasonlóan az eddigiekhez, az elődúsítás kapcsán már említett szorpciós töltetet hordozó minikolonnák alkalmazása során is megvalósítható az említett két módosulat „flow injection” rendszerben történő elválasztása [Wei et al. 1992]. Végül egyes irodalmi források [Sanchez Uria et al. 1998] beszámolnak olyan eljárásokról, ahol a komponensek fotooxidációját előidézve két lépésben mérik illetve számolják a kérdéses specieszek koncentrációját. Az első lépésben a Hg^{2+} koncentrációt mérik hagyományosan hideggőzős technikával, a második lépésben pedig a MeHg

fotooxidációját követően összkoncentrációt határoznak meg. A minta MeHg tartalmát azután a két mérés különbségéből számolják.

Kétségtelen, hogy ezen nem-kromatográfiás módszerek egyes esetekben megoldást jelentenek, nem vitatható azonban, hogy valódi minták nagy tömegének eredményes, pontos mérését, egy kromatográfiás egységet és egy lehetőleg minél nagyobb érzékenységet biztosító, általában valamilyen atomspektroszkópiás detektort tartalmazó kapcsolt rendszerek biztosítják. A higany módosulatanalitikában az esetek túlnyomó többségében ezen kapcsolt rendszerekben a komponensek elválasztását gázkromatográfiásan oldják meg.

A gázkromatográfiás (GC) elválasztáshoz a mérendő módosulatoknak megfelelően illékonnak, de termikusan stabilnak kell lennie, ami a higany esetében jól kézbentartható és könnyen kivitelezhető derivatizációs technikákkal biztosítható. A klasszikusnak számító eljárás során a komponenseket klorid származékokként töltetes kolonnát alkalmazó GC-s elválasztásnak vetették alá, majd elektronbefogásos (ECD) detektálást alkalmaztak. Az alkalmazás során azonban a szerves analíziseknél általában fellépő problémákon — pl. csúcsszélesedés (tailing), melyet az állófázis szennyezettsége, vagy a komponens termikus bomlása okozhat az állófázison ; vagy mátrixhatás, mely valódi minták mérése során intenzitáscsökkenést eredményez, illetve a változó, sokszor nem kielégítő felbontás..stb. — kívül egyéb nehézségek (pl. „túl erős” adszorpciós folyamatok a poláros karakterű higany-klorid vegyületek és az állófázis között) is adódtak. Ezeket megelőzendő a mérések előtt benzolban vagy toluolban oldott HgCl_2 oldattal passziválták az állófázist, amely azonban korán sem jelentett végleges megoldás [Horvat et al. 1990].

Kapilláris kolonnák (apoláris karakterű fenil-, vagy metil-polisziloxán fázisú) használata és/vagy a módosulatok kloridok helyett apoláris illékony alkil-, vagy arilszármazékokként való elválasztása sokkal reprodukálhatóbb, hatékonyabb szeparációt, jobb felbontást eredményez [Bulska et al. 1991, Bulska 1992, Rubi et al. 1992]. A higany módosulatanalitikában használatos különböző töltetes és kapilláris kolonnákkal több publikáció is foglalkozik [Rubi et al. 1992, Baeyens 1992, Lansens et al. 1991]. Az igen kis ($\sim 1\mu\text{l}$) mintatérfogatot igénylő kapilláris kolonnák alkalmazása azonban feltétlenül indokoltá teszi és megköveteli a mérendő komponensek elválasztás előtti dúsítását, akár szorpciós csapdázási eljárásokkal [Lobinski 1998], akár szilárd fázisú mikroextrakció alkalmazásával [Grinberg 2003a].

SPME-t követően az extrahált komponensek „sikeres” deszorpciójához jóval szűkebb (speciálisan SPME-hoz tervezett) üvegbetéttel (liner) kell felszerelni az injektort, mint amilyen a hagyományosan alkalmazott oldószeres mintabevitelt kiszolgáló split/splitless injektorokban használatos. Következik ez mindabból, hogy míg az utóbbi esetben a szerves

oldószer pillanatszerű elpárolgásából adódó nyomásnövekedés csak „nagy expanziós térrel” küszöbölhető ki — pl. 1 µl hexán 138 kPa nyomáson és 200 °C-on 120 µl gőztérfogatot eredményez, így az injektorban legalább 150 µl expanziós térfogatot kell biztosítani —, addig SPME-val oldószерmentes, gázfázisú mintabevitel valósítható meg.

A gázkromatográfia előnye a jó elválasztási képesség, az egyszerű összekapcsolhatóság a detektorokkal. Kapilláris kolonnákat és szelektív detektorokat alkalmazva a technika igen érzékenyvé tehető. Problémát okozhat ugyanakkor a rendszer rendkívüli tisztaság és inertség igénye, melyet azonban pl. SPME alkalmazásával (főleg gázfázisú mintavétel esetében) többé-kevésbé sikerül biztosítani.

A higany módosulatanalitikában alkalmazott nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerekről kitűnő áttekintést kaphatunk Harrington összefoglaló cikkéből [Harrington 2000]. Az alkalmazott HPLC-s módszerek szinte kivétel nélkül szilikagél alapú állófázist használó, fordított fázisú eljárások. A mozgófázis mindig tartalmaz valamilyen szerves módosítót, kelátképző reagenst, esetleg puffert. A higanyspeciációs analízisben kisebb jelentőségű ioncserés kromatográfia lehetővé teszi a polárisabb és ionos módosulatok közvetlen szeparálását, ezáltal az egyszerűbb mintaelőkészítést [Qiang 2003].

A HPLC nagy előnye a gázkromatográfiás módszerekkel szemben, hogy nincs szükség bonyolult derivatizációs lépésekre a nem illékony, illetve ionos szerves komponensek elválasztásához, valamint rugalmasabb, sokkal több variációs lehetőség áll rendelkezésünkre a kivitelezéshez. Az elválasztás hatékonysága viszont nem ér fel a GC-val. A folyadékkromatográfiás módszerek legnagyobb hátrányának sokáig a hagyományosan alkalmazott HPLC detektorok nem kielégítő érzékenységét tekintették. Manapság azonban elemszelektív és érzékenyebb atomspektroszkópai detektorokkal, vagy tömegspektrométerrel összekapcsolva sikeresen alkalmazzák a higany módosulatanalitikában, bár a technika érzékenysége így sem éri el a GC- és elemszelektív detektorból álló kapcsolt rendszerekét.

Akármilyen kromatográfiás technikát alkalmazunk, az általános elválasztástechnikai problémákon túl kulcsfontosságú kérdés a detektorokkal való on-line összekapcsolás, a megfelelő felbontást biztosító, de a detektor optimális működéséhez szükséges térfogatáramok összehangolása.

Gázkromatográfiás elválasztás esetében az oszlopról eluálódó komponensek közvetlenül betáplálhatók az atomforrásba. Az egyedüli problémát a gázfázisú minta esetlegesen bekövetkező kondenzációja jelentheti, mely a kolonnatérből az atomforrásba történő haladás közben, lehűlés miatt következhet be. Ezt kivédendő különböző fűthető,

termoszálható „interface” típusokat alkalmaznak [Fernández 2000, Montes-Bayon M. 1999, Puk et al. 1994b, Wilken 1992].

HPLC oszlop és az atomforrás számára aeroszolt előállító porlasztók kapcsolása is egyszerűen megoldható egy rövid (minél kisebb legyen a holtterfogat) teflon csővel, ügyelve az áramlási sebességek kompatibilitására. A nehézséget itt az okozza, hogy a hagyományos pneumatikus porlasztók hatásfoka igen alacsony (1-3%), és ez nagymértékben behatárolja módszerünk érzékenységét. Ezt a problémát úgy oldják meg, hogy az elválasztást követően a módosulatokból derivatizálással (gyakrabban SnCl_2 , ritkábban NaBH_4 hatására) atomos Hg gőzt állítanak elő on-line módon, mely aztán folyadék-gáz szeparációt követve gyakorlatilag 100%-os hatásfokkal betáplálható az atomforrásba. Ezen on-line derivatizációs reakció nem lehet olyan bonyolult, mint a gázkromatográfiás elválasztásra alkalmassá tevő származékképzési reakciók, de a megfelelő fizikai, kémiai paramétereket itt is biztosítani kell. Az ón-kloridos reakció szelektív voltából adódóan a szerves módosulatokat a redukciót megelőzően Hg^{2+} -vé kell oxidálni. Megoldásként szóba jöhet kálium-bikromáttal való oxidáció [Munaf et al. 1990], UV besugárzással előidézett fotooxidáció [Falter et al. 1994b], vagy savas kálium-perszulfátos kezelés [Costa-Fernandez 1995].

3.2.6 Detektálás

A speciációs analízisben általánosan elfogadott tény, hogy a valódi minták elemzéséhez szükséges érzékenységet és szelektivitást kromatográfiás egységből és elemszelektív detektorból álló on-line kapcsolt rendszerek biztosítják. A hagyományos kromatográfiás detektorok nem szelektívek a mérendő komponensekre, és nem biztosítják a nyomelemek méréséhez szükséges érzékenységet sem.

Az első módszerfejlesztések a higany módosulatanalitikában gázkromatográfiás elválasztásról és azt követően elektronbefogásos (ECD) detektálásról szóltak. A detektor nem szelektív volta miatt, azonban sokkal szerencsésebb megoldásnak tűnt valamilyen atomspektroszkópai folyamatot — emissziót, abszorpciót, vagy fluoreszcenciát — felhasználni a detektáláshoz.

Az atomemissziós detektorok közül viszonylag alacsonyabb ára, ezáltal könnyebb elérhetősége, üzemeltetése, és főleg nagy érzékenysége miatt leginkább a mikrohullám indukált plazma atomemissziós spektroszkópia (MIP-AES) terjedt el [Bulska et al. 1991, Carro-Diaz et al. 1994, Emteborg 1996, Mena 1995]. Gázkromatográfiás elválasztással — mely hatékony szeparációt biztosít — kombinálva (GC-MIP-AES) népszerű technikának számít a higanyspeciációban.

Az 1960-as években a higanymérésre használt atomabszorpció (AAS) és atomfluoreszcens (AFS) berendezések hagyományos, láng atomforrással működő készülékek voltak, a mintabevitelt porlasztással valósították meg. A technika, elsősorban kimutatási határa (kb. 100 ng ml^{-1}) miatt, azonban nem volt megfelelő valódi minták, pl. vízminták mérésére.

Az 1970-as évektől kezdődően aztán ezen berendezések hideggőzös, „cold vapor” (CV-AAS, CV-AFS) változatait kezdték használni higanymérésekre [Ure 1975]. A hideggőzös eljárások lényege, — kihasználva a higany azon kivételes tulajdonságát, hogy redukált állapotban stabilis szabad atomokként van jelen — hogy a detektorba stabilis atomos Hg gőz jut, vagyis ott atomizálni már nem kell. Az atomos Hg gőz generálása történhet közvetlenül vagy közvetve kémiai úton, ón-kloridos, vagy nátrium-borohidrides redukcióval, gyakran flow injection módon [Segade 1999, Ortiz 2002], mely gyors, automatizálható és szennyeződésektől kevésbé veszélyeztetett meghatározást tesz lehetővé. Hatch és munkatársai [Hatch et al. 1968] alkalmaztak először ón-kloridos redukciót követően láng nélküli AAS módszert különböző talajok és kőzetek higanytartalmának mérésére. Ezen technika mintegy 2-3 nagyságrenddel alacsonyabb kimutatási határral rendelkezett, mint a lánggal megvalósított atomizáláson alapuló eljárások.

Az 1980-as évektől kezdődően általánossá váltak és mind jobban elterjedtek a fent említett hideggőzös technikák elemanalitikai mérésekben, gyakran nem-kromatográfiás elválasztást alkalmazó módosultanalitikai eljárásokban, illetve egyes folyadékkromatográfiás speciációs mérések során. Gázkromatográfiás elválasztást követő AAS vagy AFS detektálás esetén, a GC oszlopról eluálódó gázfázisú komponensek detektor előtti atomizálása termikus bomlás révén történik [Cai et al. 2000, Gomez-Ariza et al. 2005, Fischer et al. 1993].

Azon túl, hogy az eljárás az abszorpció ill. fluoreszcencia elvéből adódóan higanyspecifikus, jóval érzékenyebb is, mint a porlasztásos mintabevittel dolgozó spektroszkópai módszerek. Következik ez mindabból, hogy a Hg gőzzel nagy hatásfokú mintabevitelt tudunk elérni, a hatékony mátrixszeparáció miatt nem kell spektrális zavaró hatásokkal számolni, valamint az elemi Hg-t, inertségéből és viszonylagos stabilitásából adódóan elég nagy koncentrációban képes szállítani a vivőgáz anélkül, hogy reakcióba lépne vele. Az érzékenység tovább növelhető, ha a detektálás előtt a higanygőzt amalgámképzés révén elődúsítják [Liang 1993, Bartha et al. 1982].

Az érzékenységét és szelektivitását tekintve kifejezetten előnyös tulajdonságokkal bíró grafitekemencés atomabszorpció spektroszkópia (GFAAS) speciációs alkalmazását korlátozza, hogy szakaszos működéséből adódóan on-line módon nem kapcsolható kromatográfiához. Mindezek ellenére off-line alkalmazására — a kromatográfiásan

elválasztott komponensfrakciókat összegyűjtik, aztán egyenként elemzik — találunk példát az irodalomban [Filippelli 1987].

Napjainkban az induktív csatolású plazma tömegspektrometria (ICP-MS) a szerves speciació analitikájában a legelterjedtebben alkalmazott és legérzékenyebb szimultán multielemes elem(tömeg)specifikus detektor. Elterjedése a higany módosulatanalitikában is vitathatatlan [Vanhaecke 1999]. Akár GC-vel akár HPLC-vel kapcsolva kiemelkedően szelektív és érzékeny technika, az optikai emissziós detektálásokhoz képest nagyobb tartományban lineáris. Az atomabszorpciós és atomfluoreszcens detektálással szemben legnagyobb előnye multielemes volta, valamint az, hogy alkalmazásával lehetőség nyílik izotóphígításos mérések elvégzésére [Yang 2003, Heumann et al. 1998].

ICP helyett „lágyabb” ionizációt megvalósító ionforrások is használatosak a higany speciacióban, amik a szerves módosulatot, mint molekulát mérik, többtinformációt szolgáltatva az adott komponens struktúrájáról [Muranszky 1999]. Példaként említeném továbbá Ipolyit és munkatársait [Ipolyi et al. 2004], akik elektronütközéses (electron impact, EI) ionforrást, mint tipikus gázionforrást alkalmaztak GC-MS rendszerükben kagylóminták metil-higany tartalmának mérésére; vagy Harringtont és munkatársait [Harrington 1998], akik hiteles anyagminták HPLC-MS technikával megvalósított higanyspeciació analíziséről számolnak be. Vizsgálataikban folyékony halmazállapotú mintát igénylő atmoszférikus nyomáson működő kémiai ionizációt megvalósító ionforrást (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) alkalmaztak.

Végül visszatérve az ICP-MS-hez, egy a higanyra nagyon jellemző, és a mérések precizitását sokszor veszélyeztető, sőt a méréseket sokszor ellehetetlenítő jelenségről még említést kell tenni. Nevezetesen, hogy a higany képes odatapadni, adszorbeálódni a tárolóedény falára, különösen folyadékfázisú mintabevitel esetében figyelték ezt meg a pneumatikus porlasztók ködkamrájának falán, illetve a szállító csövekben [Campbell 1992]. Az így kialakult memória hatás egy sor problémát vonhat maga után. Hosszabb ideig tartó öblítést kell alkalmazni a minták között, a kalibrációs görbe elvesztheti linearitását, a mérés során csökken az érzékenység, vagy a jelintenzitás erősen mátrixfüggővé válik [Harrington et al. 2004]. Felmerülhet a kérdés, hogy ha a jelenség a porlasztással függ össze, miért csak az ICP-MS kapcsán hallani a problémáról. Ennek az az egyszerű oka, hogy a valódi minták kis higanytartalmának mérése során igényelt „nagy” érzékenységet porlasztásos mintabevitelt alkalmazva gyakorlatilag csak ICP-MS detektálással lehet biztosítani. Szinte az összes többi esetben gázfázisú mintabevittel valósul meg a komponensek „behajtása” a detektorba, ami persze abból is következik, hogy a módszerek nagy része gázkromatográfiás elválasztáson

alapul. A jelenség eliminálására számos megoldás született több-kevesebb sikerrel, nevezetesen HBr-os mosás, ammónia/Triton X-100/EDTA-, 2-merkaptoetanol- vagy cisztein adagolása a vivőoldathoz [Li 2006].

3.3 Minőségbiztosítás a módosulatanalitikában

Az elemanalitikai eljárásokra vonatkozó minőségbiztosítási követelmények ma már az Európai Unió irányelvek között szerepelnek. Ugyanakkor az egyre szélesebb körű igényeket kielégítő speciációs technikák minőségbiztosítása is aktuális, sürgető kérdés. Minden minőségbiztosítási szempontot, melyet az elemek összkoncentrációjának meghatározásánál már rutinszerűen kezelünk, figyelemmel kell kísérni a speciációs feladatok megoldása során is, ez utóbbi esetben azonban a kémiai módosulatok jellegéből adódó nehézségekkel is számolnunk kell. A kérdéskörrel Ipolyi Ildikó doktori disszertációja foglalkozik részletesen [Ipolyi 2003].

A módosulatanalitikában, úgymint a higanyspeciációs analízisek során is, az alkalmazott módszerek szinte kivétel nélkül többféle technikát ötvöznek, a feltárás és/vagy extrakciótól az elválasztástechnikán át az elemszelektív detektálásig. Ezeket a lépéseket egytől egyig hibák terhelik, ráadásul mindegyik munkafázisban számolnunk kell a kémiai módosulatok instabilitásával (MeHg bomlása), egymásba való átalakulásával, esetleg műtermékek (pl. szervetlen higany metilálása során keletkező MeHg, vagy MeHgMe) képződésével, vagy éppen veszteségekkel (pl. elemi Hg elillan). Különlegesen fontos az egyes módosulatokból készült standard oldatok stabilitásának, a mintavételnek, valamint a minták tartósításának kérdése — részletesebben ezekről korábban már volt szó — hiszen az itt elkövetett hiba később már nem korrigálható. Lényeges kérdés továbbá a mátrix jelenléte, mely minden lépést jelentősen befolyásol. Kiemelt jelentősége van a mátrixhatásnak a higany módosulatanalitikában, hiszen a valódi minták kis, esetenként pg g^{-1} nagyságrendbe eső higanykoncentrációja nem engedi meg a minta kellő mértékű hígítását. Megoldásként olyan paraméterek mellett célszerű feltárni a mintát, mely a mátrix lehetőleg minél teljesebb elbontása, feloldása mellett a maximális hatásfokkal szabadítja fel a mérendő alkotókat.

Az extrakciós hatásfok meghatározása anyagmérleggel történik, megmérjük az extraktum és a minta koncentrációját, amiből egyszerű osztással kiszámítható az extrakciós hatásfok. Ezt követően az oldhatatlan maradék koncentrációját is meghatározzuk és ellenőrizzük, hogy az extraktum és a maradék koncentrációjának összege kiadja-e a minta eredeti koncentrációját. Ugyanakkor az egyes módosulatok extraktumban mért koncentrációja nem korrigálható az összkoncentrációnál számolt hatásfokkal, hiszen nem feltételezhetjük a módosulatok egyenletes eloszlását és egyforma extrahálhatóságát. A specieszek egyenkénti

extrakciós hatásfokának meghatározása mind analitikai szempontból, mint élettani hatások tekintetében kiemelten fontos, noha a kérdés halminták higanyspeciációs analízise során kisebb jelentőségű (hiszen pl halak higany tartalmának gyakorlatilag 90%-a vagy esetenként akár 100%-a metil-higany). Jelenleg a leggyakrabban alkalmazott módszer erre a célra az adalékolás (spiking) és bizonylatolt referenciaminták (CRM) használata [Quevauviller et al. 2000].

Az extrakciós technikákon túl a származékképzés a speciációs analitika egyik legkritikusabb lépése, összetettsége miatt sok hibaforrást tartalmaz. A sokféle vegyszer és edényzet mind potenciális szennyezőforrások, a származékok illékonysága miatt pedig veszteségek léphetnek fel. A derivatizációs hatásfok meghatározása igen bonyolult folyamat, hiszen a reakció erősen mátrix- és komponensfüggő. Mindezen túl a mérendő alkotó és a származék kémiai jellege jelentősen különbözik, így a kalibrációhoz és a származékképzési hatásfok meghatározásához mindkettőre szükség van. Ezek a kereskedelembe sokszor nem kapható vegyületek, laboratóriumi előállításuk pedig újabb hibaforrást jelent.

A fejezet további részében a higanyspeciációt érintő minőségbiztosítási módszereket tárgyalom, melyeket munkám során is alkalmaztam.

3.3.1 Kalibrációs lehetőségek a higany módosulatanalitikában

A speciációs analitikában a komponensek koncentrációjának meghatározása, illetve a feladathoz mérten legjobbnak ítélt kalibrációs eljárás kiválasztása a mai napig a terület fontos kérdése.

A „hagyományos”, vagy külső kalibráció kétségtelenül a mennyiségi meghatározás legkézenfekvőbb és legkönnyebben kivitelezhető módja, azonban a legegyszerűbb mátrixok esetétől eltekintve alkalmassága meglehetősen kétséges. Különösen érvényes ez a higanyspeciációs mérésekre, hiszen még ha a feltárás során el is érjük a mátrix kielégítő felbontását, a minták alacsony higanykoncentrációja miatt kis hígítási faktorról vagyunk kénytelenek dolgozni.

Amennyiben mégis külső kalibrációval dolgozunk, figyelembe kell venni, hogy a higanyspeciációs mérések mintaelőkészítése során szinte mindig alkalmazunk derivatizációs reakciót. Ilyenkor a kérdéses komponens derivatizált formájának oldatba vitelével készült standardokkal végzett kalibráció tűnik a legegyszerűbbnek. Ezen eljárás azonban sok hibaforrással terhelt. A fenilezett származékok pl. (difenil-higany és metil-fenil-higany) kereskedelembe ugyan kapható vegyületek, de oldatban nem stabilak. További problémát jelent, hogy az ilyen kalibráció nem számol a mintaelőkészítési lépések során fellépő veszteségekkel. Ez elsősorban abból adódik, hogy míg a meghatározandó komponensekből a

mintaelőkészítés során képzünk kisebb vagy nagyobb hatásfokkal származékokat, ugyanilyen hatásfokú eljáráson a kalibráláshoz felhasznált már derivatizált vegyületeknek „nem kell átesniük”.

Egy másik az előzőnél munkaigényesebb, de reprezentatívabb, helyesebb eredményt szolgáltató megoldás a módosítatlan mérendő kalibrálósorozatával végzett kalibráció. Ilyenkor a kalibráló oldatok párhuzamosan a mintákkal ugyanazon a derivatizációs eljáráson mennek keresztül, így a folyamat okozta kis eltérésekkel, derivatizációs hatásfokokkal elvileg nem kell számolnunk. Azért írom, hogy elvileg, mert nem szabad elfeledkezni arról, hogy tiszta oldatokból gyakran magasabb a származékképzési reakció hatásfoka, mint mintaextraktumból.

A mátrixhatás — mely higanyspeciációs méréseknél állandó probléma — figyelembe vétele miatt a belső kalibrációval (standard addíció) végzett mérések eredményei kétségtelenül megbízhatóbbak, az eljárás azonban igen idő- és munkaigényes. Ilyenkor a mintamátrixhoz addíciónáljuk a mérendő komponenszt (úgy, hogy hígulása minimális legyen) különböző koncentrációban, majd a mintaelőkészítést a megszokott módon kivitelezzük. Az ismert hozzáadott mennyiségekből és a mért jelekből megszerkesztjük a kalibrációs görbét, melynek X-tengellyel való metszéspontja adja a minta koncentrációját. A kalibrációs görbe felépítéséhez legalább három-négy addíciós pontra van szükség, általában a mért eredeti koncentráció egyszeres, kétszeres és négyszeres mennyiségét adagoljuk. A standard addíció egy leegyszerűsített változata lehet, amikor egy mintát addíciónálunk, és a kiszámolt meredekség segítségével határozzuk meg a többi minta koncentrációját. Természetesen ez az eljárás, csak nagyon hasonló mátrixú minták mérése során jelent megoldást.

A higannyal kapcsolatban meg kell említenünk a kalibrációnak a belső standard használatával összekötött módját. A belső standard egy olyan vegyület, mely eredetileg nem található a mintában, karaktere a lehető legjobban hasonlít a mérendő komponenshez, így viselkedésével jellemezhető a mérendő viselkedése. Metil-higany mérések során gyakori az etil-higany belső standard használata, persze csak akkor, ha nem etilezést használunk származékképzésre [Caricchia et al. 1997, Ortiz 2002, Ipolyi et al. 2004]. Mivel mintaelőkészítés előtt adagoljuk a mintához, fontos, hogy a kezelések során hasonló stabilitással rendelkezzen mint a kérdéses komponens. Ezzel kapcsolatos vizsgálataimat az 5.5.3. és 5.6. fejezet tartalmazza. A kalibrációs görbét a mérendő komponensre és a belső standardra kapott jelek hányadosaiból számoljuk. Mivel a mintában is jelen van a belső standard, így a minta koncentrációjának meghatározáshoz is a mérendő és a belső standard intenzitásának hányadosát használjuk. A módszer használatának előnye, hogy a teljes analitikai folyamat veszteségeivel számol a mintaelőkészítéstől a detektálásig.

Szót kell még ejteni az izotóphígítás (ID) lehetőségéről is, mint alternatív kalibrációs eljárásról. Elsősorban speciális készülékigénye miatt korlátozott esetekben használják a higany módosulatanalitikában [Yang 2003].

3.3.2 Módszervvalidálás

Egy adott analitikai probléma megoldásakor, amennyiben van a feladatnak megfelelő szabvány, akkor az analitikus azt használja. Ha nincs, akkor módszert kell fejleszteni. A speciációs analitikában mindennapos kihívást jelentenek az összetett mátrixok, a bonyolult mintaelőkészítési módszerek, a standardok stabilitása, a mérendő kis koncentrációtartományok. A mérésnek megbízhatónak kell lennie, melynek feltétele a validálás. Olyan tevékenységek összességéről van szó, melynek a működési paraméterek becslésére, illetve a folyamat feladathoz mérten logikusnak tartott teljesítményjelzőinek (szelektivitás, méréstartomány, linearitás, érzékenység, kimutatási határ, meghatározási határ, zavartűrés, pontosság, precizitás) meghatározására irányulnak. A speciációs analitikában a teljes validálást nagyon nehéz kivitelezni, elsősorban azért, mert az alkalmazott módszerek teljesítőképessége sokszor annyira mátrixfüggő, hogy egy új mátrix a módszer teljes újvalidálását is igényelheti. Mégis számos eszköz áll az analitikus rendelkezésére, hogy az adott speciációs módszer minőségét a lehetőségekhez mérten a legjobban biztosítsa. Manapság, különösen az akkreditáció kapcsán egyre gyakoribb elvárás az alkalmazott mérési módszerek bizonytalanságbecslésének elvégzése. Az eljárás munkaigényes ugyan, de feltárja az adott módszer ún. „gyenge pontjait”, felhívja a figyelmet azokra a lépésekre, folyamatokra, melyek elvégzése a továbbiakban nagyobb körültekintést igényel. Doktori munkám során én is elvégeztem az általam kidolgozott módszer bizonytalanságbecslési vizsgálatát, melyről az 5.2. fejezetben számolok be.

Ezenkívül minőségbiztosítási eszköz lehet egyes paraméterek folyamatos monitorozására, pl. reagensek stabilitása, vak érték állandósága, teljesítményjelzők...stb., független módszerek alkalmazására. A megfelelő referenciaanyagok használata, esetleg körelemzésekben való részvétel, vagy teljes anyagmérleg készítése mindenképp szükséges.

3.3.2.1 Hitelesített referenciaanyagok használata

Mielőtt egy új módszerrel valódi minták analízisét végeznénk, a módszer alkalmasságát bizonylatolt/hitelesített referenciaanyagok (CRM) használatával kell bizonyítani. A CRM-ek egy elismert nemzetközi szervezet által jóváhagyott hitelesített referenciaértékkel és ahhoz tartozó bizonytalansági intervallummal rendelkeznek. A saját

módszerrel kapott értéket összehasonlítjuk a bizonylatolt értékkel, így kiszámolható az alkalmazott módszer hatásfoka.

Fontos kérdés lehet az eredmények kiértékelése és megadása során, hogy tanácsos-e a meghatározott hatásfokkal korrigálni speciációs eredményeinket, vagy a kapott értékeket a hatásfokkal együtt adjuk meg. A döntéshez mérlegelnünk kell. Egyfelől CRM-ek használatakor a mátrixból adódó különbségek áthidalására nincs mód, vagyis korrigálással feltehetően lényegesen rontanánk eredményünk megbízhatóságán. Másfelől viszont körelemzésekben és hitelesítési eljárásokban a korrigálás elfogadott gyakorlat (szigorúan korrekciós faktor feltüntetésével), hiszen ez teszi lehetővé a különböző mérési módszerekkel kapott eredmények összevetését.

Számos, összes higany tartalomra hitelesített biológiai-, üledék- és vízminta CRM-et használnak az analitikusok [IAEA-TECDOC-854, IAEA-TECDOC-880]. A speciációs célokra felhasználható, módosulatokra is hitelesített CRM-ek száma jóval kevesebb [Horvat 1999], melyek sokszor mátrix és/vagy koncentráció tekintetében nem alkalmasak méréseink minőségbiztosítására. A metil-higanyra is hitelesített CRM-ekről szolgáltat információt az

5.táblázat.

A táblázatból egyértelműen kiderül, hogy tengeri élőlényekből, elsősorban halmintákból készül a rendelkezésre álló speciációs CRM-ek túlnyomó többsége, szárazföldi vagy édesvízi ökoszisztémákból származó mintákból, valamint a humán toxikológiai vizsgálatoknál sokszor igényelt vérmintából nem áll rendelkezésünkre hiteles anyagminta. Felmerül a kérdés tehát, hogy megfelelő CRM hiányában milyen lehetőségei vannak az analitikusnak.

Az analitikai eredmények minőségének ellenőrzésére több lehetőség is kínálkozik, amelyekkel át tudják hidalni a hiányosságokat. Gondolok itt laboratóriumi referencia minták (LRM) előállítására, vagy körelemzésekben megmaradó — rendszerint nem hitelesített ún. referenciaanyag (RM) minőségű — minták használatára, körelemzésekben-, jártassági vizsgálatokban való részvételre, ugyanazon minta független módszerekkel, és/vagy különböző laboratóriumokban elvégzett analízisére, vagy akár eredményeink irodalmi adatokkal való összehasonlítására.

Az RM (gyakran LRM) legfőbb szerepe az, hogy referenciapontként szolgáljon a laboratóriumi minőségbiztosítás terén, például kontroll kártyás rendszer alapját képezve. Alkalmas készülék kalibrációjára, egy mérési módszer értékelésére, módszerek és mérőrendszerek stabilitásának folyamatos megfigyelésére. Új módszerek optimalizálására is megfelelőnek bizonyul, mivel rendelkezik egy tájékoztató referencia értékkel, melyet házi készítésű RM esetében több független módszerrel határozunk meg.

5.táblázat. A jelenleg elérhető MeHg-ra hitelesített referenciaanyagok. (2006)

⁽¹⁾NRCC-Nacional Research Council Canada, IAEA-MEL-International Atomic Energy Agency - Marine Environmental Laboratory, BCR-Institute for Reference Materials and Measurement, Comission of the European Communities, NIST-National Institute of Standard and Technology, USA, NIES-National Institute of Environmental Sciences, Japan

⁽²⁾, hitelesített érték $\pm$ 95%koincidencia tartomány, ⁽³⁾ nedves tömegre vonatkozik

Gyártó ⁽¹⁾	CRM	mátrix	Hitelesített érték mg/kg (Hg-ra), szárazanyagra ⁽²⁾	
			MeHg	Össz Hg
NRCC	DOLT-2	tőkehal máj	0.693 $\pm$ 0.053	1.99 $\pm$ 0.10
NRCC	DORM-2	tőkehal izom	4.47 $\pm$ 0.032	4.64 $\pm$ 0.26
NRCC	TORT-1	homár hasnyálmirigy	0.121 $\pm$ 0.014	0.330 $\pm$ 0.006
NRCC	TORT-2	homár hasnyálmirigy	0.152 $\pm$ 0.013	0.27 $\pm$ 0.06
NRCC	LUTS-1	nem zsírtalanított homár hasnyálmirigy	0.0093 $\pm$ 0.0006 ⁽³⁾	0.016 $\pm$ 0.0022 ⁽³⁾
NIST	SRM 1974a	kagyló	0.0772 $\pm$ 0.0038	0.176 $\pm$ 0.013
NIST	SRM 2974	kagyló	0.0772 $\pm$ 0.0038	0.176 $\pm$ 0.020
NIST	SRM 2976	kagyló	0.0277 $\pm$ 0.0020	0.0610 $\pm$ 0.0035
NIES	NIES 13.	emberi haj	3.8 $\pm$ 0,4	4.42 $\pm$ 0.20
BCR	CRM 463	tonhal	2.82 $\pm$ 0.15	2.85 $\pm$ 0.16
BCR	CRM 464	tonhal	5.12 $\pm$ 0.16	5.24 $\pm$ 0.10
BCR	CRM 580	üledék	0.0702 $\pm$ 0.0034	132 $\pm$ 3
IAEA-MEL	IAEA-350	tonhal	3.65 $\pm$ 0.35	4.68 $\pm$ 0.28
IAEA-MEL	IAEA-356	szennyezett tengeri üledék	0.0054 $\pm$ 0.00089	7.62 $\pm$ 0.65
IAEA-MEL	IAEA-142	kagyló	0.047 $\pm$ 0.004	0.126 $\pm$ 0.007
IAEA-MEL	IAEA-140	tengeri növény	0.000626 $\pm$ 0.000107	0.038 $\pm$ 0.006

Amennyiben körelemzésből visszamaradt mintáról van szó, akkor a résztvevő laboratóriumok eredményeiből meghatározott koncentrációtartománnyal, mint referencia tartománnyal dolgozunk. A RM-ek azonban teljes mértékben nem tudják kiváltani a CRM-ek használatát, hiszen mielőtt egy új módszert valódi mintára alkalmaznánk, annak alkalmasságát, helyességét CRM használatával kell bizonyítanunk. Az RM-val történő minőségellenőrzés igen költségkímélő eljárás a drága CRM-ekkel szemben, részben ennek is köszönhető rutinszerű, szinte minden napos alkalmazása a laboratóriumi gyakorlatban.

3.3.2.2 Körelemzések

Módszerünk „megmérettetésére”, helyességének, megbízhatóságának ellenőrzésére, kitűnő megoldást jelenthet a körelemzésekben való részvétel, mely több jelentős előnnyel rendelkezik. Ellentétben a CRM-ekkel, a körelemzésekben használt minták stabilitásának nem szükséges évekre szóló garanciával rendelkeznie. A friss minták előállítása egyszerűbb és költségkímélőbb, ráadásul a kezelésükkel kapcsolatos problémák felismerésére és megoldására is lehetőség nyílik. Sok esetben már a mintavétel is a körelemzés részét képezi [Lepine 1995].

Úgy gondolom sürgősséggel hangsúlyozni, hogy a résztvevők adatainak összevethetősége végett, milyen fontos és lényeges kérdés a körelemzések eredményeinek kiértékelése, a megfelelő statisztikai módszerek alkalmazása. A kiértékelő megbeszéléseken lehetőség nyílik a vélemények ütköztetésére, a terület kiemelkedő személyiségeivel való véleménycserére.

A nemzetközi szinten szervezett körelemzések egy része egy adott analitikai módszer teljesítőképességet, mások különböző módszerekkel dolgozó laboratóriumok teljesítőképességét hivatottak felmérni, végül vannak olyan nemzetközi együttműködések, ahol független laboratóriumok részben vagy egészben rögzített módszerrel határozzák meg egy hitelesítendő referencia minta hiteles értékét, illetve az ehhez tartozó bizonytalansági intervallumot. A különböző laborok által használt különböző technikák összehasonlításával lehetőség nyílik egy adott módszer-, vagy a módszer egy lépésének alkalmazása során előforduló hibaforrások felismerésére, azok kiküszöbölésére, ezáltal a technika tökéletesítésére. Gyakran a hitelesítési eljárásokban alkalmazott technikák kapcsán felmerülő hibaforrások eliminálásának, szabvány módszerek tesztelésének céljából szerveznek körelemzéseket.

Különböző tesztminták higanyspeciációs analízisét megcélzó körelemzések folytak és folynak napjainkban is. Bloom és munkatársai [Bloom 1995] vízmintákkal kapcsolatos eredményekről számolnak be, a Nemzetközi Atomenergia Ügynökség (IAEA) égisze alatt működő Analytical Quality Control Service (AQCS) pedig már 1973 óta rendszeres időközönként szervez helyi és nemzetközi szinten is, elsősorban biológiai és környezeti mintákat felhasználó körelemzéseket. Ezen vizsgálatok célja a különböző laborok analitikai teljesítőképességének összevetése, az egyes technikák összehasonlíthatóságának vizsgálata, vagy a különböző mintaelőkészítési procedúrák hatékonyságának megállapítása. Nem szabad elfeledkezni arról a néhány tesztmintáról sem, mely alkalmas volt arra, hogy a hitelesítési eljárást követően bizonylatolt referencia mintává váljon.

Az Európai Bizottság felügyelete alá tartozó Joint Research Centre-Institute for Reference Materials and Measurements (JRC-IRMM) szervezésében kimondottan

élelmiszerlaborokat megcélzó nemzetközi körelemzéseket szerveztek 2003-ban és 2005-ben. A 2003-as volt az első alkalom, mikor élelmiszerminták (halminta) metil-higany koncentrációjának mérése is a feladatok közé tartozott. Doktoranduszi munkám során én is részt vettem ezekben a felmérésekben. A körelemzésről magáról, a tesztmintákról, a kiértékelés módjáról, illetve a felmérés eredményéről részletes áttekintést ad az 5.3. fejezet.

3.3.2.3 Teljes anyagmérleg készítése

A teljes mintaelőkészítési folyamatot végigkísérő anyagmérleg elkészítése jó alternatívája lehet méréseink minőségbiztosításának. A teljes anyagmérleg a minta többszöri, különböző módszerekkel történő méréséből tevődik össze. Kiinduláskor meg kell határozni mintánk összes higanytartalmát, a későbbiekben ez az érték szolgál viszonyítási alapként. A továbbiakban a mintát speciációs mintaelőkészítési eljárásnak vetjük alá. Azontúl, hogy elvégezzük a módosulatanalitikai mérést is, a mintaelőkészítés minden lépésében meghatározzuk a visszamaradó fázis összes higanytartalmát — vagy roncsolással, vagy közvetlenül kifűtéses atomabszorpciós eljárást alkalmazva (direkt Hg analizátor) —, melyből információt szerezhetünk az egyes lépések során bekövetkező veszteségekről, illetve mindig megmérjük annak a fázisnak a koncentrációját is (egy kis részletet elkülönítve a fázisból), amit tovább viszünk a következő lépésben. Az adatok kiértékelésénél természetesen figyelembe kell venni, és korrigálni kell azzal az elveszett „információtartalommal”, mely a továbbvitt fázisból tűnik el az anyagmérleg felvétele során.

Az eljárás nagyon idő- és munkaigényes ugyan, de alkalmazásával nyomon követhető a teljes mintaelőkészítési folyamat, kiszámítható az extrakciós hatásfok, a derivatizációs hatásfok, kiderül mely lépések során és milyen mértékben fordul elő veszteség. Doktori munkám során, az egyik általam alkalmazott módszer minőségbiztosítását teljes anyagmérleg felvételével is elvégeztem, az ezzel kapcsolatos eredményeim az 5.5 fejezetben kerülnek bemutatásra.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Mintaelőkészítés higanyspeciációs analízishez

4.1.1 Lúgos feltárást és SPME-t alkalmazó mintaelőkészítési eljárás

Az eljárás alapját Cai és munkatársai [Cai et al. 1995] által kidolgozott módszer képezte.

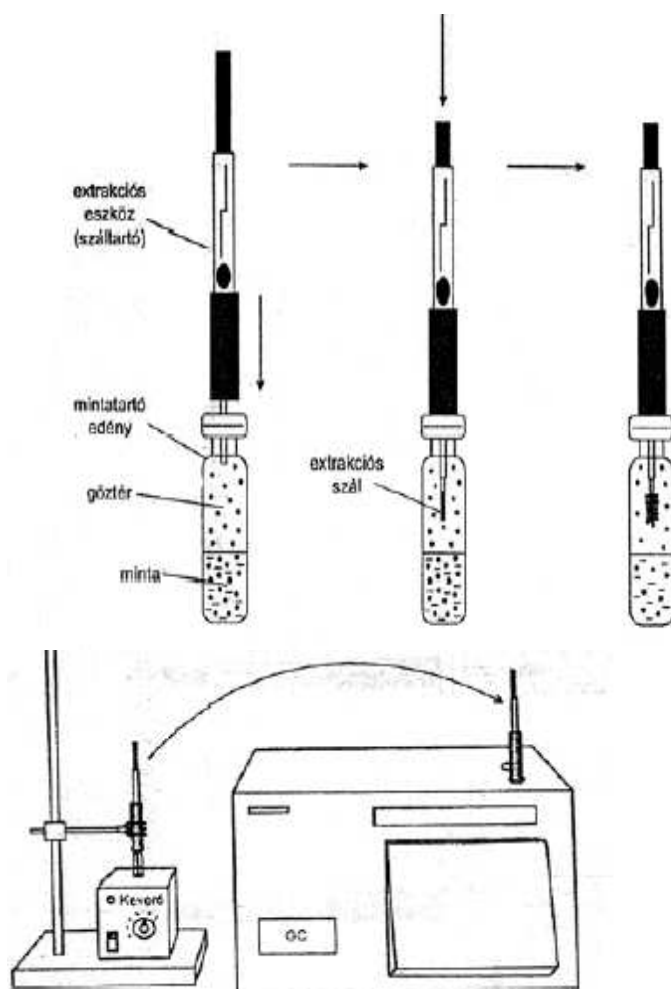
250 mg liofilizált halmintát mértem be egy 30 ml-es teflonos szeptummal lezárható üvegedénybe, majd 5 ml, KOH-ra nézve 25%(m/v)-os metanol oldatot, vagy 18%(m/v) NaOH-ot tartalmazó metanol oldatot (mindkettő 4.5M-os) adtam a mintákhoz. Az edények lezárását és alapos összerázását követően 3 órán át 75°C-os vízfürdőben ultrahangoztam az így elkészített elegyet. Szobahőmérsékletre való lehűlést követően, a hígítási lépéseket az aktuális minta MeHg tartalmától tettem függővé.

„Nagy higany tartalmú” (néhány $\mu\text{g g}^{-1}$ MeHg szárazanyagra számolva) minták esetében a feltárt oldat teljes mennyiségét 50ml-re hígítottam, ebből 1ml-t további 10-szeres hígításnak vettem alá úgy, hogy standard addíciós kalibrálás esetében ebben a lépésben (még jelretöltés előtt) adtam a mintákhoz a megfelelő koncentrációjú MeHgCl standard oldatot. Az addicionált mennyiségek a minta várt MeHg koncentrációjának 1-szeres, 2-szeres és 4-szeres koncentrációi voltak.

„Kis higany koncentrációjú” (100 ng g^{-1} körüli) minták előkészítése során a feltárt 5 ml oldat teljes mennyiségét (15 perc, 4100 g, 20°C) centrifugáltam, majd a fent leírtakhoz hasonlóan a felülúszó 1ml-es részletét MeHgCl standard addicionálását követően 10ml-re hígítottam.

Innentől kezdve minden mintára újra egységes volt az eljárás ; a származékképzéshez az adalékolt oldat 1ml-es részletét egy 30ml-es szeptummal lezárható üvegedénybe vittem, melybe előzetesen bemértem 10ml 1M-os acetát puffert (pH=5), illetve belehelyeztem egy teflonos bevonatú mágneses keverőbabát. Végül az így összeállított elegyhez 1ml 1%(m/v)-os frissen készített NaBPh₄ reagens oldatot adtam, majd a szeptumos kupakkal gyorsan lezártam az üveget. Az SPME kivitelezéséhez az üveget mágneses keverőre helyeztem és intenzív kevertetés mellett (700 rpm) egy előzetesen optimált időtartamig gőzfázisú mintavételt végeztem. Az SPME-t követően gázkromatográfiás elválasztást és AFS detektálást alkalmaztam. A szilárdfázisú mikroextrakció folyamatát szemlélteti a **4. ábra**.

4. ábra. A szilárd fázisú mikroextrakció folyamata.



4.1.2 Savas hidrolízissel és oldószeres extrakcióval megvalósított mintaelőkészítés

Ezen eljárást Rómában eltöltött kutatómunkám során alkalmaztam, a módszert Ipolyi és munkatársai [Ipolyi et al. 2004] dolgozták ki.

Egy üvegedénybe megközelítőleg 200mg liofilizált mintát mértem, majd zsírtalanítás céljából először 4ml acetonnal, majd 4ml toluollal átmostam. Mindkét esetben 3 perc rázás, majd 10 perc centrifugálás után (2400 g) az oldószereket elválasztottam és elöntöttem. A szilárd maradékhoz hozzáadtam 5ml 6M-os sósav oldatot és 30 perces ultrahangos kezelésnek vettem alá az így elkészített elegyet. Szobahőmérsékletre való lehűlést, majd 10ml 10%(m/v)-os NaCl oldat hozzáadását, illetve 3 percig tartó összerázást követően, 10 percig centrifugáltam (2400 g) a mintákat. A felülúszóban jelenlévő higanykomponenseket ezek után először kétszer 4ml toluolba ráztam, majd kétszer 2 ml vizes cisztein oldatba visszaextraháltam. A derivatizációhoz, az összegyűjtött összesen 4ml ciszteines extraktumhoz először savanyítás céljából 0.2ml 0.1M-os kénsavoldatot, majd 1ml telített CuSO_4 oldatot, 1ml hexánt, végül 0.2ml 1%(m/v)-os NaBPh_4 oldatot adtam. Ez utóbbit óvatosan a hexán

alatti vizes fázisba juttattam. 20-30 percig tartó intenzív rázatást, majd a fázisok szeparációját követően a szerves fázisból 1 μl -t injektáltam a gázkromatográfba. A külső kalibrációs standard sorozatot a mintákkal egyidőben derivatizáltam. Az alkalmazott GC-MS rendszer automata mintavevővel volt felszerelve.

4.2 A mérésekhez használt vegyszerek, standardok és hiteles anyagminták

Vizsgálataim során analitikai tisztaságú vegyszerekkel dolgoztam. A lúgos hidrolízis során alkalmazott 25%-os KOH-os illetve 18%-os NaOH-os metanol oldat, adott mennyiségű szilárd KOH vagy NaOH (Merck, Darmstadt, Németország) metanolban (Carlo Elba Reagents, Milan, Olaszország) történő feloldásával készült. Az eljárás során alkalmazott származékképző reagens naponta frissen készített 1%-os NaBPh₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldat volt. Az 1M-os Na-acetát puffer a szilárd só (Reanal, Budapest) ioncserélt vízben való oldásával készült, a pH-ja ecetsavval (Reanal) lett beállítva.

A savas feltárás során alkalmazott valamennyi szerves oldószer (hexán, toluol, metanol), illetve szilárd anyag (cisztein, rézszulfát, nátrium-klorid) analitikai tisztaságú BHD készítmény volt. A feltáráshoz használt 6 M-os sósav, 37%-os tömény (Rudi Pont) HCl oldat, a 0.1M-os kénsav pedig 96%-os H₂SO₄ (Carlo Elba) oldat ioncserélt vízzel való hígításával készült.

A kísérletekben használt kb. 1000 mg l⁻¹-es metil-higany és etil-higany törzsoldatot kristályos (96.2%-os tisztaságú) metil-higany-klorid (MeHgCl) vagy etil-higany-klorid (EtHgCl) — mindkettő Sigma-Aldrich — metanolban történő oldásával állítottam elő, és sötét hűvös helyen tárolva maximum 2-3 hónapig használtam fel. A méréshez használt hígabb standard oldatokat a törzsoldatból ioncserélt vízzel hígítva készítettem. A 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ -es standard oldatot hetente, az ennél hígabbakat naponta állítottam elő.

A szervesetlen higany (Hg²⁺) standard oldatok 1000 mg l⁻¹-es HgCl₂ törzsoldat (Merck) ioncserélt vízzel való hígításával készültek, 1%(v/v) savtartalmuk 65%-os tömény HNO₃ (Merck) adagolásával lett beállítva.

Ioncserélt vízként minden esetben Elgacan Ultra-Pure patronnal (Elga Ltd., High Wycombe Bucks, Anglia) R>10 M Ω ellenállásig tisztított előzetesen desztillált vizet használtam. A kísérletek során használt edények mosogatását 10%(v/v)-os HNO₃ oldattal (Merck) végeztem.

A mérések minőségbiztosításához BCR-CRM-464 (Bureau Communautaire de Référence, Belgium), TORT-2 (National Research Council, Kanada), és DORM-2 (National Research Council, Kanada) hitelesített referenciaanyagokat, valamint T34 osztrigamintát használtam. Ez utóbbi BCR-710 néven hitelesítésre jelölt referencia minta [MULSPOT 2004].

4.3 Minták

Doktori munkám során a kidolgozott módszerrel élelmiszerminták higanyspeciációs analízisét végeztem el. Háromféle mintatípus képezte vizsgálataim tárgyát.

Az első csoportba tartozó minták az Európai Unió OT-SAFE projektjének [OT-SAFE 2004] keretében szervezett mintagyűjtésből származtak. Nemzeti piacokon végzett reprezentatív mintagyűjtésről van szó, melynek célja az volt, hogy 11 európai országban vizsgálja a lakosság táplálkozással kapcsolatos szerves ón terhelését. Ezen projekt keretében egy hazai felmérésre is sor került, melyben a magyar nép tengeri élőlényekkel, tengeri halakkal kapcsolatos táplálkozási szokásait (milyen eredetű, milyen fajtájú, honnan származó halakat) térképezték fel. Vizsgálták, hogy a magyarországi kereskedelmi forgalomban lévő különböző eredetű, és különböző fajú/fajtájú készítményekből mennyit fogyasztanak az emberek. Ezen 2001-ben elvégzett felmérés eredményeire alapozva választottam ki a vizsgálataim tárgyát képező, (5. ábra) hazánkban a három legnagyobb mennyiségben fogyasztott tengeri halat : (1) hering (*Clupea harengus*, származási hely : Lengyelország), (2) szardínia (*Clupea pilchardus*, származási hely : Thaiföld) és (3) szürke tőkehal vagy hekk (*Merluccius hubbis*, származási hely : Argentína).

5. ábra. Az OT-SAFE projekt keretében gyűjtött, kereskedelmi forgalomban lévő, Magyarországon a három legnagyobb mennyiségben fogyasztott tengeri hal termék.



A mintavételezés 97%-ban lefedte a magyar piacot, és a Nemzetközi Tengerkutató Tanács (International Council for the Exploration of the Sea, ICES) által leírt módon lett kivitelezve [Honlap 4].

A gyakorlatban ez úgy nézett ki, hogy a hering és a szardínia minták esetében legalább 25-25 db. konzervet (ezek között volt paradicsomos, olajos és csili szósos), a hekkből pedig minimum 25 halfilét választottak ki. Az ehető részeket haltípusonként összegyűjtötték, majd homogenizálták és liofilezték a mintákat. Bár az OT-SAFE projekt keretében gyűjtött minták elemzése során eredetileg nem volt cél a metil-higany tartalom meghatározása, én azonban feltételeztem, hogy a minták analízisével reálisan megbecsülhető lesz a magyar lakosság tengeri halak fogyasztásával kapcsolatba hozható higanyterhelése.

Az általam vizsgált másik mintacsoportot 16 darab önkényesen kiválasztott, hazánkban kapható tengeri halból készült termék képviselte (egyik sem szerepelt az OT-SAFE projekt keretében gyűjtöttek között), melyeket az egyik áruházlánc forgalmaz. Az ezen mintákkal végzett kísérlet célja az volt, hogy igazolja vagy cáfolja azt a feltevésemet, hogy az „OT-SAFE-minták” metil-higany tartalma reprezentatívan tükrözik a magyarországi forgalomban lévő termékekét. Néhány, e csoportba tartozó minta eredete bizonytalan, mivel nem volt feltüntetve a terméken a származási hely.

A nedves minták kb. 200g-os részletét a felaprítást követően liofilizáltam (Christ Alpha 1-4, Christ, Németország) majd homogenizáltam (Fritsch mill, 14.702).

Végül az általam kidolgozott módszert alkalmazva Magyarországon tenyésztett és forgalmazott édesvízi halak metil-higany tartalmát is vizsgáltam. Munkámban két halfaj elemzését végeztem el.

A pontyok (*Cyprinus carpio*) dél-alföldi és balatonkörnyéki halgazdaságokból származtak, a magyar piac pontykínálatának kb. negyede érkezik ebből a régióból. Ezekben a tavakban a felszíni vízkészletet (tavakat, víztározókat) használják a halak tenyésztésére. A pontyok haltápot nem kaptak, a halastóban kialakult természetes biológiai rendszerben éltek.

Az utóbbi néhány évben az üzletek pultjain egyre inkább keresett afrikai harcsákat (*Clarias gariepinus*) tankokban nevelik, melyeken folyamatosan meleg (28 °C-os) termálvizet áramoltatnak keresztül. Csupán néhány afrikai harcsa tenyésztésre specializálódott halgazdaság működik hazánkban, ezek közül talán a Szarvason és Tukán működő telepek a legismertebbek, innen származtak a minták is. A telepeken létrehozott mesterséges trópusi környezetben hetente 3 alkalommal automata etetőberendezés segítségével haltápot kapnak a harcsák, melynek összetétele nem ismert. Munkám során a liofilezett haltáp higanyspeciációs elemzését is elvégeztem.

Egy-egy élőhelyről 6-10 példány került a laboratóriumunkba, melyeknek melluszony feletti izomszöveti részéből kb. 200g-os részt hasítottunk ki, majd tisztítottuk, daraboltuk és liofileztük, végül háztartási kávédarálóban (Bomann CB425, Németország) ledarálva homogenizáltuk a mintákat.

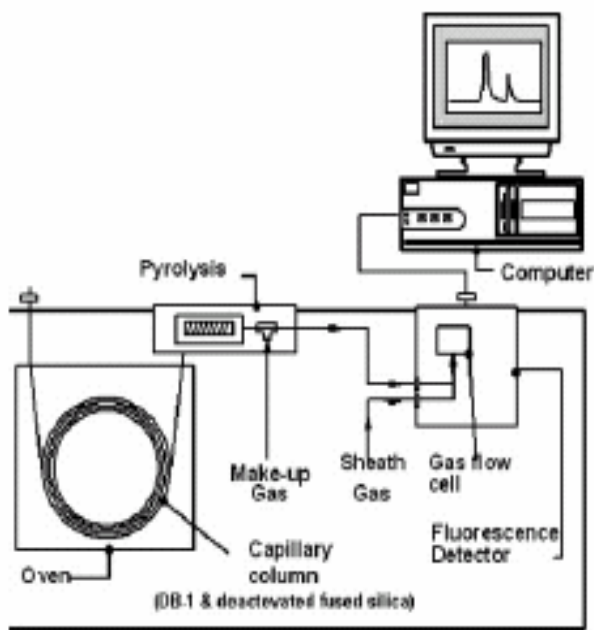
4.4 A kísérletek során alkalmazott műszerek, berendezések

4.4.1 Lúgos feltárás-SPME-GC-pirolízis-AFS módszer

A mintaelőkészítés során egy 50 W (dm³)⁻¹ teljesítményen működő Realsonic RS 16-F típusú ultrahangos vízfürdőt (Realsonic, Budapest), illetve egy MDS-81D mikrohullámú roncsoló berendezést (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) használtam. Ez utóbbi esetben biztonsági szeleppel ellátott csavaros tetővel lezárható teflonbombákban történt a feltárás. A feltárt mintákat Hettich Micro 22R centrifugával (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Németország) centrifugáltam.

A szilárdfázisú mikroextrakció során minden esetben 100 µm filmvastagságú, poli(dimetil-sziloxán) (PDMS) szorbens réteggel ellátott, kereskedelmi forgalomból beszerezhető mikroextrakciós szállal (Supelco, Bellefonte, PA, USA) felszerelt manuális SPME eszközt használtam.

6. ábra. A GC-pirolízis-AFS rendszer sematikus rajza.



A komponensek elválasztását 15m x 0.53 mm, 1.5 µm filmvastagságú DB-1, illetve 30m x 0.53 mm, 2.65 µm filmvastagságú HP-1 kapilláris oszloppal felszerelt HP-5890 gázkromatográf (Hewlett-Packard, Waldbronn, Németország) végeztem. Az oszlopról eluálódott komponensek egy 0.5 m hosszú, 0.32 mm belső átmérőjű fűtött kvarckapilláris segítségével, 800 °C-ra fűtött pirolizátoron keresztül jutottak a PSA 10.750 (PS Analyticals, Orpington, UK) atomfluoreszcens (AFS) higanydetektorba. Vivőgázként argont használtam.

A GC injektora 0.75 mm belső átmérőjű (SPME) dezaktivált üvegbetéttel (liner) volt felszerelve és splitless módban működött. A berendezés az **6. ábrán**, a működési paraméterek pedig a **6.**, illetve a **7. táblázatban** láthatóak.

6.táblázat. A GC-pirolízis-AFS rendszer működési paraméterei, melyeket az élelmiszerminták elemzése során alkalmaztam.

Paraméterek	
GC oszlop	DB-1 (100% polidimetil-sziloxán, 15m x 0.53mm, 1.5 µm filmvastagság)
Vivőgáz	Argon, 100 kPa fejtomás
Injektor hőmérséklet	190 °C
Hőmérsékletprogram	100 °C (0.6 min.) 100 °C — 250 °C, 30 °C min ⁻¹ 250 °C (1 min)
Pirolizátor hőmérséklet	800 °C

7.táblázat. A GC-pirolízis-AFS rendszer működési paraméterei, melyeket a MeHg és EtHg stabilitásvizsgálatok során alkalmaztam.

Paraméterek	
GC oszlop	HP-1 (100% polidimetil-sziloxán, 30m x 0.53mm, 2.65 µm filmvastagság)
Vivőgáz	Argon, 70 kPa fejtomás
Injektor hőmérséklet	150 °C
Hőmérsékletprogram	80 °C (3 min) 80 °C — 250 °C, 30 °C min ⁻¹ 250 °C (5 min)
Pirolizátor hőmérséklet	800 °C

4.4.2 Savas feltárás-oldószeres extrakció-GC-MS módszer

A minták savas feltárását ultrahangos vízfürdővel (Transonic Digital, Elma), centrifugálását Sorvall T6000B (DuPont) centrifugával végeztem.

A módosulatok elválasztását és detektálását GC-MS rendszerrel — Hewlett-Packard HP 5890 GC/HP 5970 MSD — oldottam meg SIM (selected ion monitoring) módban, a **8. táblázatban** bemutatott kísérleti körülmények között.

8. táblázat. A GC-MS rendszer működési paraméterei.

Paraméterek	
GC oszlop	HP-5 (5% difenil- és 95% dimetil-sziloxán, 30m x 0.25mm, 0.25 µm filmvastagság)
Vivőgáz	Hélium, 80 kPa fejtomás
Injektált térfogat	1 µl
Injektor hőmérséklet	200 °C, splitless
Hőmérsékletprogram	60 °C (1 min) 60 °C — 120 °C, 25 °C min ⁻¹ 120 °C — 240 °C, 10 °C min ⁻¹
Ionizáció	Electron impact, 70 eV
SIM paraméterek	
<i>MeHgPh</i>	m/z: 279.00, 292.05, 294.00, (dwell time:150 s.)
<i>EtHgPh</i>	m/z: 279.00, 306.05, 308.10, (dwell time:150 s.)

A fent vázolt paramétersereg mellett a MeHg-ra számolt kimutatási határ 3 ng ml⁻¹, a technika három nagyságrendre kiterjedő lineáris tartománnyal rendelkezik, relatív szórása < 4%.

4.4.3 Összes higany meghatározás

A minták összes higany koncentrációjának meghatározása Leco AMA 254 közvetlen higany analizátor (Leco Inc, St.Joseph, USA) segítségével történt. Az itthoni mérések Dr. Bartha András segítségével a Magyar Állami Földtani Intézet Kémiai osztályán folytak. A méréseket az EPA 7473 módszer szerint végeztük [EPA 1998], 100 mg szilárd anyag, illetve 200- vagy 500 µl folyékony minta bemérést és külső kalibrációt alkalmaztunk. A módszer kimutatási határa 0.01 ng, a lineáris tartomány : 0.05 – 500 ng, a relatív szórás < 1,5%.

A berendezés alkalmas folyékony vagy szilárd minták közvetlen, mintaelőkészítés nélküli analízisére. Az alkalmazott termikus energia hatására a minta először kiszárad, majd bomlik, a bomlástermékeket oxigén gázáram szállítja egy amalgamátorba, ahol a higany szelektíven megkötődik. Felfűtés hatására az innen felszabaduló, elődúsított higanygőzt végül atomabszorpcióval elven méri.

4.5 A kísérletek helye

A lúgos hidrolízis-SPME-GC-AFS rendszerrel végrehajtott kísérleteimet a Budapesti Corvinus Egyetem Alkalmazott Kémia Tanszékén, a savas feltárással és oldószeres extrakcióval kombinált GC-MS méréseket az Olasz-Magyar Kétoldalú Tét Együttműködés

keretében, Rómában az ENEA (Italian National Agency for New Technologies, Energy and the Environment) Környezetanalitikai Osztályán végeztem.

4.6 A mérések során betartott biztonsági óvintézkedések

A higanyvegyületek, különösen a szerves formák nagymértékű toxicitása miatt a kísérletek során szigorú óvintézkedéseket voltam kénytelen alkalmazni. A tömény (kb. 1000 ppm) MeHgCl és EtHgCl standard oldatokat az igen illékony kristályos anyag metanolban történő oldásával állítottam elő. Az eljárás során védőszemüveg, védőmaszk és védőkesztyű használata mellett elszívófülke alatt gyorsan dolgoztam, hogy mind a párolgást, mind az EtHgCl illetve MeHgCl kristályok bőrre illetve szembe kerülését elkerüljem. Ismert sajnos egy-két olyan eset, hogy halálos kimenetelű mérgezést okozott a higanyvegyületekkel való óvatlan labormunka. A hígabb standard oldatok előállítása, illetve a standard oldatokkal való bármilyen foglalatosság során minden esetben elszívófülke alatt és védőkesztyűben dolgoztam. A higany tartalmú hulladékot, erre kijelölt külön üvegben, egyértelmű jelöléssel, mint veszélyes hulladékot gyűjtöttem és kezeltem.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Lúgos hidrolízis-SPME-GC-pirolízis-AFS módszerfejlesztés

A módszerfejlesztés során vizsgált és optimált paraméterekről, a validálásról, illetve a módszer élelmiszerminták analízisére történő alkalmazásáról a *Journal of Agricultural and Food Chemistry* folyóirat, „SPME-GC-Pyrolysis-AFS Determination of Methylmercury in Marine Fish Products by Alkaline Sample Preparation and Aqueous Phase Phenylation Derivatization” címmel 2005-ben megjelent publikációban számoltunk be [Jókai 2005]. Ebben a fejezetben a módszerfejlesztés során tanulmányozott és optimált paraméterekről írok, az élelmiszerminták analízisével kapcsolatos eredményeim az 5.4. fejezetben kerülnek bemutatásra.

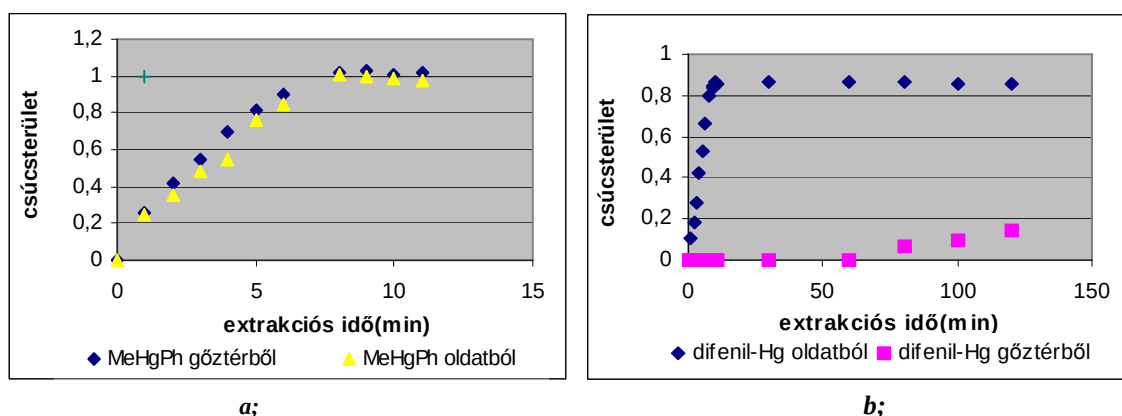
5.1.1 A gázkromatográfiás elválasztás optimalálása és az SPME kinetikájának vizsgálata

Az irodalmi összefoglalóban már volt róla szó, hogy a komponensek a feltárt mintaoldatban ionos formában vannak jelen, így a mintaelőkészítés során származékképző eljárás alkalmazásával kell a komponensek gázkromatográfiás elválasztáshoz szükséges illékonyosságát biztosítani. Kísérleteimben NaBPh_4 reagens alkalmazásával a kérdéses komponensek fenilezett származékait állítottam elő, választásomat a következő érvek támasztják alá : (1) a higanykomponensek fenilezett formái nem fordulnak elő a természetben, (2) a NaBPh_4 reagens sokkal stabilabb és nagyságrendekkel olcsóbb, mint a leginkább használt NaBEt_4 . A fenilezett komponensek (MeHgPh és PhHgPh) illékonyosságát MeHgCl és HgCl_2 standard oldatokból előállított származékok 0.1 ng ml^{-1} (Hg-ra nézve) koncentrációjú oldatának segítségével vizsgáltam. A kromatográfiás paraméterek optimalálása során az SPME-t immerziós módon (folyadékfázisból) hajtottam végre, és 10 perces extrakciós időt alkalmaztam. Az általam alkalmazott atomfluoreszcens detektálás higany szelektív volta lehetőséget teremtett jóval nagyobb felfűtési sebességet megvalósító, ezáltal gyorsabb hőmérsékletprogram beállítására (hiszen csak a higanytartalmú komponenseket kell elválasztani), mint amit egy nem szelektív pl. ECD detektor igényelne. A mintákban található MeHg és szerves higany fenilezett származékai ráadásul könnyen szeparálhatóak, viszonylag nagy retenciós idő különbséggel eluálódnak az általam használt DB-1 oszlopról. A gyors hőmérsékletprogram használatának lehetőségét teremti meg az is, hogy az oldószermentes mintabevitel (SPME) miatt, módomban állt viszonylag magas kezdeti

hőmérsékletről indítani a fűtési programot. Oldószeres mintabevitelnél az alkalmazott oldószer forráspontja alatti, viszonylag alacsony kezdeti hőmérsékletet kellene alkalmazni. Végül is a 6.táblázatban ismertetett optimált működési paramétersereg mellett a MeHgPh (metil-higany fenilezett származéka) 0.5 perc, a PhHgPh (szervetlen higanyból képződő difenil-higany) 2,3 perc retenciós idővel távozik az oszlopról.

Bár az elválasztás optimálása során az SPME-t immerziós módon hajtottam végre, munkám végső célja miatt a gőztérből történő SPME folyamatát akartam optimalni, kinetikáját megvizsgálni. A headspace SPME megvalósításához szükséges egyensúlyi extrakciós időket MeHgPh-ra és PhHgPh-ra (az az idő, mely elegendő a kérdéses két komponens maximális koncentrációjának eléréséhez az SPME szál szorbens rétegében, mely akkor valósul meg, ha beáll a fázisok közti egyensúly) a fent említett standard oldatok segítségével határoztam meg. A kísérletek során az összemért derivatizációs elegyből (acetát puffer + MeHgCl vagy HgCl_2 standard oldat + NaBPh_4 reagens) különböző ideig történő mintavételt alkalmaztam. Ezen kísérlet eredményét a 7. ábrán mutatom be.

7. ábra. Extrakciós idő meghatározása gőztéri illetve oldatból történő SPME során a; MeHgPh esetében, b; PhHgPh esetében. Az SPME mindkét komponens esetében 0.1 ng ml^{-1} (Hg-ra) koncentrációjú oldatból történt.



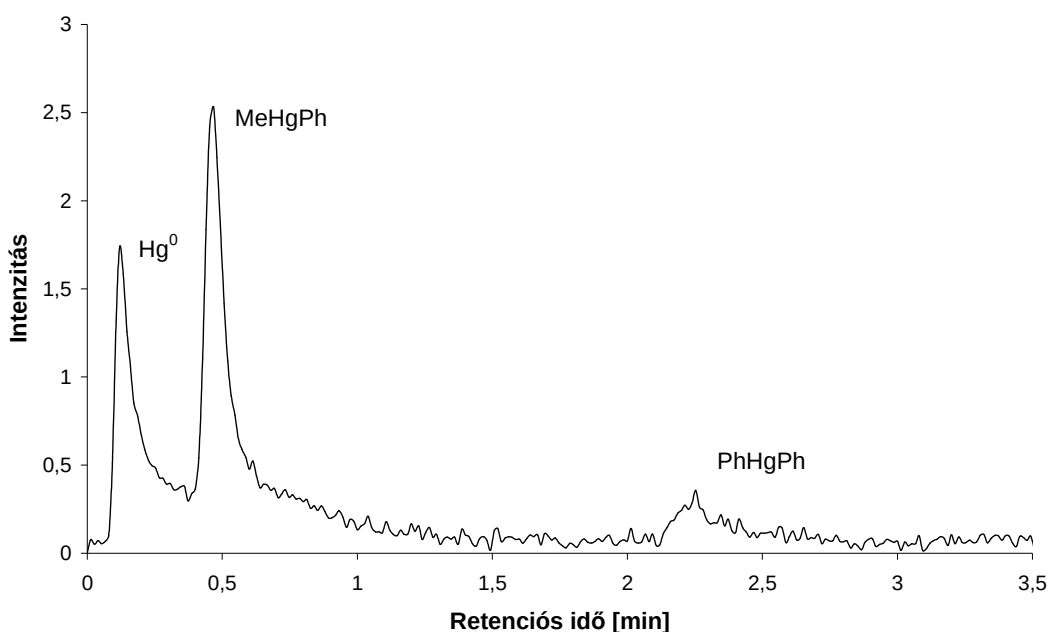
Mint a diagramokon látható, míg az oldat folyamatos kevertetése mellett 9 perc extrakciós - mintavételi idő alatt kialakulnak az egyensúlyi viszonyok a fenilezett metil-higany standard oldatban (állandóvá válik az extrahált mennyiség), addig ugyanolyan (0.1 ng ml^{-1}) koncentrációjú szervetlen higanyból képződött PhHgPh esetében, ez az időtartam — sőt még jóval hosszabb sem — messze nem elegendő detektálható mennyiségű szervetlen higany extrakciójára. A jelenség oka nyilvánvalóan nem a derivatizáció, hiszen immerziós eljárás esetén 10 perc elegendő a difenil-higany egyensúlyi extrakciójára is (7/b. ábra), hanem sokkal inkább a PhHgPh, MeHgPh-hoz képest sokkal kisebb mértékű illékonysága (két „lomha”

fenil-csoport jelenléte). Következtetésképp megállapítható, hogy amennyiben a minta szervesetlen higany tartalma a vizsgálat tárgya (pl. környezeti minták), immerziós SPME technikával célszerű dolgozni. Ebben az esetben alkalmazhatjuk a már említett 10 perc extrakciós időt.

Mivel munkám célja elsősorban metil-higany tartalom meghatározása volt, a további mérések során headspace mintavételt és 10 perc extrakciós időt alkalmaztam.

Szervesetlen higanyt jóval nagyobb koncentrációban (pl. néhány ng ml^{-1}) tartalmazó oldatok esetében, 10 perc extrakciós időt alkalmazva a PhHgPh retenciós idejénél megjelenő kis intenzitású jel mellett mindig detektálható volt, nagyjából az alkalmazott koncentrációval arányos intenzitású, elemi higany csúcs (Hg^0) is. (8. ábra)

8. ábra. Egy MeHgCl-ra nézve 0.1 ng ml^{-1} (mint Hg) és HgCl_2 -ra számolva 2 ng ml^{-1} standard oldattal felvett kromatogram. A koncentrációk minden esetben arra a „végső” derivatizációs elegyre (puffer + NaBPh_4 reagens + MeHgCl/ HgCl_2 std.) vonatkoznak, amiből az SPME-t végrehajtottam.



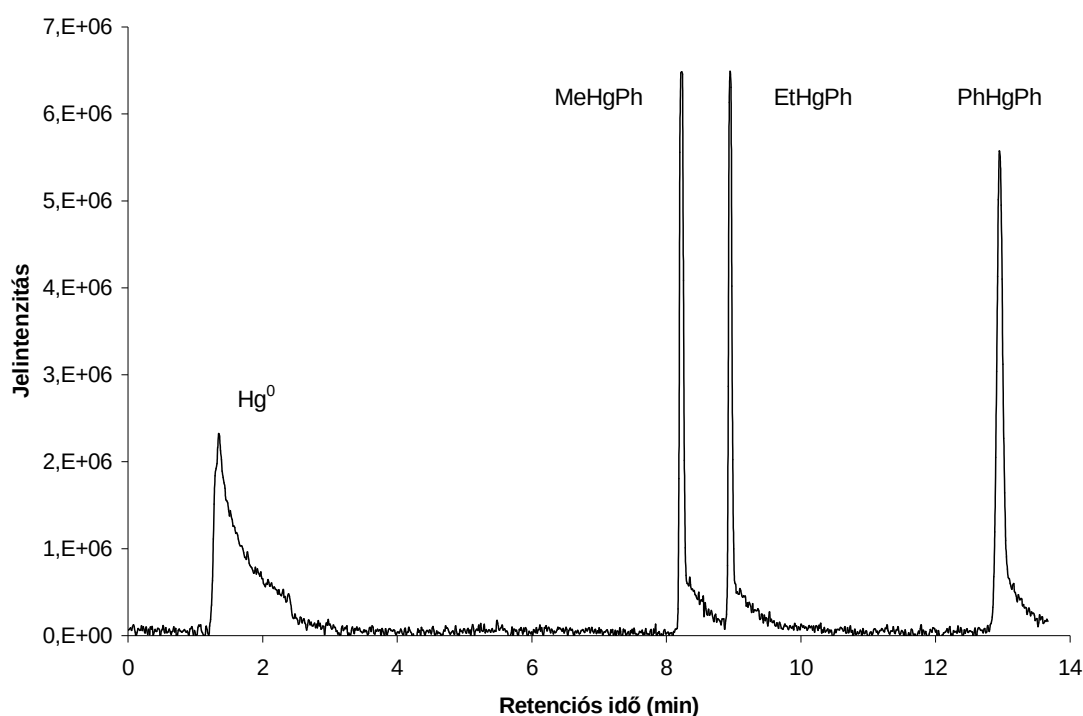
Az irodalomban [Grinberg 2003a] ismert jelenség, hogy az alkilezett higanymódosulatok SPME szálról történő lefűtése során előfordulhatnak termikus bomlási folyamatok, elemi Hg-t eredményezve. Ezen degradációs folyamatok előfordulása arányos a mérendő koncentrációval, ezáltal a folyamathoz egy állandó „bomlási faktor” rendelhető. Ugyanakkor ez a jelenség a technika helyességét, a mérések pontosságát nem veszélyezteti, mivel a kalibráló standard oldatok mérésénél vagy a spike-ként adalékolt komponenseknél is ugyanolyan mértékben fordulnak elő bomlási folyamatok, mint a minta kérdéses komponense esetében. A saját kísérleteim során csak „viszonylag nagy” koncentrációjú és kizárólag

szervetlen higany standard oldatok mérésénél detektáltam elemi higanyt, ezért úgy gondolom, hogy ennek magyarázata inkább a fenilációs reakció „mellékhatásaként” jelentkező redukciós folyamat lehet, semmint termikus bomlási folyamatok.

Jóllehet a 8. ábrán látható koncentrációmegoszlás metil-higany és szervetlen higany között, halminták és biológiai minták esetében igencsak a valóságtól elrugaszkodott példa, mégis úgy gondolom ez a kísérlet bizonyítja, hogy az alkalmazott gyors hőmérsékletprogram mellett is képes a módszer az említett három módosulat között megbízhatóan különbséget tenni.

Amennyiben etil-higanyt is tartalmaz a minta, immerziós eljárással, 10 perces mintavételt alkalmazva, és a 7. táblázatban leírt kromatográfiás paraméterek mellett a 9. ábrán bemutatott kromatogram szerint szeparálható a négy fenilezett módosulat.

9. ábra. Egy MeHgCl-ra (mint Hg) nézve 0,17 ng ml⁻¹, EtHgCl-ra (mint Hg) nézve 0,18 ng ml⁻¹ és HgCl₂-re nézve 0,18 ng ml⁻¹ koncentrációjú oldattal felvett kromatogram.



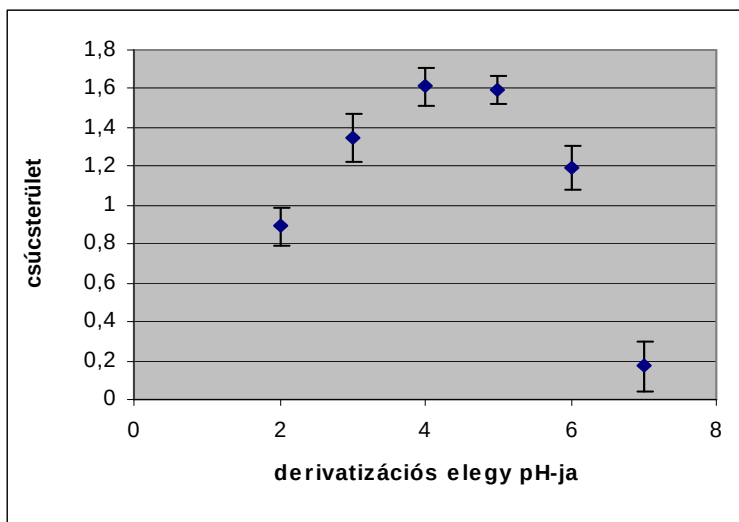
A GC fűtött injektorában végbemenő termikus deszorpció folyamatot vizsgálva megállapítottam, hogy 190 °C deszorpció hőmérsékletet és 0.5 perc deszorpció időt alkalmazva a komponensek 100%-ban lefűtődnek az SPME szálról, semmilyen keresztaszennyeződés nem történik a mérések között.

Összefoglalásként megállapítható, hogy a mintákban általában található két komponens (MeHg és Hg^{2+}) fenilezett származéka, illetve az elemi higany kromatográfiás elválasztása egyszerűen megoldható, gyors hőmérsékletprogram alkalmazása esetén is nagy biztonsággal elválasztható a három komponens egymástól. A szilárd fázisú mikroextrakciót headspace módon kivitelezve, viszont a megállapított 10 perc extrakciós idő alkalmazásával a MeHgPh szelektíven extrahálható, a minták szövetlen higany tartalma a PhHgPh kisebb mértékű illékonyságából adódóan csak immerziós eljárással vonható ki. Az egyensúlyi extrakciós idő ebben az esetben is 10 perc.

5.1.2 A fenilezési reakcióhoz szükséges optimális pH meghatározása

A vizes fázisú alkilezési/arilezési származékképző reakciók esetében a közeg pH-ja és a származékképző reagens koncentrációja a kritikus paraméterek. Ami ez utóbbit illeti, *in situ* alkalmazásnál a mátrix egyéb komponenseinek származékképző hajlamát kompenzálendő, a derivatizációs reagenst több nagyságrend feleslegben, általában 1%-os vizes oldatként adagolják. Ebben a kérdésben egységes a témával foglalkozó szakemberek álláspontja. Ami a fenilezési reakcióhoz szükséges optimális pH-t illeti, eltérő véleményeket találunk az irodalomban. Egyes publikációk [Cai et al. 2000] pH = 4.5-ről számolnak be mind etilációs mind fenilációs reakciók esetében, más szerzők pH = 2, 3, 5, esetleg 7.3-at jelölnek meg [Mena 1995, Abuin et al. 2000, Carro 2002, Ipolyi et al. 2004]. A módszer kidolgozása kapcsán az előbbiekből következően én is megvizsgáltam a pH hatását a fenilezésre. Kísérleteimet 0.18 ng ml^{-1} koncentrációjú (arra a „végső” oldatra számolva, amiből az SPME-t végrehajtottam) metil-higany standard oldattal végeztem, az eredményt a **10. ábra** szemlélteti.

10. ábra. A reakcióközeg pH-jának hatása a higanymódosulatok fenilezési reakciójára. Minden beállított pH értéken 3 párhuzamos mintát vizsgáltam.



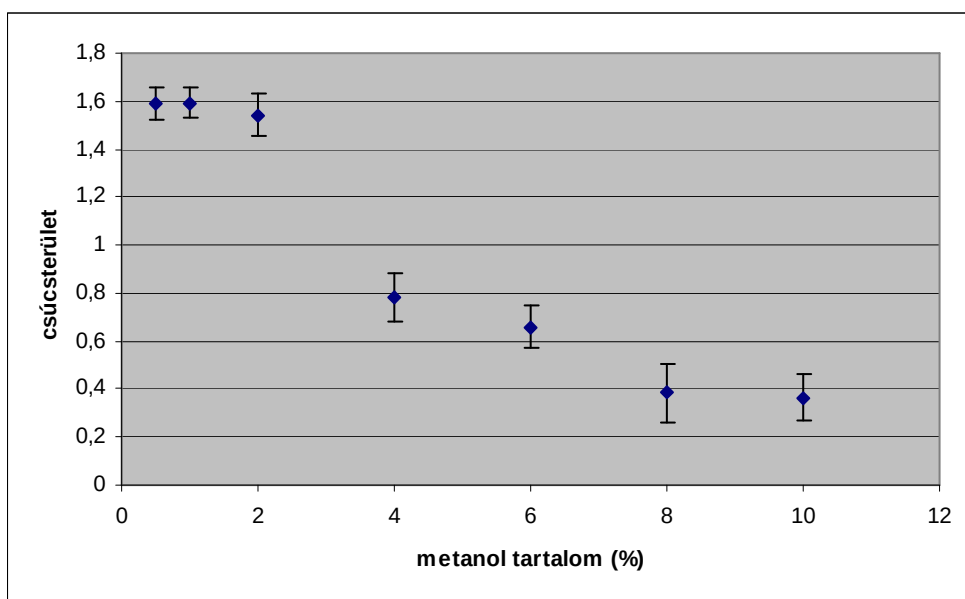
Az eredmények alapján kijelenthető, hogy pH=4-5 között maximális a derivatizáció hatásfoka, így a továbbiakban a fenilezést pH=5-ön hajtottam végre, melyet nátrium-acetát-ecetsav pufferrel biztosítottam.

5.1.3 „Kis higanytartalmú” minták mérése során jelentkező nehézségek kiküszöbölése

5.1.3.1 Metanol tartalom hatása

Abban az esetben, ha egy a kérdéses komponenst viszonylag nagy koncentrációban tartalmazó mintát, a feladathoz mérten megfelelő érzékenységű technikával elemzünk, hígítás révén lehetőség van a mátrixhatás eliminálására, de legalábbis nagymértékű csökkentésére. Az általam kidolgozott módszerben — lúgos-metanolos hidrolízissel kombinált SPME — a feltárt mintaoldat hígítása a mátrixhatás kiküszöbölésén túl, az elegy metanol tartalmának csökkentését is szolgálja. Ez utóbbira azért van szükség, mert a metanol, mint illékony apoláris szerves oldószer szinte azonnal telíti az SPME szálát, gátolva ezzel a mérni kívánt komponens extrakcióját. (**11. ábra**)

11. ábra. A mérendő oldat metanol tartalmának SPME-re gyakorolt hatása. A kísérleteket MeHgCl standard oldatokkal végeztem. A szilárd fázisú mikroextrakciót az alábbi oldatból hajtottam végre : 10ml pH=5 acetát puffer + 0.1 ml 20 ng ml⁻¹ MeHgCl std. oldat + 1 ml 1%-os NaBPh₄ reagens + metanol. Minden beállított metanol tartalom esetében három párhuzamos mintát elemeztem.



Az ábra alapján arra a megállapításra jutottam, hogy a várakozásoknak megfelelően a metanol tartalom növelésével, különösen 2-3 % fölött, a kérdéses komponens extrakciós hatásfoka lényegesen csökkent. Bár az irodalom max. 1 % szerves oldószer tartalmat javasol SPME használat esetén [Pawliszyn 1997], azt tapasztaltam, hogy 2 %-os metanol tartalom mellett még gyakorlatilag maximális hatásfokkal lehet extrahálni. Mindezen tényeken túl a hígítási faktor meghatározásánál természetesen figyelembe kell venni a módszer lineáris mérési tartományát (0.02-0.6 ng ml⁻¹, arra a „végső” oldatra számolva, amivel az SPME-t végrehajtom).

A „nagy higanytartalmú” minták (pl. tonhal BCR-CRM-464) *4.1.1. fejezetben* leírtak alapján történő előkészítése során, az 5 ml „roncsolmányt” végső soron 1200-szoros hígításnak vetettem alá, vagyis metanol tartalomra nézve egy kb. 0.08%-os oldattal valószínűsítem meg a szilárd fázisú mikroextrakciót.

A „kisebb metil-higany tartalmú” hiteles anyagminták (TORT-2) vagy T34 (BCR-710 néven hitelesítésre jelölt) minták mintegy 40-szer alacsonyabb koncentrációja nem engedte meg az előbb ismertetett 1200-szoros hígítási faktor alkalmazását. Ezen esetekben a *4.1.1. fejezet* „kis higany tartalmú” mintákra vonatkozó bekezdése alapján jártam el, így sikerült a metanol tartalmat 1% alá (kb.0.8%-ra) csökkentenem.

Meg kell azonban jegyezni, hogy az *5.4. fejezetben* ismertetett halminták mérése során egy-két esetben kénytelen voltam 2 % körüli metanol tartalmú oldattal végrehajtani az SPME-t, ugyanis egyes minták igen kis higany koncentrációja nem engedte meg a nagyobb mértékű hígítást.

5.1.3.2 A kálium hatása

A módszerfejlesztés során az első időszakban BCR 464 hiteles anyagmintával dolgoztam, hiszen könnyebb volt paramétereket vizsgálni és optimalizálni egy mg kg⁻¹-es tartományba eső MeHg koncentrációjú mintával, mint egy kevésbé szennyezettel. Miután azonban valódi minták analízise volt a végső célom, validálnom kellett a módszert valódi minták metil-higany koncentráció-tartományába (50-200 µg kg⁻¹) eső referenciamintákkal is. TORT-2 és T-34 mintákra alkalmazva (a hígítási faktort persze a fentiek szerint megváltoztatva) a korábban a BCR 464 által már „jónak” minősített módszert, nem sikerült metil-higany jelet detektálni. Hasonló jelenséget tapasztaltam a metil-higany standardokkal adalékolt (ezáltal többszörösére növelt koncentrációjú) minták mérése során is. Értetlenül álltam a jelenség előtt, bár az okok után kutakodva kiderült, hogy nem egyedülálló dologról van szó, hasonló tapasztalatokról számolnak be Lorenzo és munkatársai [Lorenzo et al. 1999] üledékminták analízise során. Más szerzők [Grinberg 2003a] TORT-2 hiteles anyagminta —

lúgos-metanolos hidrolízis, fenilezési reakció és SPME alkalmazásával történő — kis hatásfokú (75%) elemzéséről írnak, ugyanakkor fenilezés helyett etilezést választva a módszer hatásfoka jelentősen javult.

Gőztér helyett immerziós módon végrehajtva a mérést, az oldatfázisból sem sikerült komponenszt extrahálni. Úgy tűnt tehát, hogy MeHgPh nem képződött a derivatizáció során, vagy jelen van ugyan, de valamilyen oknál fogva nem extrahálható. Mivel a feltárt mintaoldat feltűnően „zavaros”, inhomogén jelleget öltött az előző BCR 464-el végzett kísérlethez képest, a jelenség lehetséges okaként a feltárás során a mátrix esetlegesen elégtelen elbontását jelöltem meg. Ez a következő lehetőségeket vonhatja maga után : (1) az el nem bontott „mátrix darabok” adszorpciós felületként szolgálhatnak a fenilezett származékok számára, gátolva ezzel azok extrakcióját, (2) a mátrix egyes elemei csökkentik a komponensek derivatizációs hatásfokát, például azáltal, hogy ők maguk is fogyasztják a származékképző reagenst. Ez utóbbi magyarázatot elvetettem, miután a NaBPh₄ reagens megnövelt (még nagyobb feleslegben adagolt) mennyiségét adagolva sem sikerült megoldani a problémát. Az egyetlen ésszerű megoldásnak az tűnt, hogy megpróbáljam a mátrix teljesebb elbontását elérni a mérendő komponensek integritásának megőrzésével. E célból pronáz enzimmel végrehajtott fehérjebontást alkalmaztam a feltárás előtt, illetve a feltárást követően az el nem bontott, lehetséges adszorpciós felületként szolgáló mátrix részeket centrifugálással elválasztottam. Erőfeszítéseim ezúttal sem jártak sikerrel.

Végül a fent említett jelenség magyarázatát egy igen régi, klasszikus analitikai publikációban [Schall 1957] találtam meg. Egy a kálium és a tetrafenil-borát között lejátszódó csapadékképző reakció okozta a problémát. Ez a reakció két okból is lehetetlenné tette a méréseket. Egyrészt a képződött csapadék potenciális adszorpciós felületként jöhet szóba, megkötve a komponenseket, ezáltal lehetetlenné téve az extrakciót, másrészt a csapadékképzés, mint mellékreakció, erőteljesen fogyasztja a NaBPh₄ reagenst, így kevesebb marad a mérni kívánt komponensre. Jogosan felmerülhet a kérdés, hogy akkor vajon ugyanezzel a módszerrel analizálva a BCR 464 mintát, ott miért nem okozott gondot ez a jelenség. Természetesen csapadék akkor is képződött, azonban a nagyobb (kb. 10-szeres) hígítási faktornak köszönhetően a derivatizálásra szánt „végső” oldatban a kálium koncentráció csak mintegy tizede volt, mint az előbbi minták esetében, így jóval több reagens maradt a kérdéses komponensek derivatizációjára. A probléma megoldásaként a „kis higanytartalmú” minták további mérése során, a lúgos feltárást KOH-os metanol helyett ugyanolyan koncentrációjú (4.5M) NaOH-os metanollal végeztem. Ezen minták elemzése során minden esetben standard addíciós kalibrálást végeztem, a kis hígítási faktor miatt

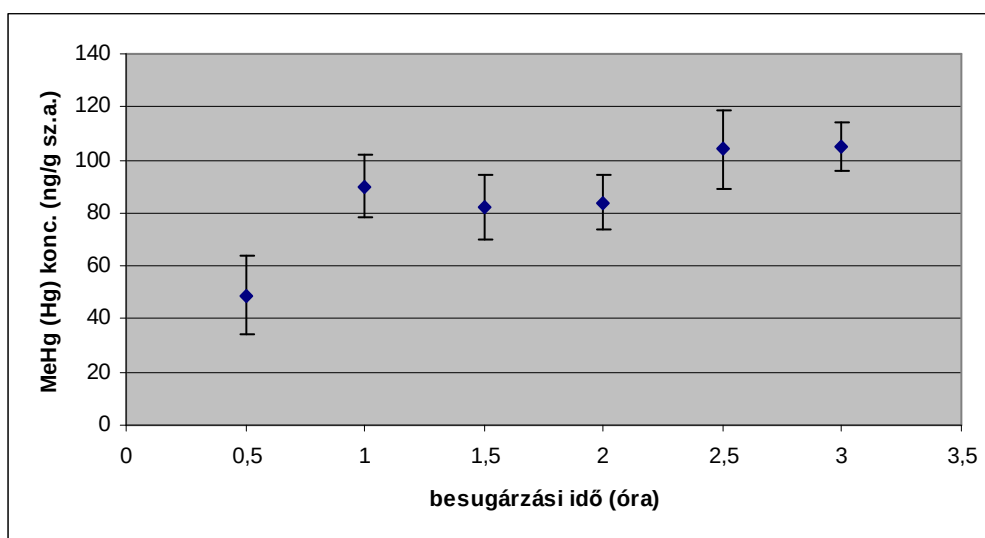
jelentkező mátrixhatást így kezelni tudtam. Ily módon TORT-2 minta mérése során 99.7%-ban ($n=3$), T34 minta esetében 99.5%-ban ($n=3$) sikerült visszamérni a hitelesített értéket.

Összefoglalásként megállapítható, hogy a KOH-val végzett lúgos feltárás és a NaBPh_4 reagenssel végzett fenilezési reakció együttes alkalmazása gondot okozhat különösen „kis higany tartalmú” (néhány száz ppb alatt) minták mérése során, a kálium és a tetrafenilborát közti csapadékképződési mellékreakció miatt. A nehézség kiküszöbölhető KOH helyett NaOH alkalmazásával a feltárás során.

5.1.4 A lúgos feltárás során alkalmazott ultrahangos kezelés időtartamának optimalizálása

Az irodalom szerint [Ebdon 2002] a higanyspeciációs mintaelőkészítések során általában 1-4 óra viszonylag nagy hőmérsékleten történő ultrahangos kezelést alkalmaznak a komponensek felszabadítására. Annak ellenére azonban, hogy ultrahangos fürdő használatával egyszerre több (8-10) minta kezelése is lehetséges, az eljárás még mindig elég időigényes. Vizsgálatom célja az volt, hogy optimalizáljam az ultrahangos feltárás körülményeit, illetve megpróbáljam rövidíteni ezt az elég időigényes folyamatot. Kísérleteimet T34 referenciaminta segítségével végeztem. 250 mg mintára 5 ml NaOH-os metanolt mértem, és az így előkészített elegyet 75 °C-on 0.5—3 óra időtartamú ultrahanghatásnak vetettem alá, majd derivatizáltam, extraháltam és mértem. A kísérlet eredményeit a **12. ábra** szemlélteti.

12. ábra. A T34 referencia mintában mért MeHg koncentrációk 75 °C-on, különböző ideig végzett ultrahangos feltárás függvényében. A T34 referencia minta hitelesített MeHg (mint Hg) koncentrációja : $0.106 \pm 0.013 \text{ mg kg}^{-1}$ szárazanyagra számolva. Minden beállított paraméter esetében 3 párhuzamosan előkészített mintát analizáltam.



Mint látható 75 °C-on legalább 2.5 óra szükséges a minta hatékony feltárására, a jobb precizitás elérése érdekében azonban kísérleteimben 3 órás ultrahangos besugárzást alkalmaztam a továbbiakban.

5.1.5 A módszer analitikai teljesítménye és validálása

A módszer kimutatási határa (a vak minta által szolgáltatott jel szórásának háromszorosa osztva az érzékenységgel) 0.006 ng ml^{-1} , meghatározási határa (vak érték + vak jel szórásának tízszerese) 0.018 ng ml^{-1} metil-higanyra. A lineáris tartomány $0.02\text{-}0.6 \text{ ng ml}^{-1}$ közé tehető. A „nagy higanytartalmú” mintákkal végzett mérések relatív szórása 4% körül van, a „kis higanytartalmú” minták esetében ugyanezen érték 10-15%.

A módszer minőségbiztosítását két különböző hitelesített referenciaminta (BCR-CRM-464 tonhal, és TORT-2 homár hasnyálmirigy) és T34 (BCR 710, osztriga) hitelesítésre jelölt referenciaminta felhasználásával végeztem el. A validálás eredményei a **9. táblázatban** kerülnek bemutatásra.

9. táblázat. CRM-mérések eredményei. Mindegyik mintából három párhuzamos feltárás készült, a mérések során standard addíciós kalibrációt alkalmaztam.

Minták	mért MeHg (mint Hg) konc. (mg kg^{-1} sz.a., 1 SD)	hitelesített MeHg(mint Hg) konc. (mg kg^{-1} sz.a., 1 SD)
BCR-CRM-464 (tonhal)	4.85 ± 0.20	5.12 ± 0.16
TORT-2 (homár hasnyálmirigy)	0.151 ± 0.018	0.152 ± 0.013
T34 (osztriga)	0.105 ± 0.017	0.106 ± 0.013

A BCR 464 CRM minta alkalmazása abból a szempontból volt indokolt, hogy mátrixával modellezni tudtam a későbbiekben mérni kívánt élelmiszermintákat (halakat). Másrészről azonban MeHg koncentrációja jóval magasabb, mint a valódi mintáké általában, így a módszer korrekt minőségbiztosítása szempontjából szükség volt egy olyan CRM-re is (TORT-2), melynek metil-higany koncentrációja a valódi mintákéval nagyjából egybeesik. Végül kísérleteimhez felhasználtam a T34 referencia mintát is, hiszen mind mátrix, mind koncentráció tekintetében ez tűnt a legmegfelelőbbnek, és bár nem CRM, mégis egy korábban végzett körelemzés tesztmintájaként rendelkezik referenciaértékkel és az ahhoz tartozó bizonytalansági intervallummal.

5.2 A kidolgozott módszer bizonytalanságbecslése

5.2.1 A bizonytalansági források megnevezése, a számolások során alkalmazott törvényszerűségek, képletek ismertetése

Manapság a minőségbiztosítás kapcsán egyre gyakoribb elvárás az alkalmazott mérési módszerek bizonytalanságbecslésének elvégzése. Ezt az elvárást figyelembevéve, az ebben a fejezetben tárgyalt kísérleti munka célja az volt, hogy definiáljam a módszer úgynevezett „kritikus pontjai”, azokat a lépéseket, részfolyamatokat, melyek kivitelezése a precizitás szempontjából a továbbiakban nagyobb körütekintést igényel. Meg kívántam határozni, hogy az általam kidolgozott „nagy” illetve „kis” higanytartalmú minták mérése során kapott szórásértékekhez az analízis egyes részfolyamatai milyen mértékben járulnak hozzá, az egyes részfolyamatok bizonytalansága hogy hat a végeredményre. Kísérleteimhez BCR 464 („nagy” higany koncentrációjú minta) és TORT-2 („kis” higany koncentrációjú minta) CRM mintákat használtam fel. A minták előkészítését a 4.1.1. fejezetben leírtak alapján végeztem.

Első lépésként meghatároztam a mérendő mennyiség — metil-higany (mint higany) koncentráció $\mu\text{g g}^{-1}$ a szilárd minta szárazanyagtartalmára számolva — kiszámolásához szerkesztett képletet. BCR 464 minta esetében a (8), TORT-2 esetében a (9) egyenlet alkalmaztam, ahol c koncentráció a „végső” oldatban (az a derivatizációs elegy, amiből az SPME-t végrehajtottam) mért koncentráció, a térfogatmérésre vonatkozó jelölések (V, L) a mintaelőkészítés során alkalmazott hígítási lépéseket tükrözik, az m_b a szilárd mintából történő bemérésre vonatkozik, a 10^6 -os osztó pedig a ppt-ben mért koncentráció (c) és a szilárd mintára számolt ppm-ben értendő koncentráció közti átváltás miatt szerepel a képletben. A jelölések részletesebb magyarázata a 10. és 11. táblázatban található.

$$y = \frac{c(v_1 + v_2 + v_{10})}{v_3} \cdot L_{10} \cdot L_{50} / m_b \cdot 10^6 \quad (8)$$

$$y = \frac{c(v_1 + v_2 + v_{10})}{v_3} \cdot L_{10} \cdot v_5 / m_b \cdot 10^6 \quad (9)$$

A következő lépést az eredmények precizitását befolyásoló bizonytalansági források megjelölése jelentette. Ezek egy része látható a fenti egyenletekben, gondolok itt a mintaelőkészítés során alkalmazott tömeg,- és térfogatmérésekre, a bizonytalansági források

másik része viszont tételesen nincs feltüntetve. Ennek oka elsősorban az, hogy akármelyik koncentrációtartomány mérése is a cél, igen összetett eljárást kell alkalmazni a mintaelőkészítés során, kezdve a feltárástól a hígításokon át, az alkalmazott derivatizációs lépésekig, illetve az ezt követő szilárd fázisú mikroextrakcióig, ráadásul mérni csak akkor tudunk, ha minden egyes lépés szinte teljesen (nagy hatásfokkal) megvalósul. Mivel az egyes részfolyamatok pl. derivatizáció, vagy SPME...stb. és az eredmény kapcsolatát nem egyszerű matematikai formulával leírni, úgy vettem, hogy a fenti egyenletekben szereplő ún. „c” koncentráció tag bizonytalansága foglalja magába a feltárás ismételhetőségét, a derivatizációs reakció ismételhetőségét, az SPME ismételhetőségét, a kalibrálási bizonytalanságot, a deszorpció folyamatának és a mérőműszer teljesítményének, karakterisztikájának esetleges változását. A definiált bizonytalansági források a **10-11. táblázatban** kerülnek bemutatásra.

10. táblázat. A BCR 464-re kidolgozott módszer alkalmazása során fellépő bizonytalansági források. „a” derivatizáláshoz felhasznált 1 ml hígított mintaronsolmányra vonatkozik, „b” az 1 ml NaBPh₄ reagensre vonatkozik, „c” az 50 ml hígított feltárt elegyből történő 1 ml mintarészlet kivételére vonatkozik.

Forrás megnevezése	bizonytalanság jelölése	mértékegység	becslés típusa
x_i	$u(x_i)$		
koncentrációmérés	$u(c)$	pg ml ⁻¹	A
térfogatmérés (pipettázás 1ml) ^a	$u(V_1)$	ml	A
térfogatmérés (pipettázás 1ml) ^b	$u(V_2)$	ml	A
térfogatmérés (pipettázás 10ml)	$u(V_{10})$	ml	A
térfogatmérés (lombik jelretöltés, 10ml)	$u(L_{10})$	ml	A
térfogatmérés (lombik jelretöltés, 50ml)	$u(L_{50})$	ml	A
térfogatmérés (pipettázás 1ml) ^c	$u(V_3)$	ml	A
tömegmérés (szilárd minta bemérése)	$u(m_b)$	g	B

11. táblázat. A TORT-2-re kidolgozott módszer alkalmazása során fellépő bizonytalansági források. „a” derivatizáláshoz felhasznált 1ml hígított mintaoldatra vonatkozik, „b” az 1ml NaBPh₄ reagensre vonatkozik, „c” az 5 ml feltárt elegyből történő 1ml mintarészlet kivételére vonatkozik.

Forrás megnevezése	bizonytalanság jelölése	mértékegység	becslés típusa
x_i	$u(x_i)$		
koncentrációmérés	$u(c)$	pg ml ⁻¹	A
térfogatmérés (pipettázás 1ml) ^a	$u(V_1)$	ml	A
térfogatmérés (pipettázás 1ml) ^b	$u(V_2)$	ml	A
térfogatmérés (pipettázás 10ml)	$u(V_{10})$	ml	A
térfogatmérés (lombik jelretöltés, 10ml)	$u(L_{10})$	ml	A
térfogatmérés (pipettázás 5ml)	$u(V_5)$	ml	A
térfogatmérés (pipettázás 1ml) ^c	$u(V_3)$	ml	A
tömegmérés (szilárd minta bemérése)	$u(m_b)$	g	B

Ezek után kvantifikáltam az egyes bizonytalansági forrásokat, vagy méréssel („A” típusú becslés), vagy becsléssel („B” típusú becslés) [ISO/GUM 1993]. Az erre vonatkozó adatok a **12-13. táblázatban** szerepelnek.

12. táblázat. „A” és „B” típusú becslések a BCR 464 mérésére vonatkozó, 8. egyenletben szereplő bizonytalansági forrásokhoz. A bekeretezett $u(c)$ értéke, a c komplexitásából adódóan kezdetben ismeretlen, magyarázat, illetve meghatározásának menete a szövegben található.

biz.jelölése	mértékegység	párhuzamosok száma	átlag	szórás
„A” típusú becslések				
$u(c)$	pg ml ⁻¹			
$u(V_1)$	ml	6	0.9989	0.0061
$u(V_2)$	ml	6	0.9989	0.0061
$u(V_{10})$	ml	6	9.9589	0.0948
$u(L_{10})$	ml	6	9.9839	0.0332
$u(L_{50})$	ml	6	49.9672	0.1457
$u(V_3)$	ml	6	0.9989	0.0061

„B” típusú becslések

biz.jelölése	mértékegység	x_i	becsült átl. hiba	eloszlás típusa.	$u(x_i)$
$u(m_b)$	g	0.250	± 0.0001	négysz.	5.77 E-5

A táblázatban szereplő pipettázások és lombikjelretöltés ismételhetőségét jelző szórásértékeket többször elvégzett művelettel meg lehet határozni, és a már ismertett 8. illetve 9. képlet alkalmazásával ezek eredményre gyakorolt hatását is ki lehet számolni. A koncentrációmérés bizonytalansága is megbecsülhető, de mindazon folyamatok bizonytalanságáról, amik ebben $u(c)$ -ben megnyilvánulnak nincsen információ. Ebből kiindulva olyan kísérletsorozatot terveztem, mely lehetővé tette a „c” bizonytalanságának a felbontását, és az ebben foglalt folyamatok (feltárás, derivatizáció, kalibráció, SPME, deszorpció, műszerállandóság) bizonytalanságának egyenkénti, méréssel történő meghatározását.

13. táblázat. „A” és „B” típusú becslések a TORT-2 mérésre vonatkozó, 9. egyenletben szereplő bizonytalansági forrásokhoz. A bekeretezett $u(c)$ értéke, a c komplexitásából adódóan kezdetben ismeretlen, magyarázat, illetve meghatározásának menete a szövegben található.

biz.jelölése	mértékegység	párhuzamosok száma	átlag	szórás	
„A” típusú becslések					
$u(c)$	pg ml ⁻¹				
$u(V_1)$	ml	6	0.9989	0.0061	
$u(V_2)$	ml	6	0.9989	0.0061	
$u(V_{10})$	ml	6	9.9589	0.0948	
$u(L_{10})$	ml	6	9.9839	0.0332	
$u(V_5)$	ml	6	4,9712	0.0487	
$u(V_3)$	ml	6	0.9989	0.0055	
„B” típusú becslések					
biz.jelölése	mértékegység	x_i	becsült átl. hiba	eloszlás típusa.	$u(x_i)$
$u(m_b)$	g	0.250	± 0.0001	négysz.	5.77 E-5

A számolások során minden egyes paraméter bizonytalanságának (szórásának) eredményre gyakorolt hatását külön megvizsgáltam, vagyis az eredmény bizonytalansága ($u(y_i)$) és az adott paraméter bizonytalansága ($u(x_i)$) közti függvénykapcsolat (f) x_i szerinti első parciális deriváltját $\left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)$ képeztem. A számolás során azzal a feltételezéssel éltem, hogy megfelelően kis intervallumokat véve alapul az f függvény az x_i értéke körül lineáris, így végső soron a 10. egyenlettel dolgoztam, vagyis minden egyes paraméter esetén kiszámoltam a paraméter átlagának és szórásának összegével a végeredményt, illetve az adott paraméter átlagával számolt végeredményt, és a kettő különbsége megadta az adott paraméter bizonytalanságának eredményre gyakorolt hatását.

$$u(y_i) = y(x_i + u(x_i)) - y(x_i) \quad (10)$$

Az összesített, vagy kombinált bizonytalanságot az egyes $u(y_i)$ tagok kombinációjával az ISO/GUM útmutatásai alapján a 11. egyenletben meghatározott módon képeztem, ahol n a bizonytalansági források száma.

$$u(y) = \sqrt{u^2(y_1) + u^2(y_2) + \dots + u^2(y_n)} \quad (11)$$

5.2.2 A kísérletek menete, az eredmények és azok értékelése

A témával kapcsolatos kísérletek során a mérések precizitása szempontjából valószínűleg legkritikusabb „c” bizonytalansági forrással foglalkoztam, megpróbáltam szétbontani és meghatározni az ebben foglalt egyes folyamatok bizonytalanságának hatását a mért értékekre.

Első lépésben az SPME-deszorpció-műszerállandóság kérdését vizsgáltam. Ehhez mind a BCR 464, mind a TORT-2 minta esetében készítettem egy derivatizációs elegyet (10 ml acetát puffert + 1 ml feltárt és hígított minta + 1 ml NaBPh₄ reagens), melyből többször végeztem szilárdfázisú mikroextrakciót. A kapott integrált csúcsterületek szórását ebben az esetben kizárólag az SPME-, a GC injektorában történő deszorpció- és a műszer állandóságának bizonytalansága okozza. E három bizonytalansági tényezőt egymástól elválasztani nem tudtam, és a továbbiakban $u(SPME)$ néven kezelem. A kísérlet során megállapítottam ezen forrás bizonytalanságának eredményre gyakorolt hatását a 8. és 9. egyenletek segítségével. Az eredmények a **14. és 15. táblázatban „a”** jelzéssel kerültek bemutatásra.

A következő lépésben a derivatizáció bizonytalanságának hatását kívántam meghatározni. Ezen vizsgálatok úgy folytak, hogy a mintaelőkészítés során (4.1.1. fejezet) összeállított 10 ml-es oldatokból többször vettem ki 1 ml-t, majd ezek mindegyikét derivatizáltam (hozzáadtam 10 ml acetát puffert és 1 ml fenilezőszert), a fenilezett származékokat extraháltam és mértem. A kapott jelek szórását ebben az esetben a derivatizáció-, SPME-, deszorpció-, műszer-, illetve a derivatizációs elegy összeméréséhez alkalmazott pipettázások bizonytalansága határozza meg. Ezen hatások közül, ismerve az előző kísérletből az „SPME-deszorpció-műszer”-ből adódó bizonytalanságot, valamint a pipettázásokból adódó bizonytalanságot is, a **11. egyenlet** alapján kiszámolható az eredmény derivatizáció ismételhetőségéből adódó bizonytalansága. Ez az érték megtalálható a **14-15. táblázatokban „b”** jelzéssel.

A feltárási folyamat ismételhetőségét oly módon vizsgáltam, hogy több párhuzamos feltárást végeztem, majd a megfelelő hígítási lépések után derivatizáltam, extraháltam és mértem. Az eredményeket csupán a jelintenzitás alapján értékeltem, nem alkalmaztam kalibrációt. Az így kapott szórásértékekben minden eddig tárgyalt bizonytalansági forrás hatása nyilvánul, kivéve a kalibrációét. Mivel minden egyéb forrás eredményre gyakorolt hatása már ismert, a **11. egyenlet** segítségével kiszámolható a lúgos feltárási bizonytalanságának hatása a mért eredményre. Az így kiszámolt értékek az **14-15. táblázatokban „c”** jelzéssel szerepelnek.

Végül a kalibráció bizonytalanságának eredményre gyakorolt hatását állapítottam meg. Ehhez több párhuzamos feltárást végeztem, mindegyik esetben standard addíciós kalibrációt alkalmaztam. A számolt koncentrációértékek (az átlag BCR 464 esetében 202 pg ml^{-1} , TORT-2 esetében 63 pg ml^{-1} volt) szórásában minden bizonytalansági forrás szerepet játszik, a kalibráció is. Mivel minden más bizonytalansági forrás hatása már ismert, a kalibráció bizonytalanságának eredményre gyakorolt hatása a *11. egyenlet* alapján számítható. Ez az érték szerepel a **14-15. táblázatban „d”** jelzéssel.

A kísérletileg meghatározott 4 bizonytalansági forrásból a *12. egyenlet* alkalmazásával kiszámolható az $u(y)_c$, illetve ennek segítségével a *12-13. táblázatban* bekeretezett módon ábrázolt, kezdetben ismeretlen $u(c)$.

Végül, miután minden bizonytalansági forrás nagysága már ismert, meghatároztam a módszerre jellemző eredő bizonytalanságot.

14. táblázat. A BCR 464 CRM minta mérése során alkalmazott módszer összetett mérési bizonytalansága.

A koncentrációmérés bizonytalansága – az $u(c)$ – az „a”, „b”, „c”, illetve „d” tagokat foglalja magába. Az ide tartozó magyarázatot a szöveg tartalmazza.

bizonytalansági tényező, u(x _i)		u(y _i)		
u(SPME+deszorpció+mérőműszer) ^a		3,41 E-2		
u(derivatizáció) ^b		5,98 E-2		
u(feltárás) ^c		1,45 E-1		
u(kalibráció) ^d		1.17 E-1		
$u(y)_c = \sqrt{u^2(y_{SPME}) + u^2(y_{derivatizáció}) + u^2(y_{feltárás}) + u^2(y_{kalibráció})} = 0,1985 \tag{12}$				
u(c) = 8,2695				
A módszer egészére vonatkozó összesített bizonytalanság				
Biz. tényező	x _i	u(x _i)	u(y _i)	u ² (y _i)
u(c)	202	8.2695	0.1985	3.94 E-2
u(V ₁)	1	0,0061	-2,69 E-2	7.26E-4
u(V ₂)	1	0,0061	2,46 E-3	6,07 E-6
u(V ₁₀)	10	0,0948	3,83 E-2	1,47 E-3
u(L ₁₀)	10	0.0332	1,61 E-2	2,59 E-4
u(L ₅₀)	50	0.1457	1,41 E-2	2,00 E-4
u(V ₃)	1	0,0061	-2,94 E-2	8,64 E-4
u(m _b)	0,250	5.77 E-5	-1,16 E-3	1,35 E-6
			Σu ² (y _i):	4,29 E-2
összesített bizonytalanság		$u(y) = \sqrt{\Sigma u^2(y_i)}$:		0,21
mért érték : 4.85 μg g ⁻¹ , eredő bizonytalanság: ± 0,21				

15. táblázat. A TORT-2 CRM minta mérése során alkalmazott módszer összetett mérési bizonytalansága.

A koncentrációmérés bizonytalansága - az $u(c)$ - az „a”, „b”, „c”, illetve „d” tagokat foglalja magába. Az ide tartozó magyarázatot a szöveg tartalmazza.

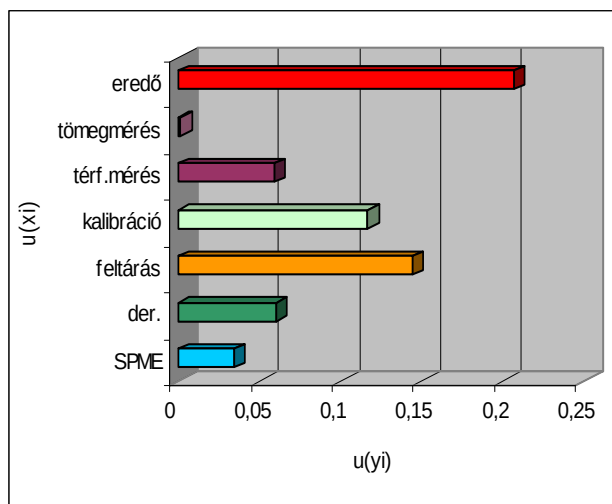
bizonytalansági tényező, u(x _i)		u(y _i)		
u(SPME+deszorpció+mérőműszer) ^a		6,44 E-3		
u(derivatizáció) ^b		4,41 E-3		
u(feltárás) ^c		1,29 E-2		
u(kalibráció) ^d		9,92 E-3		
$u(y)_c = \sqrt{u^2(y_{SPME}) + u^2(y_{derivatizáció}) + u^2(y_{feltárás}) + u^2(y_{kalibráció})} = 1,80 \text{ E-2}$				
u(c) = 7,5251				
A módszer egészére vonatkozó összesített bizonytalanság				
Biz. tényező	x _i	u(x _i)	u(y _i)	u ² (y _i)
u(c)	63	7,5251	1,80 E-2	3.26 E-4
u(V ₁)	1	0,0061	-8,40 E-4	7.06 E-7
u(V ₂)	1	0,0061	7,69 E-5	5,91 E-9
u(V ₁₀)	10	0,0948	1,19 E-3	1,43 E-6
u(L ₁₀)	10	0.0332	5,02 E-4	2,52 E-7
u(V ₅)	5	0,0487	1,47 E-3	2,17 E-6
u(V ₃)	1	0,0061	-9,17 E-4	8,40 E-7
u(m _b)	0,250	5.77 E-5	-3,63 E-5	1,32 E-9
			Σu ² (y _i):	3,32 E-4
összesített bizonytalanság		$u(y) = \sqrt{\Sigma u^2(y_i)}$:		1,82 E-2
mért érték : 0,151 μg g ⁻¹ , eredő bizonytalanság: ± 0,018				

A táblázat adatait, illetve a kísérletek eredményeit teszi szemléletesebbé a **13. és 14. ábra**. Az előbbi, az egyes bizonytalansági források ($u(x_i)$) eredményre gyakorolt hatását ($u(y_i)$) ábrázolja, az utóbbi azt mutatja, hogy az összesített bizonytalanság négyzete, az $u^2(y)$, hogy oszlik meg az egyes $u^2(y_i)$ tagok között. Bár az egyes bizonytalansági források eredményre gyakorolt hatásainak arányai megváltoztak a négyzetre emelések során, az mind a 13. mind a 14. ábra alapján kijelenthető, hogy függetlenül a mért koncentráció tartománytól a mérés precizitása szempontjából elsősorban a feltárás-, másodsorban a kalibráció bizonytalansága a meghatározó.

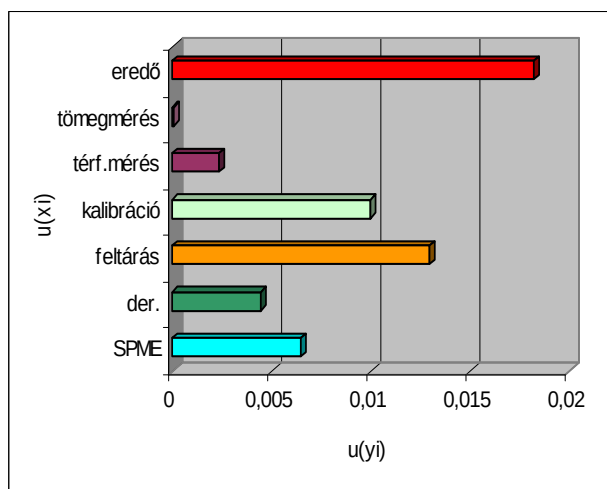
A feltárás viszonylag nagy bizonytalansága véleményem szerint az ultrahangos fürdőnek tulajdonítható. Befolyásolhatja az eredményeket ugyanis, hogy hány mintát kezelek egyszerre, hova helyezem a kádban a mintákat, mennyi vizet töltök a minták köré, mekkora mintatérfogatot alkalmazok...stb. A fent említett tényezők hatását nem vizsgáltam, a

13. ábra

Az egyes bizonytalansági források eredményre gyakorolt hatása, „a” BCR 464, „b” TORT-2 minta mérése során.



a



b

módszerfejlesztés során egyedül az alkalmazott kezelési időt és hőmérsékletet optimaltam, így elképzelhetőnek tartom a fent említett tényezőkben keresni a bizonytalanság elsődleges okait.

Viszonylag nagy a kalibráció bizonytalanságának tulajdonított világoszöld mező is. Ez abból adódhat, hogy a minták mérése során minden egyes feltáráshoz külön-külön készítettem standard addíciós sorozatot (ez feltárásonként 3-4 minta mérését jelentette). Az eredmények tükrében megállapítható, hogy feleslegesen nagy bizonytalansági faktort jelent ilyen módon végezni a kalibrációt, a továbbiakban inkább célszerű mintatípusonként egyet addicionálni, és a párhuzamos feltárások eredményeit annak az egy egyenesnek az egyenletével számolni. Fontosnak tartom azonban megjegyezni, hogy különböző mintatípusok mérésekor

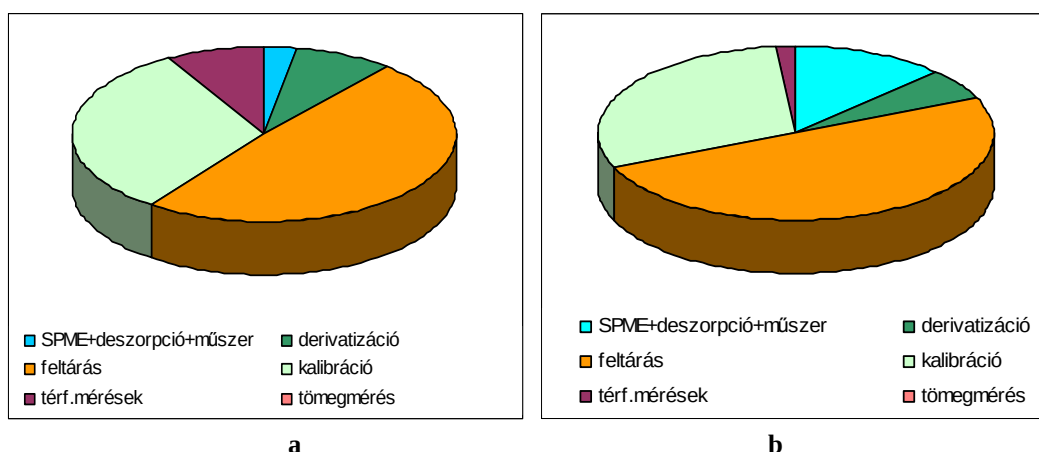
(pl. a halminták mérésekor, lásd 5.4. fejezet) jelentős mértékű regressziós eltéréseket tapasztaltam az egyes minták között, így annak ellenére, hogy hasonló mátrixú halminta volt mindegyik, egy minta mérése során kapott kalibrációs egyenes egyenletével nem lehetett kiszámolni a többi minta koncentrációját.

Az SPME és a derivatizáció ismételhetőségét összehasonlítva jól látszik, hogy az előbbi bizonytalansága a kisebb koncentrációjú TORT-2 minta mérése során meghatározóbb, a derivatizáció bizonytalansága ellenben a nagyobb koncentrációjú BCR 464 elemzése során bizonyult nagyobbak. Amennyiben ez a tapasztalat általánosítható a kisebb illetve a nagyobb koncentráció tartományra, akkor annak oka lehet az előbbi esetben a nagyobb metanol

koncentráció, illetve a „töményebb” mátrix, az utóbbi esetben esetleg a kálium és a NaBPh₄ reagens közötti esetlegesen előforduló kismértékű csapadékképződési reakció (lásd 5.1.3.2. fejezet).

A térfogatmérések és főleg a tömegmérés bizonytalansága, várakozásaimnak megfelelően, különösen a kisebb koncentráció tartomány mérésekor gyakorlatilag elhanyagolható.

14. ábra. Az összesített bizonytalanság négyzetének eloszlása az egyes $u^2(y_i)$ tagok között.



Mindezekon túl hangsúlyozni szeretném, hogy az alábbiakban ismertetett vizsgálatok a módszer precizitását voltak hivatottak meghatározni, az eljárás pontosságáról nem adnak információt. A “recovery” problémája mindig kulcskérdés minden módszer esetén, meghatározása sok esetben igen bonyolult. Az általam kidolgozott eljárást véve alapul, a CRM minták méréseinek eredményéből az látszik (9. táblázat), hogy BCR 464 esetében 95%-ban kaptam vissza a hitelesített értéket, TORT-2 minta esetében igaz jóval nagyobb szórással, de gyakorlatilag 100%-os kinyeréssel dolgoztam. Azt gondolom, hogy ellentétben a “többfaktoros” precizitással, a két minta mérésének pontosságbeli különbsége elsősorban a kalibrációnak köszönhető. A kalibrációs standard oldatok készítése a MeHgCl erősen toxikus jellegéből adódóan ugyanis szigorúan betartott óvintézkedések mellett történik, így minden igyekezetünk ellenére a standard oldatoknak tulajdonított koncentrációértékek kissé eltérhetnek a tényleges koncentrációktól. További problémát jelenthet a MeHgCl standard oldatok kétséges stabilitása, annak ellenére, hogy az oldatokat a 3.2.2. fejezetben leírtak szerint kezeltem. Mindenesetre a két minta mérés során különböző standard törzsoldatból hígítottam a kalibráló standard oldatokat (hiszen a minták mérése különböző időben történt, a tömény standard oldat viszont csak kb. 2 hónapig stabilis), így talán ennek köszönhető a kapott “recovery” eltérés. Véleményem szerint a pontosságot sem az SPME — hiszen előzetes SPME kinetikai vizsgálataim alapján egyensúlyi rendszeren végeztem az extrakciót,

és az addíciónált standard komponens extrakciója is a mintaoldatból, ugyanolyan mátrix- és metanol koncentráció mellett történt mint a mintakomponenseké — sem a derivatizáció — hiszen a származékképző reagenst a mérendő komponenshez képest több nagyságrend feleslegben adagoltam a feltárt mintához, valamint az addíciónált standard komponens is ugyanazon derivatizációs folyamaton ment keresztül mint a minta — nem korlátozza. Ezen folyamatok gyakorlatilag maximális hatásfokkal mennek végbe.

Végezetül a módszer precizitására visszatérve, úgy gondolom, hogy a vizsgálat eredményeinek értékelésénél, illetve a módszer minősítésénél figyelembe kell venni a koncentrációtartományt is, amiben dolgozunk. Annak tükrében kell megítélni a TORT-2 mintára kapott kb.12%, vagy az 5.4. *fejezetben* még ezután ismertetett halminták mérése során esetenként előforduló 15-16%-os relatív szórás értékeket, hogy ezen összetett mátrixú valódi minták metil-higany koncentrációjának mérése csupán néhány tíz ppt koncentráció tartományban történik.

5.3 A módszer minőségbiztosítása nemzetközi körelemzésekben való részvétellel

5.3.1 CCQM-P39 és CCQM-P39.1 körelemzések

A CCQM-P39, illetve a CCQM-P39.1 körelemzések a Nemzetközi Súly- és Mértékügyi Hivatal (Bureau International des Poids et Mesures, BIPM) Anyagmennyiségi Tanácsadó Bizottságának (Consultative Committee for Amount of Substance – Metrology in Chemistry, CCQM) kezdeményezésére, az Európai Bizottság Anyagminta és Mérési Intézete (IRMM) szervezésében folytak 2003-ban és 2005-ben. A CCQM-P39 körelemzés eredményei a *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* folyóirat egy 2005-ben megjelent cikkében [Quétel 2005] kerültek bemutatásra, a CCQM-P39.1 körelemzés eredményei pedig a *Metrologia Technical Supplement* 43. számában [Aregbe 2006] olvashatóak. A cél mindkét esetben a résztvevő laboratóriumok valódi minták arzén, szelén, ólom, higany és első ízben metil-higany koncentrációjának mérésére kidolgozott eljárásainak nemzetközi mezőnyben történő megmérettetése, alkalmasságának igazolása volt. A CCQM-P39 körelemzésben 13 nemzeti metrológiai intézet (NMI) mellett 8 meghívott külső laboratórium, a CCQM-P39.1 - ben 6 NMI és 6 külső labor vett részt. **(16. táblázat)**

16. táblázat. Részrtvevők a CCQM-P39 és a CCQM-P39.1 körelemzésekben

CCQM-P39 résztvevők

*NMI***BAM** (Bundesanstalt für Materialforschung und-prüfung, Németország)**CENA** (Centre for Nuclear Energy and Agriculture, Brazília)**IAEA** (International Atomic Energy Agency)**LGC Ltd.** (Laboratory of the Government Chemist, UK)**SP** (Sveriges Provnings-och Forskningsinstitut, Svédország)

CCQM-P39.1 résztvevők

BAM**CENA****IAEA****LGC Ltd.****SP****NRCCRM** (National Research
Centre for Certified Reference Material,
Kína)**BMN-LNE** (Bureau National de Métrologie-Laboratoire National d'Essais, Franciaország)**IMGC** (Institute of Metrology G. Colonnetti-University of Pavia, Olaszország)**IRMM** (Institute for Reference Materials and Measurement, EB)**KRISS** (Korea Research Institute of Standards and Science, Koreai Köztársaság)**NARL** (National Analytical Reference Laboratory, Ausztrália)**NIST** (National Institute of Standards and Technology, USA)**NMIJ** (National Metrology Institute of Japan, Japán)**NRC** (National Research Council Canada, Kanada)*Külső meghívott laborok***BKÁE-ÉT** (Budapest Közgazdaságtudományi és Államigazgatási Egyetem)**Budapest Corvinus Egyetem****LCABIE-University of Pau****LCABIE-University of Pau**

(Laboratory of analytical and bio-inorganic environmental chemistry, Franciaország)

Trent University (Kanada)**Trent University** (Kanada)**University of Oviedo** (Spanyolország)**University of Oviedo** (Spanyolország)**JSI** (Jozef Stefan Institute, Szlovénia)**JSI** (Jozef Stefan Institute, Szlovénia)**APAT** (Agenzia Protezione Ambiente e
servizi Tecnici, Olaszország)**ENEA** (Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente, Olaszország)**Frontier Geosciences Inc.** (USA)**Umea University** (Svédország)

5.3.2 Minták

A 2003-ban folyt CCQM-P39 felmérés tesztmintája a Földközi-tengerből (Messina közelében) halászott tonhal minta volt, melyet az Európai Bizottság által törvényileg megállapított [EC 221/2002] határértéket jóval meghaladó higany tartalma miatt ki kellett vonni a kereskedelmi forgalomból. Az egyéb, még mérendő fémkomponensek koncentrációi éppen az előírt határértékek felső határán, vagy annál kissé magasabbak voltak.

A CCQM-P39.1 körelemzésben Norvégiából származó lazacmintát analizáltak a résztvevők. A minta ólomtartalma kissé magasabb, higany tartalma viszont jóval alacsonyabb volt mint az előírt határérték. Ebben a felmérésben is lehetőség volt egyéb fémkomponensek (As, Se, Pb) mérésére, az igazi kihívást azonban a nem szennyezett valódi minták „igen kis”(az előző tonhal mintánál kb. 50-szer alacsonyabb) higanykoncentrációjának pontos, megbízható analízise jelentette.

A mintákat mindkét esetben liofilezve és homogenizált formában bocsátották rendelkezésünkre. A homogenitás vizsgálat az ISO Guide 35:1989 által megállapított módon lett végrehajtva varianciaanalízis (ANOVA) alkalmazásával [Linsinger 2001, van der Veen 2001]. A vizsgálat során a fent említett 5 komponensre nézve 0,5-2,5% relatív szórásértékeket állapítottak meg.

5.3.3 Eredmények

A CCQM-P39 tárgyat képező tonhal minta metil-higany és összes higany koncentrációját is mértük (szelén,- és arzén koncentrációt is, mivel azonban ez nem a saját munkám és nem is kapcsolódik a disszertáció témájához, további tárgyalásától eltekintek), a CCQM-P39.1 tesztmintájában, a lazacban csak metil-higany koncentrációt határoztunk meg. Az összhigany mérések közvetlen higany analizátor segítségével a MAFI-ban folytak közvetlenül a szilárd mintából.

A higanyspeciációs mintaelőkészítés során a CCQM-P39 keretében analizált tonhal mintát a 4.1.1. fejezetben leírt „nagy” higany tartalmú mintákra vonatkozó eljárásnak vetettem alá, CCQM-P39.1 kapcsán mért lazac minta esetében ugyanezen fejezet kis higany tartalmú mintákra vonatkozó részében leírtak szerint jártam el. A mintaelőkészítést követően a korábban már ismertetett (4.4.1. fejezet, 6. táblázat) működési paraméterek mellett SPME-GC-pirolízis-AFS rendszerrel dolgoztam.

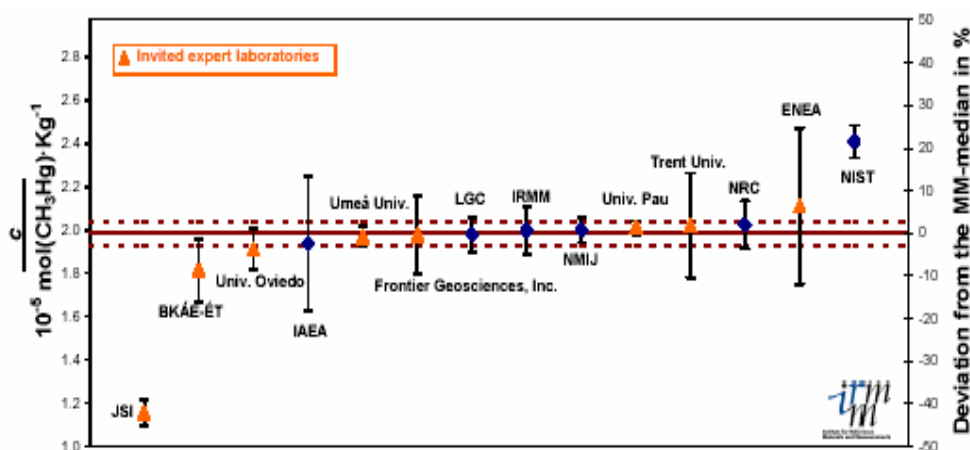
Minden körelemzés, illetve különböző laborok különböző technikával történő mérése során kulcsfontosságú kérdés az eredmények összesítéséhez, kiértékeléséhez, összehasonlításához alkalmazott statisztikai eljárás. A legtöbb esetben átlagot (mean) számolnak a beérkező adatokból (melynek során gyakran a kiugró „outlier” értékeket egyszerűen figyelmen kívül hagyják), máskor a kiugró eredmények szempontjából robosztusabb középértékkel (median) kalkulálnak. A CCQM-P39 és a CCQM-P39.1 körelemzések kapcsán az eredmények kiértékelése során mind metrológiaiailag mind statisztikailag egy viszonylag új, ún. MM-median (mixture model median) értéket állapítottak meg. Ez utóbbi a medianhoz hasonlóan az „outlier” értékek szempontjából robosztus, ugyanakkor figyelembe veszi az egyes mérési eredmények mellé megadott eredő

bizonytalanságokat is, tulajdonképpen a bizonytalansággal súlyozott mért eredmények középértéke [Duewer 2004].

A következőkben bemutatott ábrák helyes értelmezése miatt fontosnak tartom jelezni, hogy a CCQM-P39. körelemzésben *BKÁE-ÉT* néven, a CCQM-P39.1 felmérésben pedig a közben bekövetkezett névváltozás végett már *Corvinus Univ.* (BCE) jelzéssel szerepelnek mérési eredményeink.

15.ábra A CCQM-P39 körelemzés résztvevőinek MeHg eredményei

MM-median : $1,967 \pm 0,054 \cdot 10^{-5}$ mol (MeHg)·kg⁻¹, [$\mu \pm \sigma^*_{t_0}/\sqrt{n}$]

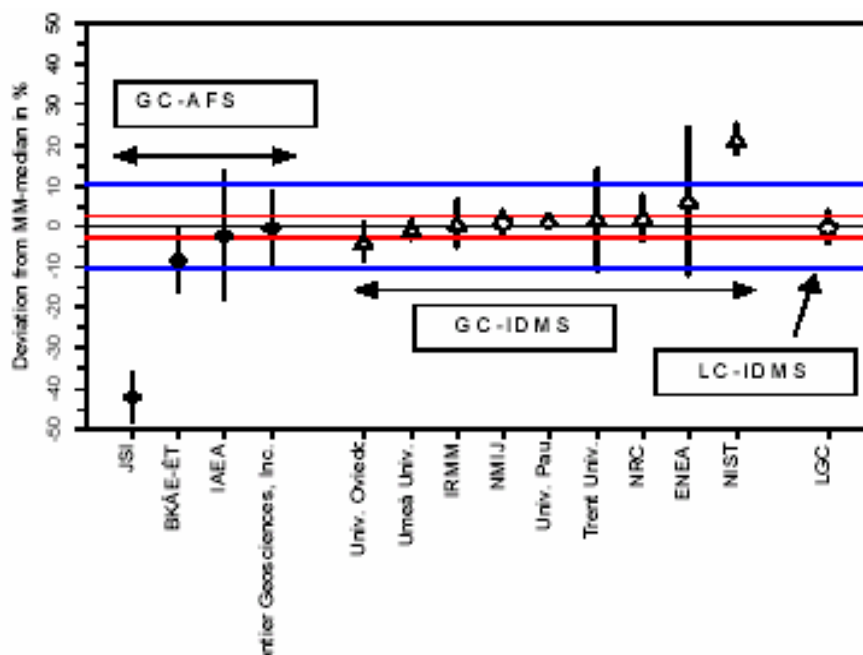


A CCQM-P39 körelemzés résztvevőinek metil-higany eredményeit (15. ábra) értékelve, kijelenthető, hogy a résztvevők túlnyomó többsége (kivéve a JSI és NIST), így az általunk mért koncentráció érték is (BKÁE-ÉT) a megállapított MM-mediántól $\pm 10\%$ -os intervallumon belül található. Amennyiben a NIST kivéve csak a nemzeti metrológiai intézetek eredményeit nézzük, azok által mért koncentrációk az MM-median $\pm 4\%$ -os intervallumba esnek. Érdekes, hogy a két „outlier” érték egyikét éppen egy NMI résztvevő mérte, a mért eredmény nagymértékű eltéréseinek okát a NIST az általuk alkalmazott ecetsavas feltárásban jelölte meg. Utólag ecetsav helyett 1M-os sósavval kivitelezve a savas feltárást, már a többséghez igen hasonló eredményhez jutottak. A másik „outlier” érték „birtokosa”, a JSI, utólag szintén korrigálta eredményeit, ők is savas feltárást, azt követően etilezést, majd GC-AFS mérést alkalmaztak. Lúgos feltárással dolgozott a résztvevő laborok többsége (BKÁE-ÉT, Frontier Geosciences Inc., IAEA, NMIJ, NRC, Trent Univ., Univ. Pau), ezen eredmények cáfolni látszanak azt a tényt, melyet a savas feltárás „hívei” vallanak, miszerint a lúgos-metanolos közeg transzmetilációs folyamatok indukciója révén a ténylegesnél nagyobb MeHg koncentrációt eredményezne. Különösen annak tükrében vállalom ezen kijelentésemet, hogy ugyanezen tesztmintát elemezte 235 labor (nemzeti

referencia laborok, élelmiszerellenőrző laborok) az IMEP-20 keretében, és ezen körelemzés a CCQM-P39-el szinte azonos eredménnyel zárult [Honlap 5].

Érdemes néhány szót ejteni a résztvevők által alkalmazott mérés technikáról is. A CCQM-P39. felmérés során egy kivétellel (aki LC-vel dolgozott) mindenki derivatizációs reakciót követően gázkromatográfiás elválasztást használt. 4 résztvevő AFS, 7 ICP-MS, 3 pedig EI-MS detektálást alkalmazott. Az eredmények analitikai módszer szerinti megoszlását mutatja a **16. ábra**.

16. ábra. A CCQM-P39 körelemzés MeHg eredményei az alkalmazott analitikai módszerek függvényében.

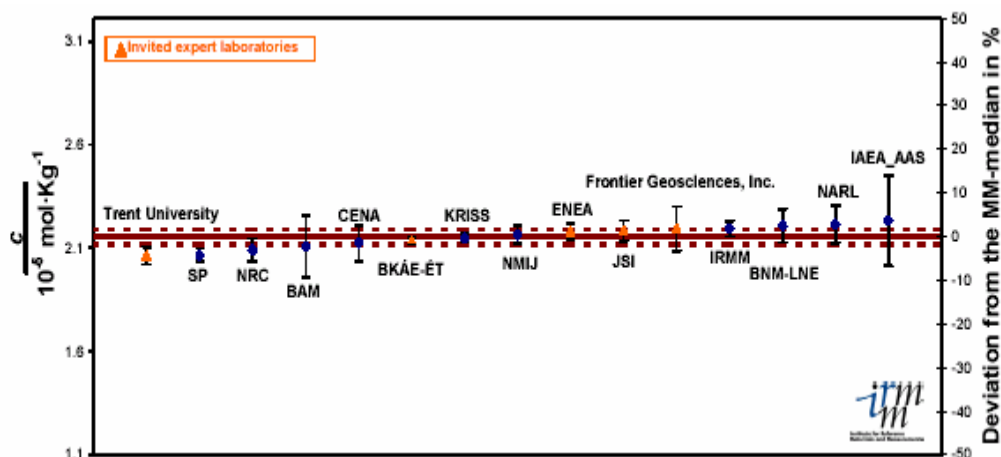


Ez alapján kijelenthető, hogy higany mérés esetén a korszerű és egyre inkább tért nyerő tömegspektrometriás mérésekkel érzékenység és szelektivitás tekintetében méltán felveszi a versenyt a manapság már sokszor elavultnak minősített egyelemes atomfluoreszcens technika, azzal a hátránnyal természetesen, hogy a kvantifikáláshoz izotóphígításos módszert alkalmazni nem lehet.

A **17. ábra** a CCQM-P39 körelemzés Hg eredményeit mutatja be. A mért értékek jóval kisebb szórást mutatnak a metil-higany koncentrációkhoz képest. Ennek oka talán a mérési procedúra egyszerűségében keresendő a jóval bonyolultabb speciációs eljárásokhoz képest.

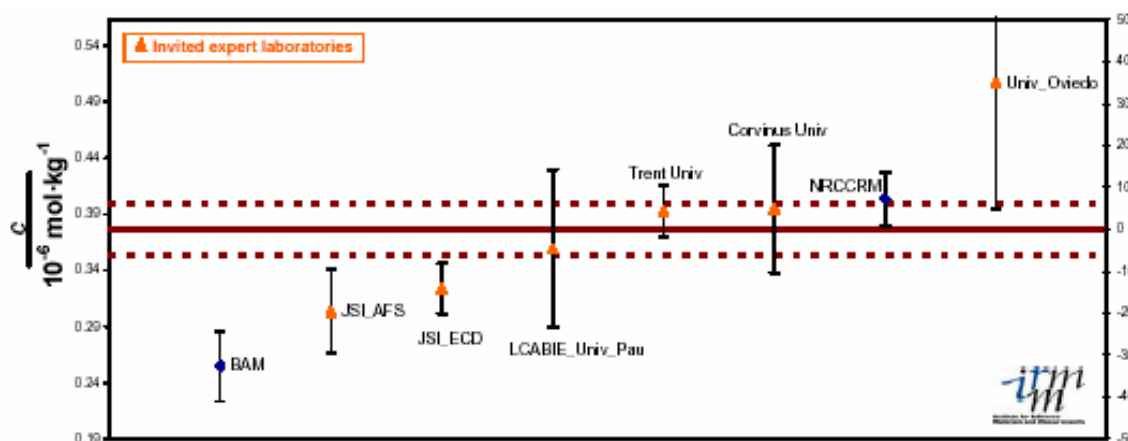
17. ábra A CCQM-P39 körelemzés résztvevőinek Hg eredményei

MM-median : $2,112 \pm 0,036 \cdot 10^{-5}$ mol (Hg)·kg⁻¹, [$\mu \pm \sigma^* t_{\alpha}/\sqrt{n}$]



18. ábra A CCQM-P39.1 körelemzés résztvevőinek MeHg eredményei

MM-median : $0,373 \pm 0,023 \cdot 10^{-6}$ mol (MeHg)·kg⁻¹, [$\mu \pm \sigma^* t_{\alpha}/\sqrt{n}$]



A 18. ábra a CCQM-P39.1 keretében analizált lazac minta elemzésének eredményeit mutatja. A kihívást ebben az esetben a minta igen kis (a tonhálnál kb. 2 nagyságrenddel alacsonyabb) metil-higany koncentrációja, illetve a tonhal mintánál jóval komplexebb, zsírosabb mátrixa jelentette. Összehasonlítva a CCQM-P39 eredményekkel (15. ábra), a mért értékek ennek megfelelően jóval nagyobb szórást mutatnak, a résztvevő laborok eredményei a megállapított MM-median érték $\pm 30\%$ -os intervallumba esnek. Az általunk mért érték (Corvinus Univ.) ezen belül 14%-os relatív szórással ugyan, de igen jól megközelítette a kalkulált MM-median értéket. Az eredmények pontossága és precizitása ebben az esetben is független volt az alkalmazott analitikai módszertől.

A résztvevők számára a legnagyobb problémát a mátrix nagy zsírtartalma jelentette, különösen a savas hidrolízises mintaelőkészítést alkalmazó laborok esetében (pl. University of Oviedo). Ebből adódóan utólag a savas feltárás helyett TMAH-s hidrolízist alkalmazva az Univ. Oviedo korrigálni volt kénytelen eredményeit.

A fent leírtak is bizonyítják, hogy a körelemzésekben való részvétel milyen fontos és hasznos módja lehet a minőségbiztosításnak. Amellett, hogy a résztvevő laborok nemzetközi szinten is megmérettetik módszereiket, az egyes eljárásokhoz köthető problémák is felszínre kerülnek, ösztönözve az analitikusokat további vizsgálatok, optimalizációs folyamatok elvégzésére, korábbi eredményeik felülbírálására, hibakutatásra.

Végezetül, a fentiek alapján úgy ítélem meg, hogy az általam kidolgozott módszer nemzetközi szinten is megállta helyét, mind a ppm-es nagyságrendbe eső metil-higany koncentrációjú tonhal minta, mind a néhány tíz ppb metil-higany tartalmú lazacminta mérése során kapott eredményeim összhangban voltak a nemzetközi szakemberek által mért értékekkel. Az általam kidolgozott, manapság a „tömegspektrometria korában” speciációs célokra már egyre kevésbé alkalmazott atomfluoreszcens eljárás jó alternatívája lehet tehát a jóval költségesebb tömegspektrometriás eljárásoknak. A mintaelőkészítés részeként megvalósított lúgos-metanolos hidrolízis pedig, különösen zsíros, összetettebb mátrixú minták elemzése során egyszerűbb kivitelezést jelent és megbízhatóbb eredményeket szolgáltat a savas feltárásnál.

5.4 Élelmiszerminták metil-higany tartalmának meghatározása

Doktori munkám során az előzőekben ismertetett módszer segítségével a 4.3. *Minták* fejezetben már ismertetett három mintacsoport élelmiszermintáit analizáltam. Az OT-SAFE projekt keretében gyűjtött mintákat liofilezve és homogenizálva kaptam, a szupermarketben vásárolt tengeri hal termékek, illetve a hazai tenyésztésű édesvízi halak tisztítása, liofilezése és homogenizálása a saját laboratóriumunkban történt. A minták összes higany koncentrációjára vonatkozó mérések az ENEA-ban, illetve a Magyar Állami Földtani Intézetben zajlottak, kifűtéses atomabszorpciós technikával. Ezen mérések eredményei alapján egyértelmű volt, hogy a speciációs mintaelőkészítés során a „kis higanytartalmú” mintákra (TORT-2, T34) kidolgozott eljárás szerint kell eljárnom. Meg kell azonban jegyezni, hogy az élelmiszerminták mérése során egy-két esetben (pl.19, 26. minta) olyan alacsony volt a mérendő koncentráció, hogy a már ismertetett kis higany tartalmú mintákra vonatkozó eljárásan módosítani kellett, kisebb hígítási faktort kellett alkalmazni (5 ml centrifugált roncsolmányból 1 ml helyett 2 ml-nyi mennyiséget használtam fel). Ezzel ugyan a végső oldat metanol tartalma az irodalom szerint javasolt max.1% helyett 1-2% közé esett, ezzel

kapcsolatos vizsgálataim alapján (11. ábra) azonban elfogadhatónak tartottam az alkalmazott körülményeket.

Az élelmiszerminták elemzése során kapott eredményeket a **17. táblázat** tartalmazza. A táblázatban szereplő szárazanyagra vonatkozó koncentrációadatoknál — a szárazanyagtartalomban való esetenként akár 50%-os eltérések (pl. az 1. és 2. minták) miatt — informatívabbak a nedves tömegre számolt értékek, hiszen a kísérlet célja az átlagos magyar fogyasztó halfogyasztással kapcsolatos higanyterhelésének felmérése volt.

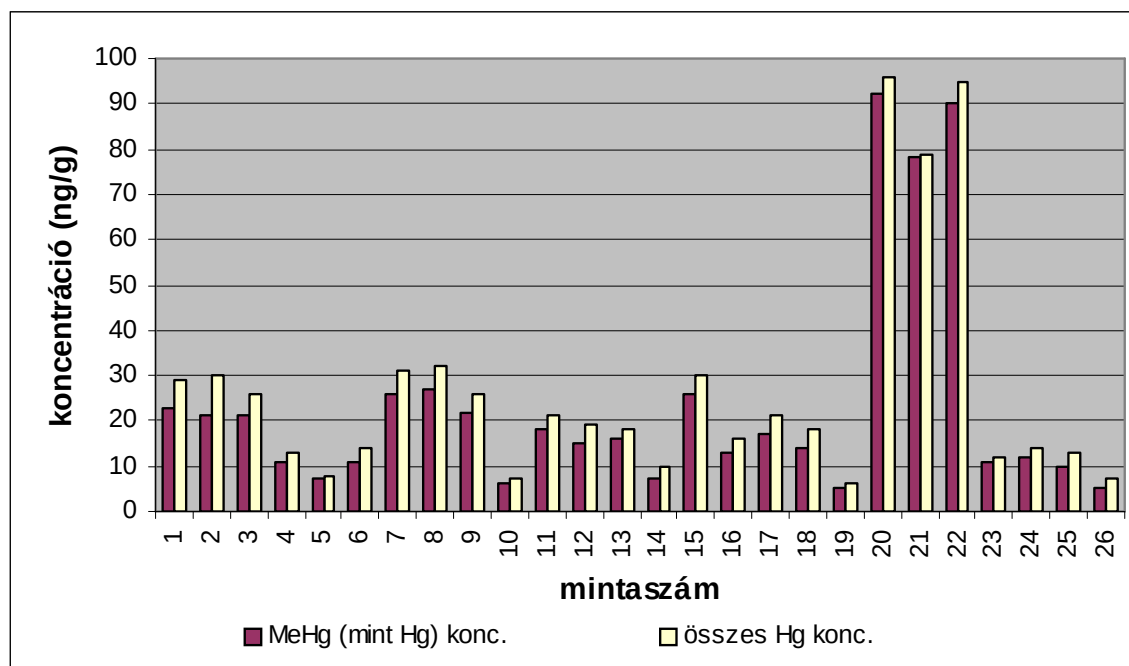
A táblázat tengeri halak (1-19. minta) nedves tömegeire vonatkozó adatai szerint, az OT-SAFE-mintákban mért koncentrációk kissé magasabbak az egy áruházláncban egyidőben kapható termékek átlagos ($0.015 \mu\text{g g}^{-1} \text{ MeHg(mintHg)}$) értékétől. A különbség oka az OT-SAFE minták átlagosan kissé magasabb szárazanyagtartalma. Ez abból adódik, hogy mind a három minta a mintavétel során begyűjtött többféle (különböző cégek által forgalmazott különböző formában (szószok, ecetes pác...stb.) kínált) termék „homogenizált elegye”, (hiszen mind az eredeti szerves ón vizsgálat, mind a metil-higany meghatározás szempontjából a halfaj (szardínia, hekk, vagy hering) adott specieszének meghatározása) volt az érdekes). Ily módon a liofilezést megelőzően a homogenizálás során alkalmazott szükségesnek vélt eljárások (pl. bepárlás) magyarázhatják a kapott szárazanyagtartalmi értékeket. Éppen az OT-SAFE minták fent ismertetett jellegéből adódóan az analízis eredménye nagy általánosságban tükrözi a Magyarországon kapható tengeri hal termékek szennyezettségét, az egyes egyedi árúkra lebontott adatokat a 2. mintacsoport mintáinak elemzése szolgáltatja. A kétféle mintacsoportra kapott eredmények összehasonlítása alapján bizonyosságot nyert, hogy az OT-SAFE mintákra kapott adatok reprezentatívan tükrözik a Magyarországon forgalomban lévő tengeri halak higany szennyezettségét.

Megállapítható továbbá, hogy mindkét mintacsoport mintáiban jóval alacsonyabb metil-higany koncentrációt mértem, mint ami az irodalomban [Storelli 2005, USEPA 2001] található tengeri halakra vonatkozóan. Az okokat nem vizsgáltam, de pl. a halak életkora, mérete egy lehetséges magyarázata lehet ennek a különbségnek.

Ami az édesvízi halakat illeti, jelentős különbség tapasztalható a pontyok és a harcsák higany tartalma között. Az utóbbiak metil-higany koncentrációja mintegy 6-szorosa a pontyokénak és 3-4-szerese a tengeri halakénak. (**19. ábra**) A pontyok és a harcsák elemzése során tapasztalt eltérő értékek valószínűsíthetően a két halfaj eltérő táplálkozási szokásaiból adódik. Míg a pontyok a halastóban kialakult természetes biológiai rendszerben élnek, haltápot nem kapnak, növényekkel, rovarokkal táplálkoznak, addig a termálvizes tankokban, mesterséges körülmények között nevelt afrikai harcsákat hetente 3 alkalommal automata etetőberendezés segítségével haltáppal etetik. A haltáp összetételéről a halgazdaságoktól nem

kaptam információt, ám sejthető volt hogy e tengeri eredetű táplálék tehető felelőssé a harcsákban mért emelkedett metil-higany koncentráció értékekért.

19.ábra. Magyarországon kereskedelmi forgalomban lévő tengeri halak, és hazai tenyésztésű édesvízi halak metil-higany és összes higany koncentrációja. A minták számokkal való megjelenítése a 10. táblázat alapján történt, miszerint 1-3 : OT-SAFE minták, 4-19 : kereskedelmi forgalomban lévő fagyasztott tengeri halak, 20-22 : afrikai harcsa minták, 23-26 : ponty minták.



Ennek megfelelően elvégeztem a liofilizált haltáp higany módosulatanalitikai elemzését is. A minta MeHg (mint Hg) koncentrációja $0.057 \pm 0.005 \mu\text{g g}^{-1}$ -nak, összes Hg koncentrációja $0.060 \pm 0.003 \mu\text{g g}^{-1}$ -nak adódott, ami igazolni látszik elképzelésemet. A harcsák és a vizsgált tengeri halak átlagos higany tartalmának viszonylag nagy mértékű különbözőségére egy lehetséges magyarázat az lehet, hogy míg a vizsgálatba bevont afrikai harcsák kifejezett példányok voltak, addig a hazai kereskedelemi forgalomban lévő tengeri halak méretéről, életkoráról nincsenek adataim, de elképzelhetőnek tartom ebben keresni az irodalmi adatokhoz képest jóval alacsonyabb metil-higany tartalom okait.

Ami az analizált halak MeHg / összes Hg koncentrációarányait illeti, nincs jelentős különbség a tengeri és az édesvízi halak között (**19. ábra**), mindkét esetben az összes higany tartalom átlagosan 80-95%-a metil-higany.

Összefoglalásképp megállapítható, hogy a Magyarországon kapható tengeri halak és az általam vizsgált hazai tenyésztett édesvízi halak metil-higany koncentrációja jóval az Európai Bizottság törvényileg [EC 221/2002] szabályozott határértékei alatt vannak.

Amennyiben a JECFA által MeHg-ra megállapított $1.6 \mu\text{g} / \text{testsúlykg}$ PTWI értéket vesszük alapul, kiszámítható, hogy egy 70 kg-os felnőtt ember $112 \mu\text{g}$, egy 14.5 kg-os gyerek pedig $23.2 \mu\text{g}$ metil-higanyt „fogyaszthat” hetente, ha az EPA $0.1 \mu\text{g kg}^{-1} / \text{testsúlykg} / \text{nap}$ RfD értékével számolunk $49 \mu\text{g}$, illetve gyerek esetében $10.15 \mu\text{g}$ a heti felvehető mennyiség. A mért koncentráció adatokat figyelembe véve, így a kockázatmentesen fogyasztható tengeri halmennyiség hetente egy gyerek számára 1-1,5 kg a JECFA, és 0.4-0.7 kg az EPA határértékkel számolva, felnőttek esetében ezen értékek akár 4.5-szöröse is lehet. A kissé szennyezettebb afrikai harcsából a JECFA PTWI értékével kalkulálva egy gyerek hetente 350-400 g-ot, egy felnőtt pedig kb. 2 kg-ot ehet. Mivel azonban a magyar lakosság évi átlagos halfogyasztása nem igen haladja meg a 3 kg-ot — 3.1 kg/fő (2002-es adat) —, a hazai forgalomban lévő tengeri halak és haltartalmú élelmiszerek fogyasztásából eredő kockázat elhanyagolható.

17. táblázat. Magyarországon kereskedelmi forgalomban lévő tengeri halak, és hazai tenyésztésű édesvízi halak metil-higany és összes higany koncentrációja.

Jelölések : „a” a származási hely ismeretlen, „b” fagyasztott termékek, „c” élő hal, (zárójelben átl.testhossz, RSD%). Forgalmazók : „1” Tesco Globál Áruház, „2” Findus Hungária Kft., „3” Herba Hungary Rt., „4” Nowaco Hungary Kft., „5” Delforg Kft., „6” Season Élelmiszer Kereskedelmi Kft., „7” Jégtrade Kft. , „8” Royal Greenland

Minta	MeHg (mint Hg) konc. (mg kg ⁻¹ sz.a.) (n=3)	összesHg konc (mg kg ⁻¹ sz.a.) (n=3)	átl. szárazanyagtart (m/m%)	átl. MeHg (mint Hg) konc. (µg g ⁻¹ nedves tömeg)
OT-SAFE				
1. Szürke tőkehal (Argentina)	0.122 ± 0.006	0.153 ± 0.002	19.1	0.023
2. Hering (Lengyelország)	0.070 ± 0.001	0.101 ± 0.002	30.0	0.021
3. Szardínia (Thaiföld)	0.073 ± 0.005	0.090 ± 0.001	28.5	0.021
16 önkényesen kiválasztott termék^b				
4. panírozott tőkehal (Alaska) ¹	0.066 ± 0.007	0.081 ± 0.002	16.3	0.011
5. panírozott halrudacska (Franciaország) ²	0.036 ± 0.004	0.045 ± 0.001	17.9	0.007
6. panírozott halrudacska (Észtország) ³	0.060 ± 0.006	0.078 ± 0.002	17.6	0.011
7. panírozott hal ^{a 4}	0.137 ± 0.008	0.159 ± 0.001	18.2	0.026
8. panírozott hal (Németország) ¹	0.119 ± 0.008	0.138 ± 0.002	16.3	0.020
9. hal filé (Argentina) ⁵	0.118 ± 0.007	0.145 ± 0.001	23	0.027
10. hal filé (Argentina) ¹	0.035 ± 0.004	0.043 ± 0.001	16.1	0.006
11. hal filé (Alaszka) ¹	0.107 ± 0.009	0.125 ± 0.003	16.5	0.018
12. hal filé ^{a 4}	0.089 ± 0.008	0.110 ± 0.001	17.0	0.015
13. panírozott hal filé ^{a 5}	0.061 ± 0.002	0.070 ± 0.001	26.0	0.016
14. hal filé ^{a 6.}	0.047 ± 0.005	0.060 ± 0.001	16.0	0.007
15. hal filé ^{a 6.}	0.124 ± 0.010	0.140 ± 0.002	21.1	0.026
16. hekk törzs ^{a 4.}	0.063 ± 0.006	0.080 ± 0.001	20.1	0.013
17. hekk törzs (Argentína) ^{5.}	0.108 ± 0.010	0.130 ± 0.002	16.1	0.017
18. hekk törzs (Dél-Amerika) ^{4.}	0.068 ± 0.007	0.085 ± 0.002	20.6	0.014
19. lazac filé (Argentína) ^{8.}	0.029 ± 0.003	0.037 ± 0.001	15.6	0.005
Afrikai harcsa (Clarias gariepinus)^c				
20. Szarvas (49 cm, 8%)	0.287 ± 0.018	0.305 ± 0.007	20.1	0.058
21. Tuka (46 cm, 4%)	0.279 ± 0.010	0.300 ± 0.003	17.2	0.048
22. Füzesgyarmat (51 cm, 6%)	0.319 ± 0.020	0.341 ± 0.003	19.6	0.062
Ponty (Cyprinus carpio)^c				
23. Szajol (40 cm, 5%)	0.061 ± 0.005	0.074 ± 0.001	17.9	0.011
24. Biharugra (44 cm, 5%)	0.072 ± 0.004	0.084 ± 0.002	16.8	0.012
25. Szarvasi halastó (36 cm, 7%)	0.052 ± 0.007	0.068 ± 0.001	19.1	0.010
26. Látvány (39 cm, 3%)	0.028 ± 0.003	0.032 ± 0.001	17.9	0.005

5.5 Sósavas feltárás-oldószeres extrakció-GC-EI-MS módszer

5.5.1 Előzmények

Doktoranduszi munkám során 1 hónapot töltöttem az Olasz-Magyar Kétoldalú Tét Együtműködés keretében Rómában az ENEA Környezetanalitikai Osztályán, ahol bekapcsolódtam az ott folyó metil-higannyal kapcsolatos mérésekbe. Az ő módszerük az általam kidolgozott, előzőekben ismertetett eljárástól több szempontból is különbözik. Egyrészt jóval bonyolultabb, több lépésből álló mintaelőkészítéssel dolgoznak, melyek a következők voltak : zsírtalanítás két lépésben, ultrahangos fürdőben végzett sósavas feltárás, két lépésben végrehajtott toluolos extrakció, a komponensek vizes ciszteines oldatba történő visszaextrakciója, vizes közegű fenilezés, végül a fenilezett származékok hexánba koncentrációja, melyet gázkromatográfiás elválasztás követ. Detektorként EI-MS-t használnak. A mintaelőkészítésről bővebben a 4.1.2. fejezetben, a mérőrendszer működési paramétereiről pedig a 4.4.2. fejezetben már beszámoltam. További sajátossága ennek az ún. „ENEA-s módszernek”, hogy a mérésekhez etil-higany belső standardot használnak, melyet a zsírtalanítás után, a sósavas feltárást megelőzően adnak a mintákhoz. Az így kidolgozott és optimált módszernek CRM mintákkal történő validálása jó eredménnyel zárult.

Az eljárást elsajátítandó, kintlétem első napjaiban többször készítettem elő és mértem különböző CRM mintákat a már „bejártatott” módszerrel belső standard alkalmazásával és anélkül is. Nem kis meglepetésre azonban, belső standard nélkül többször is elvégezve a vizsgálatokat, kb. 50%-ban sikerült csak visszamérni a hitelesített értékeket. Ezek alapján a továbbiakban két kérdésre kerestem a választ : (1.) *ezen igen bonyolult és sok lépésből álló eljárás mely lépései során keletkezik veszteség?*, illetve (2) *miből adódik a belső standarddal és anélkül kivitelezett mérések eredménye közti különbség?*

5.5.2 A teljes anyagmérleg meghatározása

A témával kapcsolatos első kísérletsorozat célja, a metil-higany mérés teljes folyamatára kiterjedő anyagmérleg felállítása volt. Meg akartam ugyanis vizsgálni, hogy melyik lépésben veszik el a mért komponens csaknem 50 %-a. Ezen vizsgálatok során belső standardot nem alkalmaztam. A teljes anyagmérleg a minta többszöri, különböző módszerekkel történő méréséből tevődött össze. Kiindulásként meghatároztam a minták összes higanytartalmát AMA 254 közvetlen higanyanalizátor segítségével, a későbbiekben ez az érték szolgált viszonyítási alapként. A továbbiakban a mintát a 4.1.2. fejezetben leírtak

szerint speciációs mintaelőkészítési eljárásnak vetettem alá. Azontúl, hogy elvégeztem a módosulatanalitikai mérést is, a mintaelőkészítés minden lépésben meghatároztam a visszamaradó fázis összes higany koncentrációját, illetve annak a fázisnak a higany tartalmát is (egy kis részletet különítve a fázisból), ami a kinyert módosulatokat tartalmazta. Ezeket a méréseket közvetlenül az adott fázisból atomabszorpciós eljárást alkalmazva (AMA 254) hajtottam végre, szilárd mintából 20-50 mg-ot mértem be, oldat koncentrációjának meghatározásához 200-500 µl térfogatokat használtam fel.

Az eredmények információval szolgáltak arra nézve, hogy az egyes lépések milyen mértékű veszteségekért felelősek, illetve mekkora higany „átvitel” valósul meg e bonyolult és sok folyamatból álló eljárás egyes lépései között. Az imént vázolt kísérletsor a minták higanyspeciációs elemzésével zárult. Az adatok kiértékelésénél természetesen figyelembe kellett venni, és az adatokat korrigálni kellett azzal az elveszett „információtartalommal”, mely a továbbvitt fázisból tűnik el az anyagmérleg felvétele során.

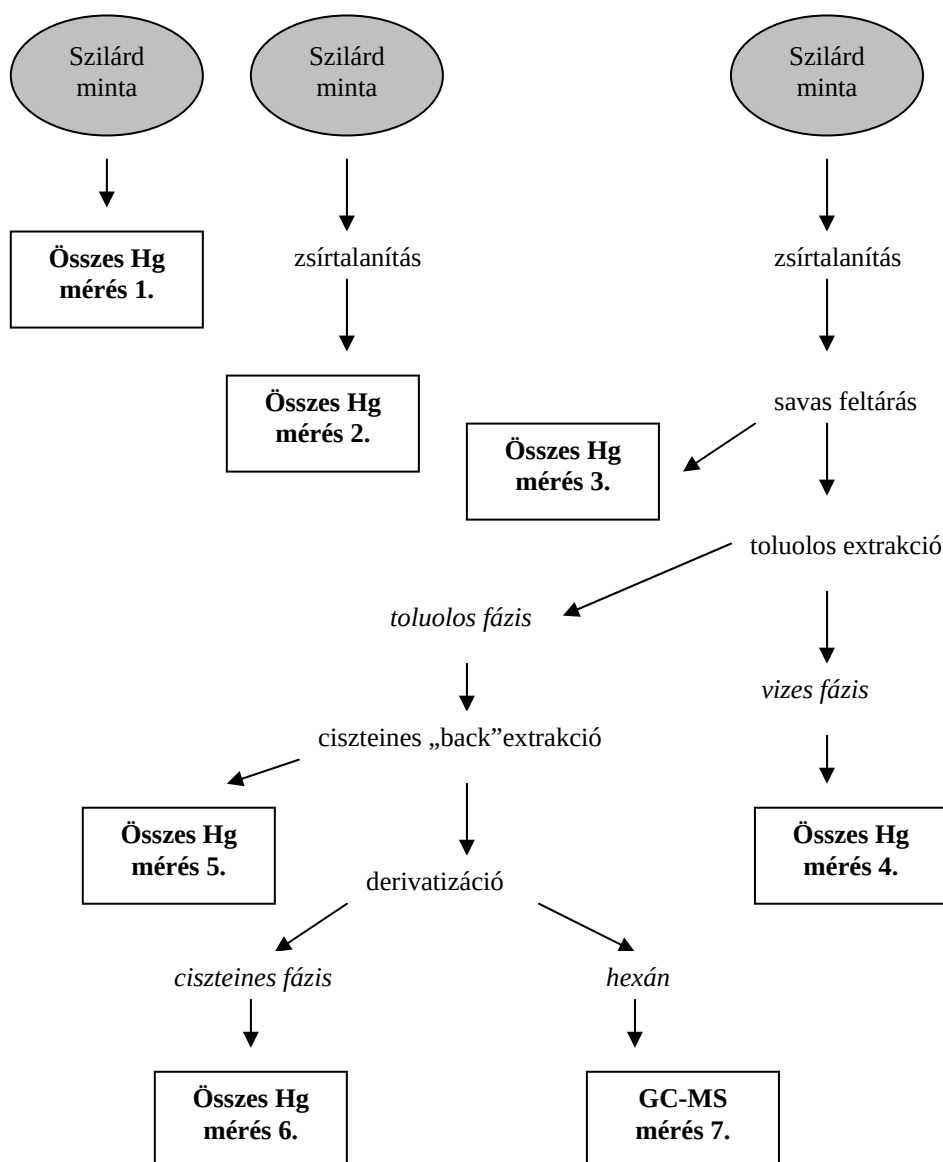
Vizsgálataimhoz két „nagy” higany tartalmú mintát választottam. BCR 464 és DORM-2 CRM mintákkal végeztem kísérleteimet. E két CRM minta higanyra és metil-higanyra hitelesített koncentrációja az 5. táblázat adatai között szerepel, valamint az is látható, hogy ezekben a mintákban a higany szinte teljesen metil-higanyként van jelen.

A kísérletek pontos kivitelezése az alábbiak szerint történt. **(20. ábra)**

1. Meghatároztam a szilárd minták összes higany koncentrációját. Ezt az értéket tekintettem a továbbiakban viszonyítási alapként.
2. Egy újabb mintarészletet felhasználva, az acetonos és toluolos zsírtalanítást követően mértem a szilárd maradékban lévő higany koncentrációt. Ezen mérés alapján arra a kérdésre akartam választ kapni, hogy *keletkezik-e veszteség a zsírtalanítás során?*
3. Egy következő 0.25 g bemért mintát zsírtalanítottam, majd feltártam 5 ml 6 M-os sósavoldattal. 10 ml NaCl oldat hozzáadása, illetve centrifugálás után így 15 ml savas extraktum keletkezett. 1 ml-t ebből elkülönítettem, hozzáadtam 200 µl 10 M-os NaOH oldatot (semlegesítés végett, hiszen az AMA 254-es méréseket ennyire savas mintával nem lehet végrehajtani), és az így kapott 1.2 ml oldatnak mértem meg a koncentrációját. A felmerülő kérdés a következő volt : *milyen „feltérési hatásfokkal” dolgozunk?*
4. Az 1 ml elkülönítése után megmaradó 14 ml feltárt oldatot 2x4 ml toluollal extraháltam, majd a szerves fázis elválasztása után a savas maradékból 1 ml-t, 200 µl 10 M-os NaOH oldat hozzáadása után analizáltam. Az eredmények ismeretében az alábbi kérdést kívántam megválaszolni : *milyen a toluolos extrakció hatásfoka?*

5. Az összegyűjtött összesen 8 ml toluolos fázist 2x2 ml ciszteines oldatba visszaextraháltam. Az így kapott 4 ml ciszteines oldatból 1 ml-t elkülönítettem, és mértem annak higany koncentrációját. A felmerülő kérdés a következő volt : *mennyi higany extrahálódik vissza a vizes-ciszteines fázisba?*
6. A maradék 3 ml ciszteines fázishoz hozzámértem a kénsav oldatot, CuSO_4 oldatot, az 1 ml hexánt, illetve a NaBPh_4 reagens oldatot. A derivatizációt követően a fenilezett származékokat tartalmazó hexános fázist elválasztottam, a vizes-ciszteines fázisból pedig semlegesítés után higany koncentrációt határoztam meg. A mérések alapján a „Mekkora a derivatizációs reakció hatásfoka?” kérdésre kerestem a választ.
7. Végül elvégeztem a hexános fázis módosulatanalitikai meghatározását GC-EI-MS technikát alkalmazva.

20. ábra. A teljes anyagmérleg készítése céljából végzett kísérlet menete. Az ábrán található, mérésekre utaló számok azonosíthatók a szövegben pontokba szedett lépések sorszámaival.

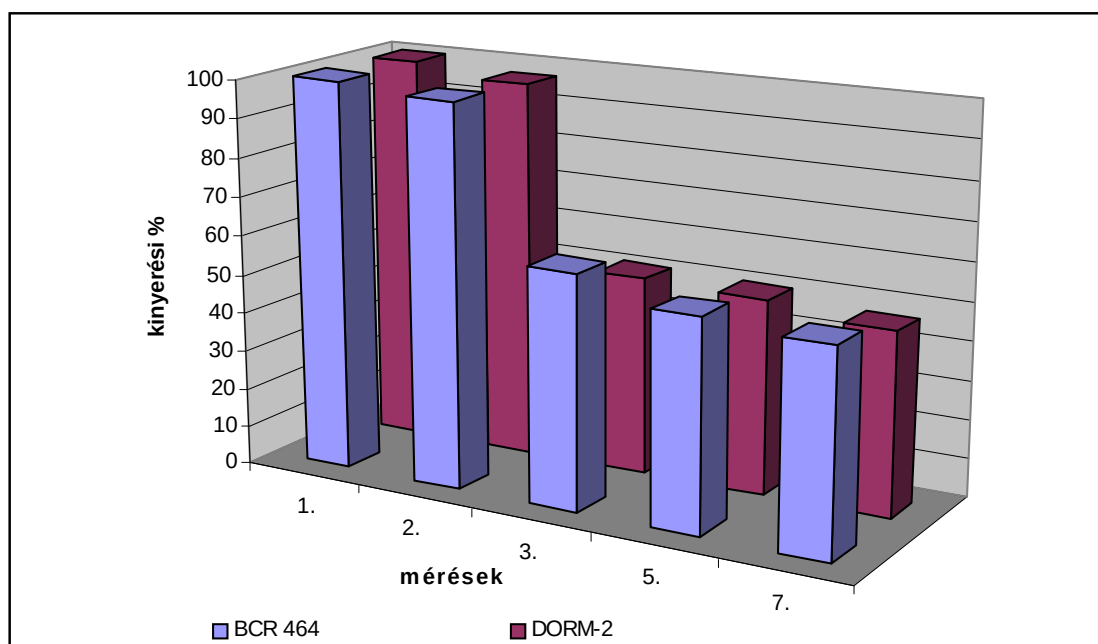


A kísérletek eredményeit a **18. táblázat** és a **21. ábra** szemlélteti. A táblázatban szereplő minden egyes koncentráció érték az eredeti szilárd mintára vonatkozik.

18. táblázat. Az anyagmérleg felvétele során kapott átlagos koncentrációértékek. Az egyes mérések számokkal való azonosítása a 18. ábra alapján történt, vagyis (1) eredeti szilárd mintából, (2) zsírtalanított szilárd mintából, (3) savas extraktumból, (4) toluolos extrakció után a vizes fázisból, (5) ciszteines extraktumból, (6) derivatizációt követően, a hexános fázis elválasztása után a ciszteines maradékból történő összes Hg meghatározásra utal, a (7) a hexános fázis módosulatanalitikai mérését jelenti. Jelölések : „a” a 7. méréshez tartozó értékek az előbbieket alapján átlagos MeHg tartalmat jelentenek, mg kg⁻¹ egységben. „b” kifejezi, hogy az adott mérés során kapott koncentráció az etalonnak tekintett 1. mérés eredményének hány százaléka. Mindkét mintára kapott adatok három párhuzamos mérés eredményeiből származnak.

	BCR 464		DORM-2	
	átlagos Hg	„kinyerési %” ^b	átlagos Hg	„kinyerési %” ^b
	tartalom [mg kg ⁻¹ , sz.a.]	[% ± RSD]	tartalom [mg kg ⁻¹ , sz.a.]	[% ± RSD]
1.mérés	5,24	100	4,50	100
2. mérés	5,15	98 ± 0,9	4,35	97 ± 1
3. mérés	3,14	60 ± 2	2,30	51 ± 3
4.mérés	0,30	5 ± 2	0,11	2 ± 0,6
5. mérés	2,83	54 ± 4	2,27	50 ± 5
6. mérés	< k.h.		< k.h.	
7. mérés ^a	2,72	52 ± 4	2,15	47 ± 5

21. ábra. Az anyagmérleg felvétele során meghatározott, egyes lépésekhez rendelhető kinyerési % értékek BCR 464 és DORM-2 CRM minta esetében. A mérések sorszáma ebben az esetben is a szövegben pontokba szedett lépések sorszámaival azonosítható.



A táblázat és az ábra adatai alapján kijelenthető, hogy az eljárás legkritikusabb lépése a savas feltárás, hiszen a feltárt oldatban mért koncentrációérték (3. mérés) 50-60%-a csupán a minta eredeti higany tartalmának. Ehhez képest elhanyagolható veszteség köthető a toluolos extrakcióhoz (4. mérés, a visszamaradó vizes fázisban kb. 2-5%-nyi komponens marad csupán) és a ciszteines „back extrakciós lépéshez (5. mérés). A derivatizáció hatásfoka gyakorlatilag 100%-nak vehető mindkét minta esetében, hiszen a fenilezett származékokat koncentráló hexános fázis elválasztása után visszamaradó ciszteinben nem volt mérhető higany mennyiség (6. mérés). A zsírtalanítás céljából végzett acetonos és toluolos mosás szintén nem okoz jelentős változást a higany tartalomban (2.mérés).

Az eredmények tükrében jogosan merül fel a kérdés, hogy hova tűnik el a minták higany tartalmának 40-50%-a a savas feltárás során. Egyszerűen nem „jön ki” a mátrixból, vagy elbomlik a feltárás során, netán párolgási veszteséggel állunk szemben? A kérdés megválaszolásához jó lett volna megmérni a feltárás, illetve az azt követő centrifugálás után megmaradt szilárd maradék higany koncentrációját. Amennyiben ugyanis nem elég hatékony a feltárás folyamata, a hiányzó hányadnak ebben a maradékban kell lennie. A kísérletek során alkalmazott, közvetlenül a szilárd mintából történő kifűtéses atomabszorpciós módszer azonban ezen maradék erősen savas jellege miatt nem volt kivitelezhető. Megoldásként, — mivel vak mintamátrix nem állt rendelkezésemre — minta helyett ismert koncentrációjú ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) MeHgCl standard oldattal végeztem el az egész eljárást (5 ml 6 M-os sósav oldathoz $100 \mu\text{l}$ 10 ppm-es MeHgCl standard oldatot adtam), a feltárástól kezdve, az oldószeres extrakción, derivatizáción át egészen a konkrét mérésig. Ebben az esetben veszteséget szinte nem tapasztaltam, átlagosan 94%-ban visszamértem az alkalmazott standard oldat koncentrációját. Hasonló eredményekhez jutottam, amikor ismert mennyiségű MeHgCl-dal „spikolt” mintával végeztem kísérleteimet. Ezen kísérlet során 200 mg már zsírtalanított mintához adalékoltam $100 \mu\text{l}$ 10 ppm-es MeHgCl standard oldatot, egy éjszakán át vízfürdön rázatva bepároltam és amennyire lehetett homogenizáltam, majd másnap előkészítettem és mértem a mintákat. Külső kalibrációt alkalmazva, a három párhuzamos mérés eredménye $1,44 \pm 0,08$ ppm-nek adódott, vagyis gyakorlatilag az adalékolt teljes mennyiség + minta metil-higany tartalmának kb. 50%-nak megfelelő koncentrációértéket kaptam eredményül. Ez utóbbi két kísérlet alapján meggyőződtem arról, hogy minták mérésekor, a savas hidrolízis során keletkező 40-50%-nyi veszteség a nem elég hatékony feltárásból adódik. Bomlási és párolgási veszteséggel nem igen kell számolni, hiszen ezen folyamatok a standardokkal végzett kísérletek eredményeiben is megmutatkoztak volna.

5.5.3 Etil-higany belső standarddal végzett vizsgálatok

A belső standardok alkalmazásának két legfontosabb feltétele, hogy ne legyen jelen a mérni kívánt mintában, karakterében, viselkedésében, stabilitásában viszont minél jobban hasonlítson a mérendő komponensre. Az etil-higany esetében az első feltétel maradéktalanul teljesül, hiszen számos publikáció támasztja alá, hogy biológiai mintákban az egyedüli szerves higany módosulat a metil-higany. A két szerves módosulat karakterének hasonlóságában sincs okunk kételkedni, hiszen szerkezetük mindössze egy $-\text{CH}_2-$ csoportban különbözik, mindkettő igen toxikus módosulat, azonos élettani hatással és valószínűsíthetően hasonló metabolizmussal rendelkeznek, klorid formájuk igen illékony, hasonlóképpen nagy hatásfokkal derivatizálhatók, a fenilezett és alkilezett származékaik közel azonos mértékben illékonyak és apolárisak...stb. Ezen tények ismeretében alkalmazza több szakember is az etil-higanyt metil-higany mérések belső standardjaként.

Mivel a belső standardot mind a mintához, mind a kalibráló standard oldatokhoz hozzáadjuk, a kalibrációs görbét a mérendő komponensre és a belső standardra kapott jelek hányadosaiból számoljuk, illetve a minta koncentrációjának meghatározáshoz is a mérendő és a belső standard intenzitásának hányadosát használjuk. A módszer használatának előnye, amennyiben jól választottuk meg a belső standardot, hogy a teljes analitikai folyamat veszteségeivel számol a mintaelőkészítéstől a detektálásig.

Az ebben a fejezetben tárgyalt kísérletek arra irányultak, hogy magyarázatot találjak az 5.5.1. fejezet végén feltett kérdésre, nevezetesen : miből adódik a belső standarddal és anélkül végzett mérések eredménye közti különbség. Azt, hogy a metil-higannyal mi történik az eljárás során, már tudjuk, hiszen az előző fejezet ennek kiderítésével foglalkozott. Mi a helyzet vajon az etil-higannyal? A választ a következő kísérletsorozatok eredményeitől reméltem.

A vizsgálatok első részében 1 ppm MeHgCl standard oldattal végeztem el a teljes mintaelőkészítési procedúrát (5 ml 6 M-os sósav oldathoz adtam 100 μl 10 ppm-es MeHgCl standard oldatot, majd feltártam, extraháltam...stb) miközben különböző pontokon adagoltam 100 μl 10 ppm-es EtHgCl standard oldatot. Az adatok értékelése során a MeHgPh/EtHgPh jelhányadost kísértem figyelemmel, hiszen bármelyik komponenssel bármi történik az eljárás során, a hányados értéke azt indikátorként jelzi. Mivel azonban a standard oldattal végzett kísérlet során a MeHg tartalom állandónak tekinthető (lásd előző fejezet), a hányados értékének változása valószínűsíthetően a belső standard koncentrációjának, illetve jelének változása miatt következik be. Előzetes vizsgálataim alapján a derivatizációs határfok mindkét komponensre nézve gyakorlatilag 100%-nak bizonyult (a derivatizációt követően és a hexános fázis elválasztása után a ciszteines maradékban nem volt mérhető koncentrációban

higany sem MeHg sem EtHg standard oldat esetében), így viszonyítási alapnak a 4 ml ciszteinszintbe adagolt 100 µl 10 ppm MeHgCl és EtHgCl standard oldattal végzett (a hexánban mindkettő 1 ppm koncentrációban van jelen), derivatizációt követő méréseim során kapott hányadost tekintettem. Ezt a hányadost 1-nek vettem. Ezek után a MeHgCl standarddal kivitelezve a teljes mintaelőkészítési folyamatot (100 µl 10 ppm MeHgCl standard oldatot az 5 ml 6 M-os sósavoldathoz adtam), először a ciszteines extraktumba adagoltam 100 µl 10 ppm EtHgCl standard oldatot. A következő mintaelőkészítési folyamat során a toluolos extraktumba, a harmadik kísérletben a feltárt savas oldatba, végül a feltárást megelőzően adagoltam a belső standardot. A négy kísérlet során kapott, a fent kijelölt viszonyítási alap 1-értékéhez viszonyított hányados értékeket a **19. táblázat** felső sora mutatja.

19. táblázat. MeHgCl standard oldattal és a BCR 464 mintával végzett mérések. A kísérletek során az EtHgCl belső standardot a mintaelőkészítés különböző fázisaiban adagoltam. A táblázat adatai a szövegben kijelölt viszonyítási alap 1-értékéhez viszonyított átlagos MeHgPh/EtHgPh jelhányados értékeket mutatja.

A belső standard adagolási pontjai			
Ciszteines extraktum	Toluolos extraktum	a feltárt oldat	feltárás előtt, sósav
<i>MeHgCl standarddal végzett kísérlet</i>			
0,98	0,99	1,07	2,08
<i>BCR 464 mintával végzett kísérlet</i>			
0,55	0,59	0,61	0,94

Jól látható, hogy a MeHgPh/EtHgPh hányados értékében jelentős változás akkor következett be, mikor a belső standardot a savas feltárás előtt adagoltam. Ebben az esetben a hányados értéke kb. kétszerese lett a viszonyítási alapként szolgáló értéknek. Ennek a magyarázata csak a nevező, vagyis az EtHgPh-re kapott jel csökkenése lehet, hiszen a MeHg koncentráció, amennyiben standard oldatokkal dolgoztam gyakorlatilag állandónak bizonyult az 5.5.2. fejezetben leírt vizsgálatok szerint.

További vizsgálataim során BCR 464 CRM mintával dolgoztam, és a 100 µl 10 ppm-belső standard oldatot most ehhez adagoltam a mintaelőkészítés előbb ismertetett lépéseiben. A különbség az előző kísérlethez képest az volt, hogy ebben az esetben a MeHg mintából történő kinyerésével is számolni kellett. Az eredmények a **19. táblázat** második sorában kerülnek bemutatásra. Amennyiben a belső standardot a mintaelőkészítés utolsó lépésében, a derivatizációs folyamat közegeként szolgáló ciszteines fázishoz adagoltam, a jelhányados értéke kb. fele a viszonyítási alapként szolgáló értéknek. Ez összhangban van az anyagmérleg alapján tett megállapítással, miszerint a mintából történő metil-higany kinyerés kb.50 %-os

hatásfokkal valósul csak meg, miközben EtHg-ból nem keletkezik veszteség. Ugyanakkor a belső standardot a mintaelőkészítés elején, a sósavas feltárás előtt adagolva, a jelhányados értéke megközelíti a viszonyítási alapként kijelölt 1-et. Az előzőekben leírtak ismeretében ez csak akkor lehetséges, ha az EtHg koncentráció, illetve az EtHgPh jel is jelentősen csökken, vagyis valószínűsíthető, hogy az EtHg bomlik a savas feltárás során alkalmazott körülmények között.

Ezek alapján megállapítást nyert, hogy az etil-higany belső standarddal kivitelezett mérések során a CRM mintákból kapott jó eredmények, két szerencsétlen folyamat szerencsés „összjátékának” hatásaként születtek. A metil-higany mintából történő viszonylag kis hatásfokú feltárása és ezzel egyidejűleg a feltárás során bekövetkező etil-higany belső standard bomlása vezetett a helyes végeredményekhez. A vizsgálatok alapján kijelenthető, hogy ultrahanggal elősegített sósavas feltárást megvalósító metil-higany mérésekhez az etil-higany, mint belső standard nem alkalmas, hiszen az alkalmazott körülmények között jóval kisebb a stabilitása mint a mérendő komponensé.

5.6 A metil-higany és az etil-higany módosulatok stabilitásának vizsgálata

A módosulatanalitikai mérések talán legfontosabb kulcskérdése a mérni kívánt specieszek stabilitásának, a minta eredeti módosulateloszlásának megőrzése a minták tárolása illetve előkészítése során. Azokról a paraméterekről, melyek a higanyvegyületek stabilitását a tárolás során befolyásolják a 3.2.2. fejezetben már volt szó.

A mintaelőkészítés egyes lépéseinek optimalálása mindig két szempont figyelembevételével kell hogy történjen. Egyrészt olyan „enyhe” kezelést kell alkalmazni, hogy a mérni kívánt vegyületek integritása biztosítva legyen, másrészt elég „erélyes” körülményeket kell teremteni a mérendő vegyületek minél nagyobb hatásfokú feltárásához. Egy adott elem különböző módosulatai különböző mértékben tolerálhatják a mintaelőkészítés során alkalmazott reagens és energia behatásokat. A higanyspeciációs mérések esetében a mintaelőkészítéshez köthető hibás eredményeket elsősorban a már korábban említett véletlenszerű metilációs folyamatok eredményeként képződő „mesterséges termékek”, vagy éppen demetilációs folyamatok hatására keletkező bomlástermékek okozhatják.

Ismert tény, hogy a Hg-C kötéstávolság, az alkilcsoport méretének függvénye, így a különböző alkil-higany vegyületek Hg-C kötése különböző erősségű, az etil-higanyé gyengébb mint a metilezett származéké [Smith 1999]. Adott körülmények között ez stabilitásbeli különbséget okozhat a módosulatok között, vagyis egy MeHg-ra validált módszer nem feltétlenül alkalmazható pl. etil-higany-ra is. Mivel ez utóbbi általában nincs a biológiai mintákban, a problémával leginkább olyan mérések során találkozunk (lásd az előző

fejezetben leírtakat), ahol az etil-higany, mint belső standard szerepel. Ezekben az esetekben speciesz-specifikus validálásra, vagy módosulatonkénti stabilitásvizsgálatra van szükség.

Az 5.5 fejezetben leírt kísérletek azzal a következtetéssel zárultak, hogy a bemutatott sósavas ultrahangos feltárás metil-higany kinyerés szempontjából nem elég hatásos, az etil-higany viszont az alkalmazott körülmények között nem stabilis.

Az ebben a fejezetben bemutatásra kerülő vizsgálataim arra a kérdésre kerestek választ, hogy vajon a két módosulat stabilitása hogyan jellemezhető lúgos-metanolos feltárás esetén. A kísérletek során MeHgCl és EtHgCl standard oldatokkal dolgoztam, és az 5.1. fejezetben ismertetett, általam fejlesztett módszert alkalmaztam azzal a különbséggel, hogy a feltárás folyamatát ultrahang helyett mikrohullámú kezeléssel egészítettem ki. Ennek oka, egyrészt az, hogy a mikrohullám használata, mind az enyhe körülményeket igénylő speciációs mintaelőkészítések során, mind a drasztikus behatást alkalmazó elemanalitikai mérések terén egyre elterjedtebb. Következik ez mindabból, hogy alkalmazásával jelentősen csökkenthető (néhány percre) a feltárás időszükséglete. Másrészt a kísérletekhez használt mikrohullámú roncsoló ellenőrizhetőbb viszonyokat teremt, jobban szabályozható paraméterekkel rendelkezik, mint az általam használt ultrahangos vízfürdő.

Jelen fejezetben bemutatott munkával poszterdíjat nyertem a 2005-ben Budapesten megrendezett „*European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry*” konferencián. (Poszter címe: Determination of methylmercury in tuna fish in the framework of CCQM P-39 intercomparison and investigation of the limitations of ethylmercury as internal standard). A konferenciát követően vizsgálati eredményeinket az *Analytical and Bioanalytical Chemistry* tudományos folyóiratban, „Investigation of the species-specific degradation behaviour of methylmercury and ethylmercury under microwave irradiation” címmel tettük közzé [Abrankó 2005].

5.6.1 Mikrohullámú feltárás lúgos-metanolos közegben

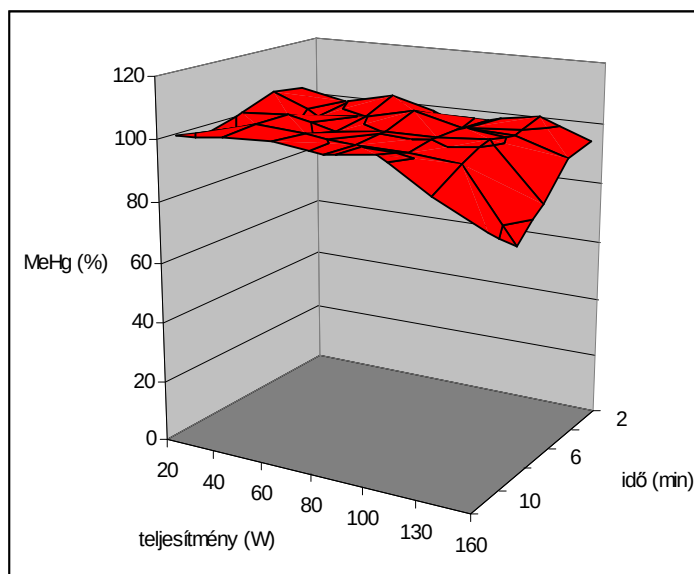
A kísérletek során modellezni akartam a mintákra alkalmazott „valódi” mintaelőkészítést. 5 ml 4,5 M-os metanolos NaOH oldatot mértem egy teflonból készült mikrohullámú roncsolóedénybe, majd 500 µl MeHgCl-EtHgCl vegyes standard oldat — mely MeHgCl-ra (mint Hg-ra) nézve 212 ng ml⁻¹, EtHgCl-ra (mint Hg-ra) nézve 224 ng ml⁻¹ koncentrációjú — hozzáadása, illetve az edény lezárása után 2-10 percig 20-160 W teljesítményt alkalmazva mikrohullámú kezelésnek tettem ki a mintákat. Szobahőmérsékletre való lehűlést követően a kezelt oldatból 50 µl-t pipettáztam egy 5 ml 1 M-os pH=5-ös Na-acetát puffert tartalmazó szeptumos tetővel lezárható üvegedénybe (Supelco, Sigma-Aldrich), beletettem egy teflonos keverőbabát, végül 500 µl 1 %-os NaBPh₄ reagenst, majd az

edényeket egy gyors mozdulattal lezártam. A továbbiakban a derivatizációt és a headspace módon kivitelezett szilárd fázisú mikroextrakciót az 5.1. fejezetben leírtak szerint hajtottam végre. A mérés során alkalmazott GC-s és AFS paramétereket a 7. táblázat tartalmazza. Ilyen kromatográfiás körülmények között a MeHgPh 8,33 s., az EtHgPh 9,07 s., és a PhHgPh 13,16 s. retenciós idővel eluálódik az oszlopról.

A stabilitásvizsgálatot megelőzően, a gázfázisú SPME alkalmazása során érvényes „egyensúlyi időt” határoztam meg EtHgPh-ra is. Hasonlóan a MeHgPh-hez az etil-higany fenilezett származéka is elérte egyensúlyi koncentrációját 10 perc alatt, így a továbbiakban ezt alkalmaztam. Gázfázisból, az esetleges bomlási folyamatok eredményeként megjelenő, szervesetlen higanyból származó difenil-higany (PhHgPh) nem volt mérhető, annak a szerves módosulatokhoz képest jóval kisebb mértékű illékonyasága miatt (5.1.1. fejezet).

A stabilitásvizsgálat során, a mintákat tehát 2, 4, 6, 8, 10 perc és 20, 40, 60, 80, 100, 130 és 160 W mikrohullámú teljesítmény beállításával kezeltem. Az eredményeket a 22. és 23. ábrákon mutatom be.

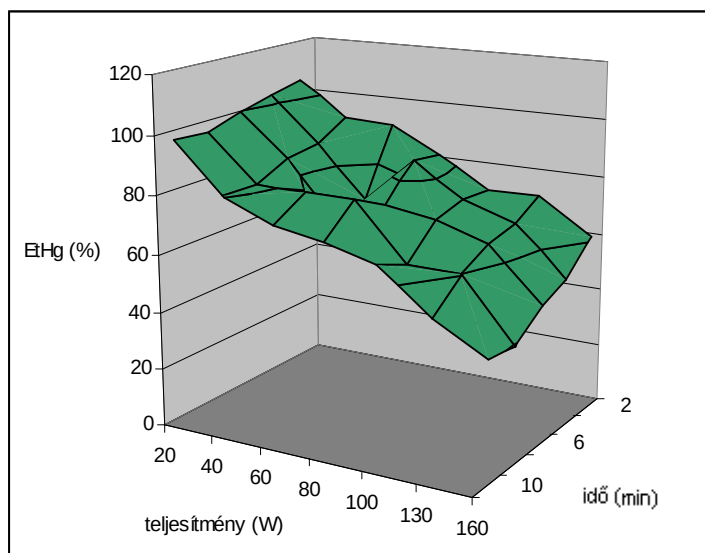
22. ábra. A metil-higannyal végzett stabilitásvizsgálat eredménye. Az ábrázolt adatok a kontroll minta integrált csúcsterületének %-ban vannak feltüntetve. Minden mérési pont 3 párhuzamos kísérlet eredményét tükrözi.



A kontroll mintára (olyan minta, mely mikrohullám hatásának nem volt kitéve) kapott jelet (három párhuzamos kísérlet eredményének az átlaga) tekintettem 100 %-nak, vagyis ebben az esetben veszteség nincsen, a kérdéses komponensek 100 %-os mennyisége jelen van az oldatban. A vizsgálatok során kapott átlagos csúcsterületeket, a kontroll mintára kapott

átlagos csúcsterülethez viszonyítva, %-ban fejeztem ki. Ezt jelenti az ábrákon szereplő MeHg %, illetve EtHg % jelölés.

23. ábra. Az etil-higannyal végzett stabilitásvizsgálat eredménye. Az ábrázolt adatok a kontroll minta integrált csúcsterületének %-ban vannak feltüntetve. Minden mérési pont 3 párhuzamos kísérlet eredményét tükrözi.



Az eredményekből egyértelműen kiderül, hogy a két módosulat eltérő viselkedést mutat a vizsgált körülmények között. A metil-higany esetében veszteséget először 130 W teljesítményen történő 10 perces kezelés során tapasztaltam, és csupán a 160 W – 6-, 8- és 10 perces beállítások alkalmával mértem 10 %-nál nagyobb jelcsökkenést a kontrollhoz képest. Ezzel szemben az etil-higany jóval kevésbé tolerálta a mikrohullámú besugárzást, csak a 20 W – 2-10 perc, illetve 40-60 W – 2 perc paramétersereg alkalmazása mellett tapasztaltam 10 %-nál kisebb eltérést a kontroll mintához képest. A **20. táblázat** ezen stabilitási vizsgálat néhány kiragadott adatát, illetve azok szórását tartalmazza.

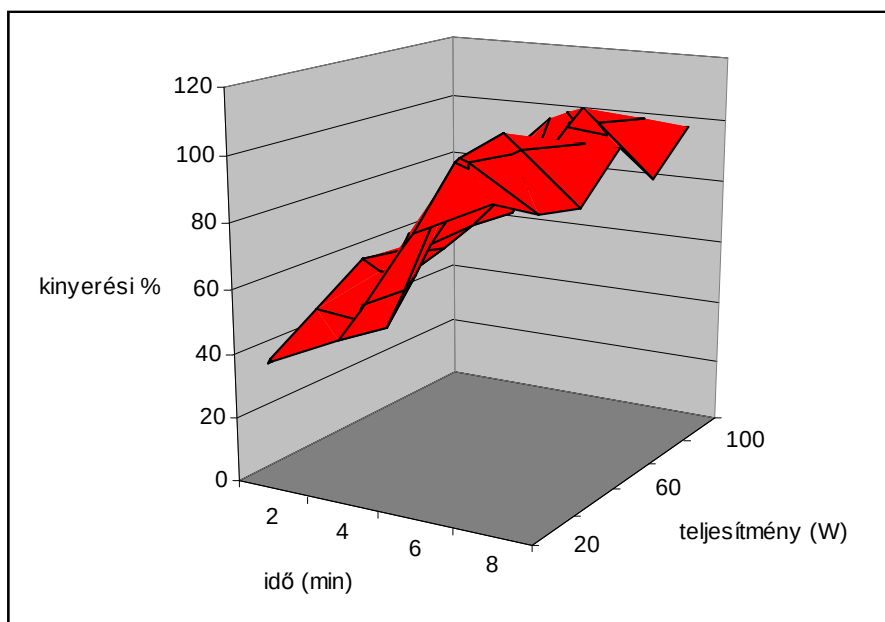
20. táblázat. Néhány kiragadott adat a stabilitásvizsgálat eredményeiből.

mikrohullámú teljesítmény (W)	besugárzási idő (min)	MeHg csúcsterület (n=3) SD	EtHg csúcsterület (n=3) SD
0 (kontroll)	0 (kontroll)	1,550 ± 0,070	1,030 ± 0,061
20	6	1,559 ± 0,023	1,027 ± 0,017
60	6	1,552 ± 0,041	0,760 ± 0,052
130	6	1,572 ± 0,047	0,676 ± 0,034

Összefoglalásként megállapítható, hogy az etil-higany jóval kisebb stabilitást mutatott a kísérletek során, mint a metilezett módosulat.

Ezek után felmerül a kérdés, hogy az etil-higany alkalmas-e belső standardnak a mikrohullámmal kiegészített lúgos-metanolos feltárást megvalósító metil-higany mérésekben. Másképp fogalmazva, azon paramétersereg (idő és teljesítmény) esetében, mellyel a mintából történő MeHg kinyerés maximális hatásfokkal megvalósítható, stabilis-e az etil-higany? Ennek eldöntésére BCR 464 CRM minta felhasználásával optimáltam a mikrohullámú feltárási folyamatát. Az eredményeket a **24. ábra** mutatja be. Az optimális paraméterek megállapításához figyelembe vettem a mérési eredmények szórását is. A megállapított optimális kezelési körülmények a következők voltak : 60 W, 6 perc. Ilyen beállítás mellett a BCR mintából három párhuzamos mérést végezve a kapott MeHg (mint Hg) koncentráció érték a következő volt : $4,96 \pm 0,31 \text{ ng g}^{-1}$ szárazanyagra számolva.

24. ábra. A mikrohullámmal végzett feltárási optimalizálása BCR 464 minta felhasználásával.



Utalva a **20. táblázat** ide tartozó adataira, megállapítható tehát, hogy a mikrohullámmal megvalósított lúgos-metanolos feltárást alkalmazó metil-higany mérésekben az etil-higany belső standardnak nem alkalmas. A jó hatásfokú feltáráshoz szükséges 60 W-on végzett 6 percig tartó mikrohullámú kezelés ugyanis az az etil-higany tartalomban már 20-25 %-os veszteséget okoz.

Felmerül ezek után a kérdés, hogy az etil-higany kinyerés akkor milyen körülmények között és milyen hatásokkal valósítható meg. Ezt a kérdést nem vizsgáltam, hiszen mivel biológiai mintákban etil-higany nem fordul elő, a problémának nem igazán van létjogosultsága.

5.6.2 Mikrohullámú feltárás vizes közegben

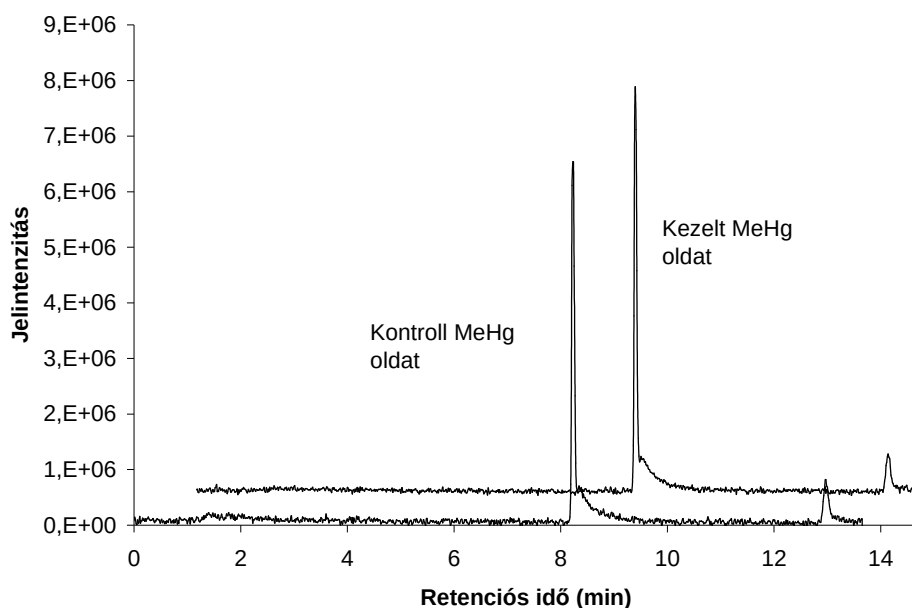
Az ebben a fejezetben ismertetett kísérletek arra irányultak, hogy részletesen megvizsgáljam e két szerves higany módosulat bomlási folyamatát, azonosítsam a bomlástermékeket a MeHg, EtHg és bomlástermékeik szimultán mérésével. Mivel a szerves módosulatok valószínűsíthetően szervesetlen higannyá bomlanak, így ezen vizsgálatok során folyadékfázisból magvalósított (immerziós) SPME-t alkalmaztam. Ennek az az oka, utalva az 5.1.1. fejezetben leírtakra, hogy a szervesetlen higanyból fenilezés során keletkező difenil-higany, jóval kisebb mértékű illékonyságának köszönhetően, gázfázisból nem mérhető.

A kísérletek során 5 ml 21 ng ml^{-1} (mint Hg) koncentrációjú vizes MeHgCl, illetve 5 ml 22 ng ml^{-1} (mint Hg) koncentrációjú vizes EtHgCl standard oldatokat mértem a mikrohullámú roncsolóedényekbe, majd a mintákat 120 W teljesítményen 8 percig tartó kezelésnek vetettem alá. Kontrollként mikrohullámú behatásnak ki nem tett minták szolgáltak. Szobahőmérsékletre való lehűlést követően a kezelt oldatokból, illetve a kontrollokból is 50 μl -t pipettáztam egy 5 ml ioncserélt vizet és 50 μl 0,5 %-os (v/v%) salétromsavat tartalmazó szeptumos tetővel lezárható üvegedénybe — a salétromsav, a derivatizációhoz szükséges kb. pH=5 beállításához kellett —, beletettem egy teflonos keverőbabát, végül 500 μl 1 %-os NaBPh₄ reagenst, majd az edényeket egy gyors mozdulattal lezártam. Az SPME-t immerziós módon hajtottam végre, 10 perces extrakciós idő elegendő volt mindhárom fenilezett származék egyensúlyi koncentrációjának eléréséhez. A módszer Hg²⁺-re számolt kimutatási határa (a vak jel szórásának háromszorososa osztva a meredekséggel) $0,03 \text{ ng ml}^{-1}$.

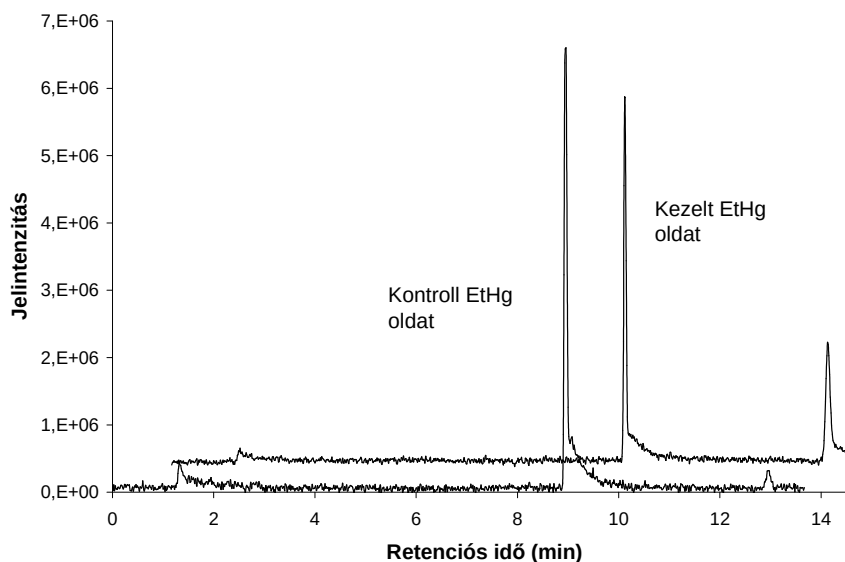
Ellentétben az előző fejezetben ismertetett mérésekkel, ezen kísérletek során vizes közeggel voltam kénytelen dolgozni. Ennek oka az volt, hogy mivel a bomlástermékként keletkező Hg²⁺ detektálásához immerziós technikát kellett alkalmazni, problémát okozott az acetát pufferben, illetve a metanolos NaOH-ban szennyezésként jelenlévő szervesetlen higany, vagyis „vak probléma” merült fel.

A stabilitásvizsgálat eredményeire alapozva választottam ki a 120 W-on végzett 8 perces kezelési időt, hiszen ilyen körülmények között a metil-higany stabilis, az etil-higany viszont már bomlik. Minden eredmény három párhuzamos kísérletből született. A mikrohullámú kezelésnek kitett és a kontroll minták kromatogramjai a 25. és 26. ábrán kerülnek bemutatásra.

25. ábra. A kezelt és a kontroll MeHg standard mintákra kapott kromatogramok. A tengelyek beosztása csak a „kontroll” kromatogramra érvényes, a „kezelt” kromatogramra vonatkozó retenciós idő és intenzitás skála a jobb átláthatóság érdekében el lett tolva.



26. ábra. A kezelt és a kontroll EtHg standard mintára kapott kromatogramok. A tengelyek beosztása csak „kontroll” kromatogramra érvényes, a „kezelt” kromatogramra vonatkozó retenciós idő és intenzitás skála a jobb átláthatóság érdekében el lett tolva.



Látható, hogy bár mind a MeHgCl, mind az EtHgCl standard oldat frissen lett készítve, mindkét kontroll oldatban detektálható volt 13,16 s. retenciós idővel jellemezhető szervesetlen higany is. Ez a szennyeződés a vaknak és/vagy a standard oldatok szervesetlen

higany szennyeződésének tulajdonítható. A metil-higany standard oldatban lévő Hg^{2+} -ra vonatkozó háttérekvivalens koncentráció (background equivalent concentration, BEC) meghatározásához, Hg^{2+} standard oldattal végrehajtott standard addíciós mérést végeztem. A BEC érték így Hg^{2+} -ra $0,067 \text{ ng ml}^{-1}$ -nek adódott, tehát ennek figyelembevételével kell értékelni a kapott eredményeket.

Eltekintve az említett „vakproblémától”, egyértelműen megállapítható, hogy az EtHg-nyal végzett kísérlet során a kezelt és a kontroll minták Hg^{2+} tartalma szignifikánsan különbözik (26. ábra), a kezelt oldatokban a kontrollokhoz képest jóval nagyobb PhHgPh jelet detektáltam. Az eredményeket nem kvantifikáltam, hiszen nem ez volt a cél, de a jelenséget, illetve a tendenciát jól mutatják az elvégzett vizsgálatok eredményei. Másrésről azonban az is bizonyítást nyert, hogy mint várható volt, a metil-higannyal végzett kísérletekben gyakorlatilag nem tapasztaltam különbséget a kezelt és a kontroll oldatok MeHg és Hg^{2+} tartalma között.

Összefoglalásként megállapítható, hogy a két vizsgált szerves módosulat eltérő viselkedést, stabilitást mutat lúgos-metanolos közegben mikrohullámú besugárzás hatására. A jelenség magyarázata a két vegyület Hg-C kötéstávolságának, illetve erőségének különbségében rejlik. A metil-higany sokkal jobban ellenáll a kezelésnek, csupán 130 W feletti teljesítményen végzett 6-10 perces energiaközlés hatására tapasztaltam némi instabilitást. Ugyanakkor CRM mintából történő csaknem 100 %-os hatásfokú kinyerése lúgos-metanolos közeget alkalmazva 60 W-teljesítményen 6 perc alatt elérhető. Ezzel szemben az etil-higany jóval kisebb mértékben tolerálja a mikrohullámú besugárzást, 40-60 W-on 2 percnél tovább kezelve a mintákat egyre nagyobb mértékű veszteség volt tapasztalható, bomlástermékként szervetlen higanyt detektáltam. Mintákból történő etil-higany kinyerésére nem optimaltam az eljárást, hiszen gyakorlati jelentősége ennek nincs, viszont esetenként a módosulatot metil-higany mérések belső standardjaként használják. Ebből a szempontból vizsgálva a problémát kijelenthető, hogy az etil-higany belső standardnak nem alkalmas, akár lúgos közegű-mikrohullámú feltárást, akár — utalva az 5.5. fejezetben leírtakra — ultrahangos kezeléssel kiegészített sósavas feltárást alkalmazunk a mintaelőkészítés során.

Visszatérve a mikrohullámhoz, nem szabad elfelejteni azonban, hogy a besugárzás hatásfoka az alkalmazott teljesítményen és időtartamon túl függ pl. az adott mikrohullámú berendezéstől, az egyszerre kezelt minták számától, a mintatérfogatoktól, de leginkább a feltárási közegtől. Azáltal, hogy a közeg befolyásolja a mikrohullámok átvitelét, a feltárási

oldószer, a mintamátrix mind hatással vannak a besugárzás hatásfokára, ennek következtében pedig a komponensek stabilitására.

Végül hangsúlyozni szeretném, minden olyan módszer esetében, mely alkil-higany vegyületekkel dolgozik, belső standardot használ, a módszervalidálás kapcsán célszerű elvégezni a kérdéses módosulatok egyenkénti speciesz-specifikus bomlási vizsgálatát azon körülmények között, ahogy a méréseket végrehajtjuk.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kidolgoztam egy gyors, viszonylag olcsó, rutinszerűen alkalmazható higanyspeciációs analitikai módszert élelmiszerminták metil-higany tartalmának meghatározására. Az általam fejlesztett, — két nemzetközi körelemzésben való részvétel eredményei alapján nemzetközi szinten is elismert és helyesnek bizonyult — lúgos feltárás-SPME-GC-pirolízis-AFS módszer segítségével néhány tíz ppt koncentrációtartományban lehet higanykomponenseket mérni.
Megállapítottam, hogy az SPME-t headspace módon végrehajtva, a módszer szelektív metil-higanyra nézve, hiszen a mintákban még jelenlévő szervesetlen higanyból képződött fenilezett származék nem elég illékony gőztéri SPME megvalósítására.
2. Elsőként megállapítottam, hogy „kis higany tartalmú” minták lúgos-metanolos feltárása és NaBPh₄ reagenssel való fenilezése alkalmazható együtt, feltáró oldószerként azonban metanolban oldott KOH helyett metanolban oldott NaOH-ot kell alkalmazni, amennyiben ragaszkodunk a viszonylag olcsónak számító NaBPh₄ fenilező reagens használatához.
3. Elvégeztem a fejlesztett módszer bizonytalanságbecslési vizsgálatát. Meghatároztam a feltárás, a kalibráció, a derivatizáció, az SPME és a mérőműszer, illetve az eljárás során alkalmazott térfogatmérések és tömegmérés bizonytalanságának eredményre gyakorolt hatását. Megállapítottam, hogy az eredmények reprodukálhatósága szempontjából elsősorban a feltárás, másodsorban a kalibráció folyamata a legkritikusabb lépések. A derivatizáció és a szilárd fázisú mikroextrakció bizonytalanságának eredményre gyakorolt hatása jóval kisebb mértékű.
4. Felmértem a hazai kereskedelmi forgalomban lévő tengeri hal tartalmú termékek metil-higany, illetve összes higany tartalmát. Megállapítottam, hogy higany tartalmuk jóval kisebb, mint a tengeri halakra törvényileg megszabott érték. A hazai táplálkozási szokásokat figyelembe véve elvégeztem a hazánkban tenyésztett pontyok, illetve afrikai harcsák higanyspeciációs analízisét is. A pontymintákban a tengeri halakhoz képest harmadakkora, azaz minimális, az afrikai harcsákban a tengeri halakhoz képest 3-4-szeres koncentrációkat mértem. Az utóbbiak táplálékául szolgáló haltáp

elemzésével megállapítást nyert, hogy a jelenség oka valószínűleg a pontyok és a harcsák eltérő táplálása.

Végül a magyarországi éves átlagos halfogyasztás, illetve a mért adatok tükrében megállapítottam, hogy hazánkban a halfogyasztáshoz köthető egészségügyi kockázat elhanyagolható.

5. Az általam fejlesztett módszertől független, sósavas feltáráson, oldószeres extrakción, GC-MS detektáláson alapuló technika anyagmérlegének felvételével bizonyítottam, hogy a korábban belső standard használatával végrehajtott, helyesnek ítélt módszer belső standard nélkül nem alkalmas minták metil-higany tartalmának mérésére. Az adott paraméterek mellett ugyanis a feltárás hatásfoka csupán kb. 50 %. Megállapítottam, hogy a belső standardként alkalmazott etil-higanyból jelentős mértékű veszteség keletkezik a sósavas feltárás során, így ez utóbbi jelenség, illetve a nem elég hatásos feltárás véletlen egybeesése okozta a belső standarddal produkált helyes eredményeket.
6. Végül az 5. pontban vázolt gondolatok és eredmények folytatásaként megvizsgáltam a két szerves módosulat, lúgos közegű mikrohullámmal végzett feltárás során mutatott stabilitását. Megállapítottam, hogy az etil-higany jóval kevésbé tolerálja az energiabehatást mint a metilezett módosulat. Mivel a jó hatásfokú feltáráshoz szükséges besugárzási paraméterek mellett is instabilitást mutat az etil-higany, kijelenthető, hogy metil-higany mérésekben belső standardként való alkalmazása meglehetősen kétséges, de mindenképp előzetes stabilitásvizsgálatot igényel.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A higany módosulatanalitika legnagyobb kihívását a minták igen kis higany koncentrációja jelenti. Olyan módosulatanalitikára alkalmas rendszereket kell tehát építeni, melyek érzékenysége és szelektivitása megfelel az adott feladat elvárásainak.

Doktori munkám során a higanyspeciáció lehetőségeit vizsgáltam két egymástól független analitikai módszer kidolgozása, tanulmányozása, illetve minőségbiztosítása kapcsán.

Az egyik, általam tanulmányozott módszer savas ultrahangos feltáráson, szerves oldószeres extrakción, származékképzésen és GC-MS mérésen alapul.

Ezen igen összetett és sok lépésből álló folyamat egyes részlépéseinek hatásfokát, illetve a lépések közti higany „átvitel” mértékét, az eljárás teljes folyamatára kiterjedő anyagmérleg felállításával határoztam meg. A kísérletek eredményei alapján megállapítottam, hogy a higanyspeciációs gyakorlatban igen népszerűnek számító sósavas feltárás, az általam alkalmazott körülmények között nem elég hatékony a metil-higany kinyerésére, csupán 50-60%-os hatásfokkal jellemezhető. Ugyanakkor az eljárás egyéb lépései (zsírtalanítás, oldószeres extrakció, származékképzés,...stb) során jelentős mértékű veszteséget nem tapasztaltam. Kísérleteim során megvizsgáltam továbbá a higany egy másik szerves módosulatának, az etil-higanynak a stabilitását. Arra voltam kíváncsi, hogy ez, a biológiai mintákban nem található módosulat, melyet éppen ez okból gyakran használnak belső standardnak metil-higany mérésekhez, milyen hatásfokkal „vihető keresztül” a mintaelőkészítés folyamatán. Az eredmények alapján megállapítást nyert, hogy az alkalmazott savas feltárás körülményei között az etil-higany nem stabilis, vagyis belső standardként való alkalmazása helytelen, vagy éppen helytelenül helyesnek ítélt eredményekhez vezethet.

A másik, általam kidolgozott módszer során lúgos-metanolos feltárást és szilárd fázisú mikroextrakciót megvalósító mintaelőkészítést, gázkromatográfiás elválasztást és atomfluoreszcens detektálást alkalmaztam. A detektálás higanyspecifikus jellege, valamint az SPME által megvalósított dúsítás és nagyhatékonyságú mintabevitel eredményeképpen szelektív, és az előzőhöz képest alacsonyabb kimutatási határral rendelkező technikát sikerült fejleszteni, mely néhány tíz ppt koncentráció tartományban is nagy biztonsággal használható. A módszer további előnye, hogy gőztéri SPME-t alkalmazva szelektív metil-higanyra nézve, gyorsabb mint az előző, olcsó, ezáltal rutinszerűen is alkalmazható élelmiszerminták elemzésére. A módszervalidálás során bizonyítottam, hogy ellentétben a savas feltárással a lúgos-metanolos hidrolízis hatásfoka gyakorlatilag 100 %. Ugyanakkor viszont a szerves

módosulatok stabilitását vizsgálva, megállapítható, hogy a metil-higanyhoz képest az etil-higany ezen lúgos körülmények között is jóval kevésbé tolerálja a feltárás során alkalmazott energiabehatást. Ezek alapján már általános érvényűnek tekinthető az a tapasztalat, hogy az etil-higany belső standardként való alkalmazása meglehetősen kérdéses.

A fejlesztett módszer minőségbiztosítása céljából részt vettem nemzetközi körelemzéseken, az eredmények azt bizonyítják, hogy az eljárás nemzetközi szinten is megállja a helyét.

Manapság a minőségbiztosítás kapcsán egyre gyakoribb elvárás az alkalmazott mérési technikák bizonytalanságbecslésének elvégzése. Ebből adódóan aktuális, — mivel összetett, sok lépésből álló módszerről lévén szó — különösen hasznos és tanulságos vizsgálatnak bizonyult annak a meghatározása, hogy az egyes részfolyamatok bizonytalansága milyen mértékben járul hozzá a mérési folyamat eredő bizonytalanságához. A kísérletsorozat eredményeképp megállapítást nyert, hogy az ultrahangos feltárás folyamata és a kalibráció a legkitikusabb, és a továbbiakban a legnagyobb körütekintést igénylő lépések az eredmények precizitása szempontjából. A derivatizáció, az SPME, és főleg a mintaelőkészítés során alkalmazott térfogat,- és tömegmérések bizonytalansága ebből a szempontból kevésbé lényeges paraméterek.

Végül a vizsgálatok alapján valódi minták mérésére alkalmasabbnak bizonyult, lúgos feltáráson alapuló SPME-GC-AFS módszer segítségével elvégeztem a Magyarországon kereskedelmi forgalomban lévő tengeri halak és hal tartalmú termékek, illetve hazai tenyésztésű édesvízi halak higanyspeciációs elemzését. Az eredmények ismeretében megállapítottam, hogy a vizsgált minták metil-higany és összes higany tartalma jóval az előírt határérték alatt van, vagyis hazánkban a halfogyasztáshoz köthető egészségügyi kockázat elhanyagolható.

8. SUMMARY

In this thesis I investigated the facilities of mercury speciation through the development, the study and the quality assurance of two different analytical methods.

One of the studied methods is based on acid leaching, solvent extraction and GC-MS detection. The efficiency of each step was determined by calculating the mass balance. As a result of these experiments it can be allocated that the widely used acid leaching is not effective enough to complete extraction of methylmercury from samples. At the same time in the course of other steps loss was not experienced. Using this method I studied the stability of the other organic specie like ethylmercury because it is used as an internal standard for methylmercury measurements. In the experiments ethylmercury appeared to be less tolerant towards acid leaching than methylmercury, so the use of ethylmercury as an internal standard may result in false effects.

The other method I improved is based on alkaline sample digestion with NaOH, followed by aqueous phase phenylation derivatization with NaBPh₄, solid phase microextraction (SPME) and GC-AFS detection. As a result of mercury specific detection and preconcentration — effective sample introduction system by SPME, low detection limit can be achieved. Applying headspace SPME the method is selective in relation to methylmercury, it is fast and cost-efficient. In contrast to the acid leaching the alkaline digestion appeared to be much more effective in many ways. From CRM samples nearly 100 % recovery can be achieved. Investigating the degradation behaviour of methylmercury and ethylmercury under microwave irradiation in alkaline solution, it can be concluded that methylmercury appeared to be much more tolerant towards these conditions than ethylmercury. As for its low stability the ethylmercury is not suitable as an internal standard for methylmercury measurements.

In order to carry out the quality control of the second mentioned method I participated in international interlaboratory studies. The results confirmed that the method can be used to determine a certain amount of methylmercury in “real-life” fish samples.

In the course of my PhD studies the uncertainty statement of the improved method was evaluated and presented according to the principles of ISO/GUM. As a result of these experiments it can be concluded that the alkaline digestion and the calibration are the most critical steps regarding reproducibility of measurements.

Finally to carry out an estimation of average Hungarian methylmercury exposures via marine and freshwater fish and/or marine fish-containing food consumption, many commercially available products, 3 pooled representative seafood samples of the three fish

species most consumed in Hungary and two freshwater fish collected from domestic fish farms were analyzed. It can be concluded that obtained mercury and methylmercury levels in each sample are some degree less than the typical values found in the literature. Considering the average Hungarian consumption of these products, the risk of methylmercury intoxication of an average consumer via fish consumption is negligible.

9. MELLÉKLETEK

Irodalomjegyzék

- Abrankó L. "Nagyhatékonyságú mintabeviteli technikák fejlesztése az elemanalitikában." Doktori disszertáció, Budapesti Corvinus Egyetem, 2006.
- Abrankó L., Jókai Zs., Fodor P. (2005): Investigation of the species-specific degradation behaviour of methylmercury and ethylmercury under microwave irradiation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383 448-453. p.
- Abranko L., Kmellar B., Fodor P. (2007): Comparison of extraction procedures for methylmercury determination by a SPME-GC-AFS system. *Microchemical Journal*, 85 122. p.
- Abuin M., Carro A. M., Lorenzo R. A. (2000): Experimental design of a microwave-assisted extraction-derivatization method for the analysis of methylmercury. *Journal of Chromatography A*, 889 185. p.
- Adeloju S. B., Mann T.F. (1987): Acid effects on the measurement of mercury by cold vapour atomic absorption spectrometry. *Analytical Letters*, 20 985-1000. p.
- Ahmed R., Stoeppler M. (1986): Decomposition and stability studies of methylmercury in water using cold vapour atomic absorption spectrometry. *Analyst*, 111 1371. p.
- Amyot M., Gill G. A., Morel F. M. M. (1997): Production and Loss of Dissolved Gaseous Mercury in Coastal Seawater. *Environmental Science and Technology*, 31 3606-3611. p.
- Aregbe Y., Taylor P.D.P. (2006): CCQM/P39.1: As, Hg, Pb, Se and methylmercury in salmon. *Metrologia*, 43, Tech.Suppl. 08006, p.
- Arthur C. L., Pawliszyn J. (1990): Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62 2145-2148. p.
- ATSDR. "Profile for Mercury." ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)/U.S. Public Health Service, 1989.
- Aula I., Braunschweiler H., Malin I. (1995): The watershed flux of mercury examined with indicators in the Tucurui reservoir in Para, Brazil. *Science of The Total Environment*, 175 97. p.
- Baeyens W. (1992): Speciation of mercury in different compartments of the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 11 245. p.
- Balázs L. "A kémia története I-II." Budapest: Nemzeti Tankönyvkiadó Rt., 1996.
- Baltisberger R. J., Hildebrand D. A., Griehle D., Ballantine T. A. (1979): A study of the disproportionation of mercury(I) induced by gas sparging in acidic aqueous solutions for cold-vapor atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 111 111. p.

- Barbosa F. J., Palmer C.D., Krug F.J., Parsons P.J. (2004): Determination of total mercury in whole blood by flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry with room temperature digestion using tetramethylammonium hydroxide. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19 1000-1005. p.
- Barkay T., Miller S. M., Summers A. O. (2003): Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 27 355. p.
- Bartha A., Ikrenyi K. (1982): Interfering effects on the determination of low concentrations of mercury in geological materials by cold-vapour atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 139 329. p.
- Begley T. P., Walts A.E. and Walsh C.T. (1986): Mechanistic studies of a protonolytic organomercurial cleaving enzyme: bacterial organomercurial lyase. *Biochemistry*, 25 7192-7200. p.
- Beim A. M., Grosheva E.I. (1992): Ecological chemistry of mercury contained in bleached kraft pulp mill effluents. *Water Air and Soil Pollution*, 65 135-141. p.
- Bloom N. S., Colman J.A., Barber L. (1997): Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methyl mercury from environmental samples. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 358 371-377. p.
- Bloom N. S., Horvat M., Watras C.J. (1995): Results of the international aqueous mercury speciation intercomparison exercise. *Water Air and Soil Pollution*, 80 1257-1268. p.
- Bluska E., Kandler W., Paslawski P., Hulanicki A. (1995): Atomic absorption spectrometric determination of mercury in soil standard reference material following microwave sample pretreatment. *Microchimica Acta*, 119 137-146. p.
- Bulska E., Baxter D. C., Frech W. (1991): Capillary column gas chromatography for mercury speciation. *Analytica Chimica Acta*, 249 545. p.
- Bulska E., Emteborg H., Baxter D.C., Frech W., Ellingsen D., Thomassen Y. (1992): Speciation of mercury in human whole blood by capillary gas chromatography with a microwave-induced plasma emission detector system following complexometric extraction and butylation. *Analyst*, 117 657. p.
- Cabañero A. I., Madrid Y., Cámara C. (2005): Enzymatic probe sonication extraction of Se in animal-based food samples: a new perspective on sample preparation for total and Se speciation analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, V381 373. p.
- Cai Y., Bayona J. M. (1995): Determination of methylmercury in fish and river water samples using in situ sodium tetraethylborate derivatization following by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 696 113. p.

- Cai Y., Monsalud S., Jaffe R., Jones R. D. (2000): Gas chromatographic determination of organomercury following aqueous derivatization with sodium tetraethylborate and sodium tetraphenylborate: Comparative study of gas chromatography coupled with atomic fluorescence spectrometry, atomic emission spectrometry and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 876 147. p.
- Cai Y., Monsalud S., Furton K.G., Jaffe R., Jones R.D. (1998): Determination of methylmercury in fish and aqueous samples using solid-phase microextraction followed by gas chromatography atomic fluorescence spectrometry. *Applied Organometallic Chemistry*, 12 565-569. p.
- Camargo J. A. (2002): Contribution of Spanish-American silver mines (1570-1820) to the present high mercury concentrations in the global environment: a review. *Chemosphere*, 48 51. p.
- Campbell M. J., Vermeir G., Dams R., Quevauviller P. (1992): Influence of chemical species on the determination of mercury in a biological matrix (cod muscle) using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 7 617. p.
- Caricchia A. M., Minervini G., Soldati P., Chiavarini S., Ubaldi C., Morabito R. (1997): GC-ECD Determination of Methylmercury in Sediment Samples Using a SPB-608 Capillary Column after Alkaline Digestion. *Microchemical Journal*, 55 44. p.
- Carpi A. (1997): Mercury from combustion sources: a review of the chemical species emitted and their transport in the atmosphere. *Water Air and Soil Pollution*, 98 241-254. p.
- Carro-Díaz A. M., Lorenzo-Ferreira R. A., Cela-Torrijos R. (1994): Speciation of organomercurials in biological and environmental samples by gas chromatography with microwave-induced plasma atomic emission detection. *Journal of Chromatography A*, 683 245. p.
- Carro A. M., Neira I., Rodil R., Lorenzo R.A. (2002): Speciation of mercury compounds by gas chromatography with atomic emission detection. Simultaneous optimization of headspace solid-phase microextraction and derivatization procedure by use of chemometric techniques. *Chromatographia*, 56 733-738. p.
- Choi S.-C., Chase T., Jr., Bartha R. (1994): Metabolic Pathways Leading to Mercury Methylation in *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 4072-4077. p.
- Clarkson T. W. (1997): The three modern faces of mercury. *Environmental Health Perspect*, 110 (Suppl.1) 11-23. p.
- Cooper C. M., Gillespie Jr W. B. (2001): Arsenic and mercury concentrations in major landscape components of an intensively cultivated watershed. *Environmental Pollution*, 111 67. p.

- Costa-Fernandez J. M., Lunzer F., Pereiro-Garcia R., Sanz-Medel A., Bordel-Garcia N. (1995): Direct coupling of high-performance liquid chromatography to microwave-induced plasma atomic emission spectrometry via volatile-species generation and its application to mercury and arsenic speciation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 10 1019. p.
- Counter S. A., Buchanan L. H. (2004): Mercury exposure in children: a review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198 209. p.
- De Smaele T., Moens L., Dams R., Sandra P., Van der Eycken J., Vandyck J. (1998): Sodium tetra(n-propyl)borate: a novel aqueous in situ derivatization reagent for the simultaneous determination of organomercury, -lead and -tin compounds with capillary gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 793 99. p.
- Delgado A., Prieto A., Zuloaga O., de Diego A., Madariaga J. M. (2007): Production of artifact methylmercury during the analysis of certified reference sediments: Use of ionic exchange in the sample treatment step to minimise the problem. *Analytica Chimica Acta*, 582 109. p.
- Devars S., Aviles C., Cervantes C. and Moreno-Sanchez R. (2000): Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. *Archives of Microbiology*, 174 175-180. p.
- Duewer D. L. "A robust approach for the determination of CCQM key comparison reference values and uncertainties." Working Document CCQM 04-15, BIPM, 2004.
- Ebdon L., Foulkes M.E., Le Roux S., Munoz-Olivas R. (2002): Cold vapour atomic fluorescence spectrometry and gas chromatography-pyrolysis-atomic fluorescence spectrometry for routine determination of total and organometallic mercury in food samples. *Analyst*, 127 1108-1114. p.
- EC (98/83): Council Directive 98/83 EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *OJ L 330*, 5.12.1998, 32-54. p.
- EC (221/2002): Commission Regulation (EC) No 221/2002 of 6 February 2002 amending Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *OJ L 37*, 7.2. 2002, 4-6. p.
- EC (2003): Draft Report from Task 3.2.11.: Assessment of dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States. European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection, Report on tasks for scientific co-operation, final draft, 5 December 2003. p.
- EFSA (2004): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to mercury and methylmercury in food (Request No EFSA-Q-2003-030). *The EFSA Journal*, 34 1-4. p.
- Emteborg H., Borklund E., Odman F., Karlsson L., Mathiasson L., Frech W., Baxter D.C., (1996): Determination of methylmercury in sediments using supercritical fluid extraction and gas chromatography coupled with microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. *Analyst*, 121 19. p.

- Emteborg H., Snell J., Qian J., Frech W. (1999): Sources of systematic errors in mercury speciation using Grignard reagents and capillary gas chromatography coupled to atomic spectrometry. *Chemosphere*, 39 1137. p.
- EPA. "Mercury Study Report to Congress. Vol.IV.: An assessment of exposure to mercury in the United States." EPA-452/R-97-006. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Air Quality Planning and Standards and Office of Research and Development., 1997.
- EPA. "EPA method 7473: Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrometry." Environmental Protection Agency, Washington., 1998.
- Ergucyener C., Ataman O.Y., Aygun S., Temizes A. (1988): Mercury speciation by electrochemical separation and cold-vapour atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 3 177. p.
- Evans E. H., Day J.A., Price W., Smith C.M.M., Sutton K., Tyson J.F. (2003): Atomic spectroscopy update. Advances in atomic emission, absorption and fluorescence spectrometry and related techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectroscopy*, 18 803-833. p.
- Falter R. (1999): Experimental study on the unintentional abiotic methylation of inorganic mercury during analysis: Part 2: Controlled laboratory experiments to elucidate the mechanism and critical discussion of the species specific isotope addition correction method. *Chemosphere*, 39 1075. p.
- Falter R., Scholer H. F. (1994a): Determination of methyl-, ethyl-, phenyl and total mercury in Neckar river fish. *Chemosphere*, 29 1333. p.
- Falter R., Scholer H. F. (1994b): Interfacing high-performance liquid chromatography and cold-vapour atomic absorption spectrometry with on-line UV irradiation for the determination of organic mercury compounds. *Journal of Chromatography A*, 675 253. p.
- Fang F., Wang Q., Li J. (2001): Atmospheric particulate mercury concentration and its dry deposition flux in Changchun City, China. *The Science of The Total Environment*, 281 229. p.
- Fernández R. G., Montes-Bayón M., Garcia-Alonso J.I., Sanz-Medel A. (2000): Comparison of different derivatization approaches for mercury speciation in biological tissues by gas chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 35 639-646. p.
- Filippelli M. (1987): Determination of trace amounts of organic and mercury in biological materials by graphite furnace atomic absorption spectrometry and organic mercury speciation by gas chromatography. *Analytical Chemistry*, 59 116-118. p.
- Fischer R., Rapsomanikis S., Andreae M. O. (1993): Determination of methylmercury in fish samples using GC/AA and sodium tetraethylborate derivatization. *Analytical Chemistry*, 65 763-766. p.

- Fragueiro S., Lavilla I., Bendicho C. (2004): Direct coupling of solid phase microextraction and quartz tube-atomic absorption spectrometry for selective and sensitive determination of methylmercury in seafood: an assessment of chloride and hydride generation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19 250-254. p.
- Gaona X., Valiente M. (2003): Stability study on a Westoo-based methodology to determine organomercury compounds in polluted soil samples. *Analytica Chimica Acta*, 480 219. p.
- Gerbersmann C., Heisterkamp M., Adams F. C., Broekaert J. C. (1997): Two methods for the speciation analysis of mercury in fish involving microwave-assisted digestion and gas chromatography-atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 350 273. p.
- Gomez-Ariza J. L., Lorenzo F., Garcia-Barrera T. (2005): Guidelines for routine mercury speciation analysis in seafood by gas chromatography coupled to a home-modified AFS detector. Application to the Andalusian coast (south Spain). *Chemosphere*, 61 1401. p.
- Graeme Md K. A., Pollack Jr M. D. F. C. V. (1998): Heavy Metal Toxicity, Part I: Arsenic and Mercury. *Journal of Emergency Medicine*, 16 45. p.
- Grinberg P., Campos R.C., Mester Z., Sturgeon R.E. (2003a): A comparison of alkyl derivatization methods for speciation of mercury based on solid phase microextraction gas chromatography with furnace atomization plasma emission spectrometry detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18 902-909. p.
- Grinberg P., Campos R. C., Mester Z., Sturgeon R. E. (2003b): Solid phase microextraction capillary gas chromatography combined with furnace atomization plasma emission spectrometry for speciation of mercury in fish tissues. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 58 427. p.
- Hardy S., Jones P. (1997): Capillary electrophoresis determination of methylmercury in fish and crab meat after extraction as the dithizone sulphonate complex. *Journal of Chromatography A*, 791 333. p.
- Harrington C., Julie Romeril Tim Catterick (1998): The speciation of mercury and organomercury compounds by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12 911-916. p.
- Harrington C. F. (2000): The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19 167. p.
- Harrington C. F., Merson S. A., D' Silva T. M. (2004): Method to reduce the memory effect of mercury in the analysis of fish tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 505 247. p.
- Hatch W. R., Ott W. L. (1968): Determination of submicrogram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Chemistry*, 40 2085-2087. p.

- He B., Jiang G.B., Ni Z.M. (1998): Determination of methylmercury in biological samples and sediments by capillary gas chromatography coupled with atomic absorption spectrometry after hydride derivatization and solid phase microextraction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13 1141-1144. p.
- Hempel M., Hintelmann H., Wilken R.D. (1992): Determination of organic mercury species in soils by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Analyst*, 117 669-672. p.
- Hermanson M. H. (1998): Anthropogenic mercury deposition to arctic lake sediments. *Water Air and Soil Pollution*, 101 309-321. p.
- Heumann K. G., Gallus S. M., Radlinger G., Vogl J. (1998): Accurate determination of element species by on-line coupling of chromatographic systems with ICP-MS using isotope dilution technique. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 53 273. p.
- Hight S. C., Cheng J. (2005): Determination of total mercury in seafood by cold vapor-atomic absorption spectroscopy (CVAAS) after microwave decomposition. *Food Chemistry*, 91 557. p.
- Hintelmann H. (1999): Comparison of different extraction techniques used for methylmercury analysis with respect to accidental formation of methylmercury during sample preparation. *Chemosphere*, 39 1093. p.
- Honlap. "EPA. Mercury: Human exposure. <http://www.epa.gov/mercury/exposure.htm>." 1.
- Honlap. "EPA (EPA-823-F-01-011) (2001). Mercury update: Impact on Fish Advisories. <http://www.epa.gov/ost/fishadvice/mercupd.pdf>." 2.
- Honlap. "SACN (Scientific Advisory Committee on Nutrition) (2004), Report: Advice on fish consumption: benefits&risks. http://www.sacn.gov.uk/pdfs/fics_scan_advice_fish.pdf." 3.
- Honlap. "ICES (2004) <http://www.ices.dk/env/refcodes/guidelines.asp?topic=sample>." 4.
- Honlap. "<http://www.imep.ws>." 5.
- Horvat M. (1999): Current status and future needs for biological and environmental reference materials certified for methylmercury compounds. *Chemosphere*, 39 1167. p.
- Horvat M., A.R. Byrne (1992): Preliminary study of the effects of some physical parameters on the stability of methylmercury in biological samples. *Analyst*, 117 665. p.
- Horvat M., Bloom N. S., Liang L. (1993): Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples: Part 1. Sediments. *Analytica Chimica Acta*, 281 135. p.
- Horvat M., Byrne A. R., May K. (1990): A modified method for the determination of methylmercury by gas chromatography. *Talanta*, 37 207. p.

- Innanen S. (1998): The ratio of anthropogenic to natural mercury release in Ontario: Three emission scenarios. *The Science of The Total Environment*, 213 25. p.
- Ipolyi I. "Gyakorlati megoldások a speciációs analitika minőségének biztosítására." Doktori disszertáció, Szent István Egyetem, 2003.
- Ipolyi I., Massanisso P., Sposato S., Fodor P., Morabito R. (2004): Concentration levels of total and methylmercury in mussel samples collected along the coasts of Sardinia Island (Italy). *Analytica Chimica Acta*, 505 145. p.
- ISO/GUM. "International Organisation for Standardisation, Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements." ISO, ISBN 92-97-10188-9, Geneva., 1993.
- Jia C., Luo Y., Pawliszyn J. (1998): Solid phase microextraction combined with HPLC for determination of metal ions using crown ether as selective extracting reagent. *Journal of Microcolumn Separation*, 10 167-173. p.
- Joiris R., Holsbeek C., L.N. L. m. (1999): Total and Methylmercury in Sardines *Sardinella aurita* and *Sardina pilchardus* from Tunisia. *Marine Pollution Bulletin*, 38 188. p.
- Jókai Z., Abrankó L., Fodor P. (2005): SPME-GC-Pyrolysis-AFS Determination of Methylmercury in Marine Fish Products by Alkaline Sample Preparation and Aqueous Phase Phenylation Derivatization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53 5499-5505. p.
- Kamps L., Miller H. (1972): Total mercury-monomethylmercury content of several species of fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 8. 273. p.
- Kerper L. E., Ballatori N., Clarkson T.W. (1992): Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. *American Journal of Physiology*, 267 761-765. p.
- Knight S. S., Cooper C. M. (1996): Insecticide and metal contamination of a mixed cover agricultural watershed. *Water Science and Technology*, 33 227. p.
- Koval P. V., Kalmychkov G. V., Gelety V. F., Leonova G. A., Medvedev V. I., Andrulaitis L. D. (1999): Correlation of natural and technogenic mercury sources in the Baikal polygon, Russia. *Journal of Geochemical Exploration*, 66 277. p.
- Lacerda L. D. (1997): Evolution of mercury contamination in Brazil. *Water, Air and Soil Pollution*, 97 247-255. p.
- Lansens P., Laino C. C., Meuleman C., Baeyens W. (1991): Evaluation of gas chromatographic columns for the determination of methylmercury in aqueous head space extracts from biological samples. *Journal of Chromatography A*, 586 329. p.
- Lansens P., Meuleman C., Baeyens W. (1990a): Long-term stability of methylmercury standard solutions in distilled, deionized water. *Analytica Chimica Acta*, 229 281. p.

- Lansens P., Meuleman C., Leermakers M., Baeyens W. (1990b): Determination of methylmercury in natural waters by headspace gas chromatography with microwave-induced plasma detection after preconcentration on a resin containing dithiocarbamate groups. *Analytica Chimica Acta*, 234 417. p.
- Lee Y. H., Mowrer J. (1989): Determination of methylmercury in natural waters at the sub-nanograms per litre level by capillary gas chromatography after adsorbent preconcentration. *Analytica Chimica Acta*, 221 259. p.
- Lepine L., Chamberland A. (1995): Field sampling and analytical intercomparison for mercury and methylmercury determination in natural waters. *Water Air and Soil Pollution*, 80 1247-1256. p.
- Li Y., Chen C., Li B., Sun J., Wang J., Gao Y., Zhao Y., Chai Z. (2006): Elimination efficiency of different reagents for the memory effect of mercury using ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 94-96. p.
- Liang L., Horvat M., Bloom N. S. (1994): An improved speciation method for mercury by GC/CVAFS after aqueous phase ethylation and room temperature precollection. *Talanta*, 41 371. p.
- Liang L., Horvat M., Cernichiari E., Gelein B., Balogh S. (1996): Simple solvent extraction technique for elimination of matrix interferences in the determination of methylmercury in environmental and biological samples by ethylation-gas chromatography-cold vapor atomic fluorescence spectrometry. *Talanta*, 43 1883. p.
- Liang N., Bloom N.S. (1993): Determination of total mercury by single-stage gold amalgamation with cold-vapour atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 8 591-594. p.
- Lin Y., Smart N. G., Wai C. M. (1995): Supercritical fluid extraction and chromatography of metal chelates and organometallic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 14 123. p.
- Lindberg S. E., Brooks S., Lin C. J., Scott K. J., Landis M. S., Stevens R. K., Goodsite M., Richter A. (2002): Dynamic Oxidation of Gaseous Mercury in the Arctic Troposphere at Polar Sunrise. *Environmental Science and Technology*, 36 1245-1256. p.
- Lindqvist O., Rodhe H. (1985): Atmospheric mercury: a review. *Tellus*, 37B 136-159. p.
- Linsinger T. P. J., Pauwels J. A.M.H., van der Veen, Schimmel H., Lamberty A. (2001): Homogeneity and stability of reference materials. *Accreditation and Quality Assurance*, 6 20-25. p.
- Lobinski R., Rodriguez P., Chassaigne H., Wasik A., Szpunar I. (1998): Elemental speciation and coupled techniques - towards faster and reliable analyses. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13 859. p.
- Logar M., Horvat M., Falnoga I. (2000): A methodological study of mercury speciation using Dogfish liver CRM (DOLT-2). *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366 453-460. p.

- Lorenzo R. A., Vazquez M. J., Carro A. M., Cela R. (1999): Methylmercury extraction from aquatic sediments: A comparison between manual, supercritical fluid and microwave-assisted techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18 410. p.
- Louie H. W. (1983): Determination of total mercury in fish: an improved method. *Analyst*, 108 1313-1317. p.
- Loux N. T. (1998): An assessment of mercury/species/dependent binding with natural organic carbon. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 10 127-136. p.
- Magos L., Halbach S., Clarkson T. W. (1978): Role of catalase in the oxidation of mercury vapor. *Biochemical Pharmacology*, 27 1373. p.
- Magos L. a. C. T. W. (2001): Review on the toxicity of ethyl mercury including its presence as a preservative in biological and pharmaceutical preparations. *Journal of Applied Toxicology*, 21 1-5. p.
- Martos P. A., Pawliszyn J. (1997): Calibration of Solid Phase Microextraction for Air Analyses Based on Physical Chemical Properties of the Coating. *Analytical Chemistry*, 69 206-215. p.
- Mason R. P., Lawson N. M., Sheu G. R. (2000): Annual and seasonal trends in mercury deposition in Maryland. *Atmospheric Environment*, 34 1691. p.
- Medina I., Rubi E., Mejuto M. C., Cela R. (1993): Speciation of organomercurials in marine samples using capillary electrophoresis. *Talanta*, 40 1631. p.
- Mena M. L., McLeod C.W., Jones P., Withers A., Minganti V., Capelli R., Quevauviller P. (1995): Microcolumn Preconcentration and Gas-Chromatography Microwave-Induced Plasma-Atomic-Emission-Spectrometry (Gc-Mip-Aes) for Mercury Speciation in waters. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 351 456-460. p.
- Mester Z., Lam J., Sturgeon R., Pawliszyn J. (2000): Determination of methylmercury by solid-phase microextraction inductively coupled plasma mass spectrometry: a new sample introduction method for volatile metal species. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15 837-842. p.
- Mester Z., Sturgeon R. (2005): Trace element speciation using solid phase microextraction. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 60 1243. p.
- Mester Z., Sturgeon R., Pawliszyn J. (2001): Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 56 233. p.
- Moens L., De Smaele T., Dams R., Van Den Broeck P., Sandra P. (1997): Sensitive, Simultaneous Determination of Organomercury, -lead, and -tin Compounds with Headspace Solid Phase Microextraction Capillary Gas Chromatography Combined with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 69 1604-1611. p.
- Montes-Bayon M. G. M., Garcia-Alonso J.I., Sanz-Medel A. (1999): An alternative GC-ICP-MS interface design for trace element speciation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14 1317-1322. p.

- Morel F. M. M., Kraepiel A.M.L., Amyot M. (1998): The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29 543-566. p.
- MSZ. "EN 13506:2002. Magyar Szabvány. Vízminőség. A higany meghatározása atomfluoreszcens spektrometriával." 2002.
- MULSPOT. "MULSPOT certification exercise on species of As, Hg and Sn and on Se in oyster tissue, sample T34 (candidate BCR-464)." EC Contract SM&T CT98-2232; European Commission, Brussels, 2004.
- Munaf E., Haraguchi H., Ishii D., Takeuchi T., Goto M. (1990): Speciation of mercury compounds in waste water by microcolumn liquid chromatography using a preconcentration column with cold-vapour atomic absorption spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 235 399. p.
- Muranszky G., Posta J. (1999): Higany és szerves higanyvegyületek speciációs analízise élelmiszerekben. p. In: (Szerk.): 42. *Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés*. Veszprém, 29-30.: p.
- Neumüller D. O.-A. "Römpp Vegyészeti Kislexikon." Budapest: Műszaki Könyvkiadó, 1982.
- Nriagu J. O. (1990): Global metal pollution. *Environment*, 33 7-33. p.
- Nriagu J. O. (1993): Mercury pollution from silver mining in colonial South America. 365-368. p. In: Abrao J. J., Wasserman, J.C., Silva Filho, E.V. (Szerk.): *International Symposium Perspectives for Environmental Geochemistry in Tropical Countries*. London: p.
- Nriagu J. O. (1994): Mechanistic steps in the photoreduction of mercury in natural waters. *The Science of The Total Environment*, 154 1. p.
- Oda C. E., Ingle J.D. (1981): Speciation of mercury with cold vapor atomic absorption spectrometry by selective reduction. *Analytical Chemistry*, 53 2305. p.
- Ogunseitan O. A. (1998): Protein Method for Investigating Mercuric Reductase Gene Expression in Aquatic Environments. *Applied Environmental Microbiology*, 64 695-702. p.
- Oremland R. S., Culbertson C.W. and Winfrey M.R. (1991): Methylmercury decomposition in sediments and bacterial cultures: involvement of methanogens and sulfate reducers in oxidative demethylation. *Applied Environmental Microbiology*, 27 130-137. p.
- Ortiz A. I. C., Albarran Y.M., Rica C.C. (2002): Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 1595-1601. p.
- OT-SAFE. "Sources, consumer exposure and risks of organotin contamination in seafood." EU Project QLK1-CT-2001-01437, Institute for Environmental Studies, Amsterdam, 2004.

- Pacyna E. G., Munch J. (1991): Anthropogenic mercury emission in Europe. *Water, Air and Soil Pollution*, 56 51-61. p.
- Pacyna E. G., Pacyna J.M. (2002): Global emission of mercury from anthropogenic sources in 1995. *Water, Air and Soil Pollution*, 137 149-165. p.
- Palmieri H. E. L., Leonel L.V. (2000): Determination of methylmercury in fish tissue by gas chromatography with microwave-induced plasma atomic emission spectrometry after derivatization with sodium tetraphenylborate. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366 466-469. p.
- Pawliszyn J. "Theory of Solid Phase Microextraction." In *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, 51. New York: Wiley-VCH, 1997.
- Perez-Cid B., Lavilla I., Bendicho C. (1998): Speeding up of a three-stage sequential extraction method for metal speciation using focused ultrasound. *Analytica Chimica Acta*, 360 35. p.
- Pirrone N., Costa P., Pacyna J. M., Ferrara R. (2001): Mercury emissions to the atmosphere from natural and anthropogenic sources in the Mediterranean region. *Atmospheric Environment*, 35 2997. p.
- Pirrone N., Keeler G. J., Nriagu J. O. (1996): Regional differences in worldwide emissions of mercury to the atmosphere. *Atmospheric Environment*, 30 2981. p.
- Porter R. "Vér és virtus Az orvostudomány rövid története." Budapest: HVG Kiadó Rt., 2003.
- Powell P. P. (1991): Minamata disease: a story of mercury's malevolence. *South Med.J.*, 84 1352. p.
- Puk R., Weber J.H. (1994a): Critical review of analytical methods for determination of inorganic mercury and methylmercury compounds. *Applied Organometallic Chemistry*, 8 293-302. p.
- Puk R., Weber J. H. (1994b): Determination of mercury(II), monomethylmercury cation, dimethylmercury and diethylmercury by hydride generation, cryogenic trapping and atomic absorption spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 292 175. p.
- Qiang T., Johnson W., Buckley B. (2003): Mercury speciation analysis in soil samples by ion chromatography, post-column cold vapor generation and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18. 696. p.
- Quétel C. R., Snell J.P., Aregbe Y., Jókai Zs., Abrankó L., Brunori C., Morabito R., Hagan W., Azemard S., Wyse E., Fajon V., Horvat M., Logar M., Donard O., Krupp E., Entwisle J., Hearn R., Schantz M., Inagaki K., Takatsu A., Grinberg P., Willie S., Hintelmann H., Björn E., Blanco Gonzalez E., Centeno G., Ignacio Garcia Alonso J., Sanz-Medel A. (2005): Methylmercury in tuna: demonstrating measurement capabilities and evaluating comparability of results worldwide from the CCQM P-39 comparison. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20 1058-1066. p.

- Quevauviller P., Fortunati G.U., Filippelli M., Bortoli A., Muntau H. (1998): Certification of total mercury and methyl-mercury in an estuarine sediment, CRM 580. *Applied Organometallic Chemistry*, 12 531-539. p.
- Quevauviller P., Morabito R. (2000): Evaluation of extraction recoveries for organometallic determinations in environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19 86. p.
- Qvarnström J., Frech W. (2002): Mercury species transformation during sample pre-treatment of biological tissues studied by HPLC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 1486-1491. p.
- Ramalhosa E., Segade S.Rio, Pereira E., Vale C., Duarte A. (2001): Microwave treatment of biological samples for methylmercury determination by high performance liquid chromatography - cold vapor atomic fluorescence spectrometry. *Analyst*, 126 1583-1587. p.
- Rieuwerts J. S., Farago M. (1996): Mercury concentrations in a historic lead mining and smelting town in the Czech Republic: a pilot study. *Science of The Total Environment*, 188 167. p.
- Rodil R., Carro A. M., Lorenzo R. A., Abuin M., Cela R. (2002): Methylmercury determination in biological samples by derivatization, solid-phase microextraction and gas chromatography with microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 963 313. p.
- Rosain R. M., Wai C. M. (1973): The rate of loss of mercury from aqueous solution when stored in various containers. *Analytica Chimica Acta*, 65 279. p.
- Roulet M., Lucotte M., Canuel R., Farella N., Courcelles M., Guimaraes J. R. D., Mergler D., Amorim M. (2000): Increase in mercury contamination recorded in lacustrine sediments following deforestation in the central Amazon. *Chemical Geology*, 165 243. p.
- Rubi E., Lorenzo R. A., Casais C., Carro A. M., Cela R. (1992): Evaluation of capillary columns used in the routine determination of methylmercury in biological and environmental materials. *Journal of Chromatography A*, 605 69. p.
- Rytuba J. J. (2000): Mercury mine drainage and processes that control its environmental impact. *The Science of The Total Environment*, 260 57. p.
- Sanchez Uria J. E., Sanz-Medel A. (1998): Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples. *Talanta*, 47 509. p.
- Schall E. D. (1957): Volumetric Determination of Potassium. *Analytical Chemistry*, 29 1044-1046. p.
- Segade S. R., Bendicho C. (1999): Ultrasound-assisted extraction for mercury spetiation by the flow injection - cold vapor technique. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14 263. p.

- Seller P., Kelly C. A., Rudd J. W. M., MacHutchon A. R. (1996): Photodegradation of methylmercury in lakes. *Nature*, 380 694. p.
- Slemr F., Langer E. (1992): Increase in globalatmospheric concentrations of mercury inferred from measurements over the Atlantic Ocean. *Nature*, 355 434-437. p.
- Smart N. A. (1968): Use and residues of mercury compounds in agriculture. *Residue Reviews*, 23,1. p.
- Smith D. W. (1999): Electronegativity equilibration and organometallic thermochemistry: the strengths of carbon-carbon bonds in metal alkyls. *Journal of Organometallic Chemistry*, 585 150. p.
- Smith T., Pitts K., McGarvey J. A., Summers A. O. (1998): Bacterial Oxidation of Mercury Metal Vapor, Hg(0). *Applied Environmental Microbiology*, 64 1328-1332. p.
- Snell J. P., Frech W., Thomassen Y. (1996): Performance improvements in the determination of mercury species in natural gas condensate using on-line amalgamation trap or solid-phase micro-extraction with capillary gas chromatography-microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. *Analyst*, 121 1055-1060. p.
- Storelli M., Giacominielli Stuffer R., Marcotrigiano G.O. (2002): Total and methylmercury residues in tuna fish from the Mediterranean sea. *Food Additives and Contaminants*, 19 715-720. p.
- Storelli M. M., Storelli A., Giacominielli-Stuffer R., Marcotrigiano G.O. (2005): Mercury speciation in the muscle of two commercially important fish, hake (*Merluccius merluccius*) and striped mullet (*Mullus barbatus*) from the Mediterranean sea: estimated weekly intake. *Food Chemistry*, 89 295-300. p.
- Suda I., Suda. M., and Hirayama K. (1993): Degradation of methyl and ethyl mercury by singlet oxygen generated from sea water exposed to sunlight or ultraviolet light. *Archives of Toxicology*, 67 365-368. p.
- Susana Rio-Segade C. B. (1999): Ultrasound-assisted extraction for mercury speciation by flow injection-cold vapor technique. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14 263-268. p.
- Tao G., Willie S.N. Sturgeon R.E. (1998): Determination of total mercury in biological tissues by flow injection cold vapour generation atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide digestion. *Analyst*, 123 1215-1218. p.
- Tseng C. M., DeDiego A., Martin F.M., Amouroux D., Donard O.F.X. (1997): Rapid determination of inorganic mercury and methylmercury in biological reference materials by hydride generation, cryofocusing, atomic absorption spectrometry after open focused microwave-assisted alkaline digestion. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12 743-750. p.
- Ure A. M. (1975): The determination of mercury by non-flame atomic absorption and fluorescence spectrometry: A review. *Analytica Chimica Acta*, 76 1. p.
- USEPA. "Mercury study report to Congress EPA-452/R-97-004." USEPA, 1997.

- USEPA. "Mercury update: Impact on Fish Advisores." EPA-823-F-01-11, Washington, 2001.
- van der Veen A. M. H., Linsinger T.P.J., Pauwels J. (2001): Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 2. Homogeneity study. *Accreditation and Quality Assurance*, 6 26-30. p.
- Vanhaecke F., Moens L. (1999): Recent trends in trace element determination and speciation using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 364 440. p.
- Venkataraman K. "An analysis of mercury data in the Great Lakes Area." The University of Toledo, 2000.
- Wang Q., Kim D., Dionysiou D. D., Sorial G. A., Timberlake D. (2004): Sources and remediation for mercury contamination in aquatic systems--a literature review. *Environmental Pollution*, 131 323. p.
- Wang Q. C., Shen W.G., Ma Z.W. (2000): Estimation of mercury emission from coal combustion in China. *Environmental Science and Technology*, 34 2711-2713. p.
- Weast R. C. "Handbook of Chemistry and Physics." Cleveland, OH: CRP Press, 1973.
- Weber J. H. (1993): Review of possible paths for abiotic methylation of mercury(II) in the aquatic environment. *Chemosphere*, 26 2063. p.
- Wedepohl K. K. (1995): The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59 1271-1232. p.
- Wei J., McLeod C. W. (1992): Rapid sequential determination of inorganic mercury and methylmercury in natural waters by flow injection--cold vapour-atomic fluorescence spectrometry. *Talanta*, 39 1537. p.
- Westöö G. (1968): Determination of methylmercury salts in various kind of biological material. *Acta Chemica Scandinavica*, 22 2277-2280. p.
- WHO. "Evaluation of Mercury, Lead, Cadmium and the food additives Amaranth, Diethylpyrocarbonate and Octyl Gallate." FAO Nutrition Meetings Report Series, No.51A: WHO Food Additives Series No.4., 1972.
- WHO. "Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants." Cambridge University Press. (WHO Food Additives Series No.24.), 1989.
- WHO. "Methylmercury." Environmental Health Criteria, 1990.
- WHO. "Safety evaluation of Certain Food Additives and Contaminants." WHO Food additives Series No.44., 2000.
- Wilken R. D. (1992): Mercury analysis: a special example of species analysis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 342 795-801. p.

- Yang L., Mester Z., Sturgeon R.E. (2003): Determination of methylmercury in fish tissues by isotope dilution SPME-GC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18 431-436. p.
- Yu L.-P., Yan X.-P. (2003): Factors affecting the stability of inorganic and methylmercury during sample storage. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22 245. p.
- Yudovich Y. E., Ketris M. P. (2005a): Mercury in coal: a review Part 2. Coal use and environmental problems. *International Journal of Coal Geology*, 62 135. p.
- Yudovich Y. E., Ketris M. P. (2005b): Mercury in coal: a review: Part 1. Geochemistry. *International Journal of Coal Geology*, 62 107. p.
- Zhou C. Y., Wong, M.K., Koh L.L., Wee Y.L. (1996): Comparison of acid mixtures in high pressure microwave digestion methods for the determination of the total mercury in sediments by cold vapour atomic absorption spectrometry. *Analytical Sciences*, 12 471-476. p.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítségemre voltak, támogattak és elviselték a sokszor igen sok munkával járó hétköznapijaimat négy éves doktori munkám során.

Szeretném megköszönni elsőként **édesanyámnak és édesapámnak**, akik ösztönöztek és támogattak tanulmányaim során.

Férjemnek, Jókai Miklósnak, és gyermekeimnek, **Blankának és Micónak**, akik türelemmel viselték sokszor estig tartó méréseimet, külföldi távolmaradásaimat, és kitartásra biztattak kudarcaim alkalmával.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Fodor Péternek**, akinek szakmai támogatása, kitartó türelme és szervező munkája nélkül ez a dolgozat nem készült volna el.

Köszönöm **Dr. Abrankó Lászlónak**, hogy munkám során hasznos tanácsaival sokszor útmutatást adott, és szakmai konzultációk formájában kísérleteimben segítségemre volt. **Dr. Dernovics Mihálynak** az élelmiszermintákat valamint segítőkész kritikáit, **Dr. Fodor Mariettának**, hogy mindig akadt ideje egy-egy biztató szóra. Szeretném megköszönni a tanszék minden további dolgozójának, **Stefanovicsné Dr. Bányai Évának, Dr. Kosáry Juditnak, Kmellár Bélának, Bertényiné Divinyi Zsuzsának, Schäffer Richárdnak, Dr. Sörös Csillának, Dr. Kápolna Emesének, Dr. Hegedűs Attilának, Üveges Mártának, Dr. Woller Ágnesnek, Dr. Tóth Árpádnak, Szurduk Sándornének, Bakonyvári Ildikónak és Firisz Zsuzsannának**, hogy segítségemre voltak és kellemes tanszéki légkört biztosítottak számomra.

Köszönettel tartozom **Tömöry Istvánnak**, aki segített elhárítani a számítástechnikai problémákat és biztosította a zökkenőmentes munkát.

Külön köszönöm **Posta József Professzor Úr és Dr. Bartha András** opponensi munkáját, építő jellegű kritikáit a házivédés alkalmával.

Végül szeretnék köszönetet mondani **Dr. Ipolyi Ildikónak, Roberto Morabito Professzornak** és az ENEA Környezetanalitikai Osztály valamennyi dolgozójának, akik segítségemre voltak és mindig a rendelkezésemre álltak a Rómában végzett kutatómunkám során.