



SZENT ISTVÁN EGYETEM

MINTAELŐKÉSZÍTÉSI MÓDSZEREK KIDOLGOZÁSA  
ÉS REFERENCIAANYAGOK ELŐÁLLÍTÁSA  
MÓDOSULATANALITIKAI CÉLOKRA

DERNOVICS MIHÁLY

doktori értekezése

Készült a Szent István Egyetem  
Alkalmazott Kémia Tanszékén

Budapest, 2003

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Élelmiszertudományok

**vezetője:** Dr. Fekete András  
Egyetemi tanár, az MTA doktora  
SZIE, Budai Campus, Élelmiszertudományi Kar,  
Fizika-Automatika Tanszék

**Témavezető:** Dr. Fodor Péter  
Tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA doktora  
SZIE, Budai Campus, Élelmiszertudományi Kar,  
Alkalmazott Kémia Tanszék

**A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:**

A jelölt a Szent István Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK .....	3
RÖVIDÍTÉSEK .....	6
1. BEVEZETÉS .....	7
1.1. A módosulatanalitika létrejöttének okai és fejlődése a kezdetektől napjainkig.....	7
1.2. Célkitűzéseim.....	9
1.3. Nevezéktani és fogalmazástechnikai megjegyzések.....	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	11
2.1. A szelén és az arzén módosulatanalitikai történelme.....	11
2.1.1. A szelénkutatás és a módosulatanalitika összekapcsolódása .....	11
2.1.2. Két dolog, mely elválaszthatatlan egymástól: az arzén és a módosulatanalitika .....	17
2.2. Mintaelőkészítési eljárások: Hagyományos módszerek – Teljes feltárás.....	21
2.2.1. Teljes feltárás összes szeléntartalom meghatározás céljából .....	22
2.2.1.1. Általános ismertetőjegyek .....	22
2.2.1.2. A jellegzetes mintacsoportok kezelése.....	23
2.2.2. Teljes feltárás összes arzéntartalom meghatározás céljából.....	24
2.2.2.1. Általános ismertetőjegyek .....	24
2.2.2.2. A jellegzetes mintacsoportok kezelése.....	25
2.3. Mintaelőkészítési eljárások: Módosulatanalitikai módszerek .....	26
2.3.1. Módosulatanalitikai mintaelőkészítési eljárások szelénre .....	27
2.3.1.1. Általános ismertetőjegyek .....	27
2.3.1.2. Pufferelt és nem pufferelt („vizes”) közeggel végzett extrakciók.....	27
2.3.1.3. Szerves oldószeres extrakció.....	29
2.3.1.4. Az ún. biológiai pH-tartománynál kisebb kémhatáson végzett extrakciók és kezelések .....	30
2.3.1.4.1. „Tömény” (1 mol l <sup>-1</sup> koncentrációnál töményebb) oldatok felhasználása.....	30
2.3.1.4.2. „Híg” (1 mol l <sup>-1</sup> koncentrációnál hígabb) oldatok felhasználása .....	31
2.3.1.5. Enzimes hidrolízis – fehérjebontó és nem fehérjebontó enzimek.....	32
2.3.1.5.1. Az enzimes mintaelőkészítés általános jellemzői.....	33
2.3.1.5.2. Enzimes hidrolízis – fehérjebontó enzimek alkalmazása az emberi szervezet emésztési folyamatainak modellezésére .....	33
2.3.1.5.3. Enzimes hidrolízis – fehérjebontó enzimek alkalmazása egy lépéses mintaelőkészítési módszerekhez .....	35
2.3.1.5.4. Enzimes hidrolízis – egyéb, nem fehérjebontó enzimek alkalmazása .....	38
2.3.1.6. Kételyek az enzimes mintaelőkészítés kapcsán – új módszerek keresése .....	40
2.3.1.7. „Mintaelőkészítés” a szelén fehérjeszintű módosulatanalitikai vizsgálataihoz .....	41
2.3.1.8. Zárszó a szelén módosulatanalitikai vizsgálataihoz.....	42
2.3.2. Módosulatanalitikai mintaelőkészítési eljárások arzénre .....	43
2.3.2.1. Általános ismertetőjegyek .....	43
2.3.2.2. „Mintaelőkészítés nem igénylő” esetek: folyékony minták az arzén módosulatanalitikában.....	44
2.3.2.3. A metanol-víz oldószer-páros és a szerves oldószer szerepe szilárd minták előkészítése során.....	45
2.3.2.4. Enzimes módszerek felhasználási területe az arzén módosulatanalitikában.....	49
2.3.2.5. Pufferelt közegek és híg savak/lúgok alkalmazása: szekvenciális mintaelőkészítés a műveletileg meghatározott arzén módosulatanalitikában .....	50
2.3.2.6. Tömény savak és bázisok szerepe az arzén módosulatanalitikai mintaelőkészítésben .....	52
2.4. Az analitikai mérések minőségbiztosítási folyamatának elengedhetetlen kellékeinek, a referenciaanyagoknak bemutatása: típusok, előállítási mód és felhasználás.....	53
2.4.1. Történelmi előzmények .....	53
2.4.2. A referenciaanyagok főbb típusai és előállításuk általános folyamata.....	54

2.4.3. A módosulatanalitikai mérések minőségbiztosításának jellegzetességei a rendelkezésre álló referenciaanyagok tükrében .....	57
3. ANYAG ÉS MÓDSZER .....	61
3.1. Összes As- és Se-tartalom meghatározása során alkalmazott módszerek, vegyszerek és berendezések ismertetése .....	61
3.2. A módosulatanalitikai mintaelőkészítések során felhasznált vegyszerek, standardok és általánosan alkalmazott berendezések ismertetése .....	61
3.3. Statisztikai eljárások .....	62
4. EREDMÉNYEK .....	63
4.1. Az enzimes mintaelőkészítés kritikai vizsgálata az arzén módosulatanalitika területén....	63
4.1.1. Arzénnel dúsított zöldség As-módosulatanalitikai előkészítése és vizsgálata .....	64
4.1.1.1. A minta bemutatása és a választott mintaelőkészítési megközelítés ismertetése ..	64
4.1.1.2. A felhasznált vegyszerek és alkalmazott mintaelőkészítési eljárások bemutatása	64
4.1.1.3. A különböző mintaelőkészítési módszerek és az elért extrakciós hatások bemutatása – az eredmények értékelése.....	65
4.1.2. Referenciaanyag célzattal készített sima lepényhal ( <i>Pleurocytes platessa</i> ) As-módosulatanalitikai előkészítése az enzimes módszerek használhatóságának tükrében .....	67
4.1.2.1. Tapasztalati előzmények tengeri kagylómintákon végzett kísérletek alapján .....	67
4.1.2.2. A halminta bemutatása és a választott mintaelőkészítési megközelítés ismertetése	68
4.1.2.3. A felhasznált vegyszerek és alkalmazott mintaelőkészítési eljárások bemutatása	68
4.1.2.4. Az enzimes mintaelőkészítés főbb paramétereinek járulékos optimalizálása .....	69
4.1.2.5. A halminta módosulatanalitikai elemzése és a mintaelőkészítés optimalizálása során kapott eredmények értékelése .....	70
4.1.3. A vizsgált arzéntartalmú minták enzimes mintaelőkészítésének kritikai vizsgálata során elért új tudományos eredmények .....	72
4.2. Szelénnel dúsított élesztőminták módosulatanalitikai mintaelőkészítésének kidolgozása.	72
4.2.1. A „Se-21” jelű, szelénnel dúsított élesztő módosulatanalitikai mintaelőkészítésének kidolgozása .....	73
4.2.1.1. A minta bemutatása és a választott mintaelőkészítési megközelítés ismertetése ..	73
4.2.1.2. A felhasznált vegyszerek és alkalmazott mintaelőkészítési eljárások bemutatása	74
4.2.1.3. A különböző mintaelőkészítési módszerek és az elért extrakciós hatások bemutatása – az eredmények értékelése.....	75
4.2.1.4. A módosulatanalitikai vizsgálatok eredményeinek ismertetése és értékelése .....	77
4.2.2. LRM céljából készített Se-dúsított élesztő módosulatanalitikai vizsgálata .....	79
4.2.2.1. A minta bemutatása és a választott mintaelőkészítési megközelítés ismertetése ..	79
4.2.2.2. A felhasznált vegyszerek és az alkalmazott mintaelőkészítés bemutatása .....	80
4.2.2.3. A két <i>Streptomyces griseus</i> fehérjebontó enzimkeverékkel elért kinyerési hatások és a módosulatanalitikai vizsgálatok eredményeinek ismertetése és értékelése	81
4.2.3. A szelénnel dúsított élesztőminták vizsgálata során elért új tudományos eredmények	82
4.3. Szelénnel dúsított gomba módosulatanalitikai mintaelőkészítésének kidolgozása .....	83
4.3.1. A szelénsóval kiegészített komposzton termesztett, Se-dúsított gomba módosulatanalitikai mintaelőkészítésének kidolgozása .....	84
4.3.1.1. A minta bemutatása és a választott mintaelőkészítési megközelítés ismertetése ..	84
4.3.1.2. A felhasznált vegyszerek és alkalmazott mintaelőkészítési eljárások bemutatása	85
4.3.1.3. Adalékolás a mintaelőkészítés minőségbiztosításának céljából .....	86
4.3.1.4. A különböző mintaelőkészítési módszerek és az elért extrakciós hatások bemutatása – az eredmények értékelése.....	86
4.3.1.5. A módosulatanalitikai vizsgálatok és az adalékolás eredményeinek ismertetése és értékelése.....	87
4.3.1.6. Új tudományos eredmények a szelénsóval kiegészített komposzton termesztett, Se-dúsított gomba módosulatanalitikai vizsgálatához kapcsolódóan .....	91

4.3.2. A szelénnel dúsított élesztőkészítménnyel kiegészített komposzton termesztett, Se-dúsított gomba módosulatanalitikai mintaelőkészítésének kidolgozása .....	93
4.3.2.1. A minta bemutatása és a választott mintaelőkészítési megközelítés ismertetése...	93
4.3.2.2. A felhasznált vegyszerek és alkalmazott mintaelőkészítési eljárások bemutatása.	93
4.3.2.3. A sejtfalbontási lépés optimalizálását célul tűző kísérletek értékelése .....	96
4.3.2.4. A különböző mintaelőkészítési módszerek és az elért extrakciós hatások bemutatása – az eredmények értékelése .....	98
4.3.2.5. A módosulatanalitikai vizsgálatok eredményeinek ismertetése és értékelése.....	99
4.3.2.6. Új tudományos eredmények a Se-tartalmú élesztővel kiegészített komposzton termesztett, Se-dúsított gomba módosulatanalitikai vizsgálatához kapcsolódóan.....	101
4.3.3. A szelénvel dúsított gombamintákkal végzett módosulatanalitikai vizsgálatok lezárása és utószó.....	102
4.4. Az első LRM kidolgozása a szelén módosulatanalitika történetében.....	102
4.4.1. Felhasznált anyagok és vegyszerek .....	105
4.4.2. A brazil dió zsírtalanítása .....	105
4.4.3. A brazil dió módosulatanalitikai mintaelőkészítése során végrehajtott műveletek bemutatása .....	106
4.4.4. A brazil dióból készülő, Se-módosulatanalitikai LRM kialakítása során alkalmazott műveleti lépések ismertetése .....	107
4.4.4.1. A referenciaanyag előállítása a nyersanyag feldolgozásától a tárolási kísérletek kialakításáig.....	107
4.4.4.2. A homogenitásvizsgálat menete.....	107
4.4.5. A minta zsírtalanítására irányuló kísérletek kiértékelése .....	108
4.4.6. A szelénmérleg alakulása a referenciaanyag készítése során .....	109
4.4.7. A brazil dió Se-módosulatanalitikai méréseinek kiértékelése.....	110
4.4.8. A homogenitásvizsgálat eredményeinek bemutatása és értékelése.....	111
4.4.9. A stabilitásvizsgálat eredményeinek bemutatása és értékelése .....	113
4.4.10. A brazil dió alapú, Se-módosulatanalitikai referenciaanyag készítése során elért új tudományos eredmények .....	115
4.4.11. A brazil dióval végzett kísérletek lezárása és utószó .....	116
5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK .....	117
ÖSSZEFOGLALÁS.....	119
SUMMARY .....	120
1. MELLÉKLET (IRODALOMJEGYZÉK).....	121
2. MELLÉKLET (SZELÉN-MÓDOSULATOK).....	131
3. MELLÉKLET (ARZÉN-MÓDOSULATOK) .....	133
4. MELLÉKLET (SZELÉN-MINTAELŐKÉSZÍTÉS).....	134
5. MELLÉKLET (ARZÉN-MINTAELŐKÉSZÍTÉS).....	136
6. MELLÉKLET (RM-ELŐÁLLÍTÁS).....	138
7. MELLÉKLET (RSM-TÁBLÁZAT).....	139
8. MELLÉKLET (FOLYAMATÁBRA) .....	140
9. MELLÉKLET (HOMOGENITÁSVIZSGÁLAT).....	141
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	142

## RÖVIDÍTÉSEK

Rövidítés	Eredeti (brit) angol összetétel	Magyar megfelelő
2-D IEF	2-Dimensional Isoelectric Focusing	2 dimenziós izoelektromos fókuszálás
AAS	Atomic Absorption Spectrometry	atomabszorpciós spektrometria
AFS	Atomic Fluorescence Spectrometry	atomfluoreszcens spektrometria
ASE	Accelerated Solvent Extraction	gyorsított oldószeres extrakció
BCR	Bureau Communautaire de Référence	
CRM (SRM)	Certified (Standard) Reference Material	hiteles anyagminta
CV	Coefficient of Variation	relatív szórás
C(Z)E	Capillary (Zone) Electrophoresis	kapilláris (zóna) elektroforézis
ESI	Electrospray Ionisation	elektroporlasztásos ionizáció
ETV	Electrothermal Vaporisation	elektrotermikus elpárolgatás
HG	Hydride Generation	hidridfejlesztés
HHPN	Hydraulic High Pressure Nebulization	nagy hidraulikus nyomású porlasztó
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
ICP	Inductively Coupled Plasma	induktív csatolású plazma
INAA	Instrumental Neutron Activation Analysis	műszeres neutronaktivációs analízis
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	
JRC	Joint Research Centre	
LA	Laser Ablation	lézeres elpárolgatás
LD	Lethal Dose	halálos dózis
(L)RM	(Laboratory) Reference Material	(laboratóriumi) anyagminta, referenciaanyag
MAE	Microwave Assisted Extraction	mikrohullámmal támogatott extrakció
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation	lézeres mátrixdeszorpción alapuló ionizáció
MS	Mass Spectrometry	tömegspektrometria
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	mágneses magrezonancia
OES	Optical Emission Spectrometry	optikai emissziós spektrometria
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	poliakrilamid gélelektroforézis
PLE	Pressurised Liquid Extraction	nagynyomású folyadék extrakció
PMSF	Phenylmethanesulphonyl Fluoride	fenil-metil-szulfonil fluorid
PTFE	Polytetrafluoroethylene	politetrafluor-etilén
RP	Reversed Phase	fordított fázisú
RSD	Relative Standard Deviation	relatív szórás
RSM	Response Surface Method	Felület-válasz módszer
SEC	Size Exclusion Chromatography	méretkizárásos kromatográfia
SEP(T)	Sequential Extraction Procedure (Technique)	szekvenciális extrakciós eljárás (módszer)
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate	Na-dodecil-szulfát
TCA	Trichloroacetic acid	triklór-ecetsav
TFA	Trifluoroacetic acid	trifluor-ecetsav
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxide	tetrametil-ammónium hidroxid
TOF	Time of Flight	repülési idő
TRIS-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethane HCl	Tris(hidroximetil)aminometán-HCl
UV	Ultra-violet	ultraviola (tartomány)

## 1. BEVEZETÉS

### 1.1. A MÓDOSULATANALITIKA LÉTREJÖTTÉNEK OKAI ÉS FEJLŐDÉSE A KEZDETEKTŐL NAPJAINKIG

Minamata-öböl, 1956 májusa. Négy gyári munkás agykárosodásból fakadó panaszokkal kérte felvételét a helyi Kunamoto Egyetemi Kórházba, ahol az orvosok tanácstalanul álltak a tünetek előtt. Mivel a helyi lakosok egyre növekvő számban jelentkeztek hasonló kórképpel, eleinte fertőző betegségekre gyanakodtak, melynek a „Minamata-betegség” megnevezést adták. Három és fél évnek kellett eltelnie, mire a valódi ok felszínre került: egy közeli, acetaldehidet és vinil-kloridot gyártó cég metil-higanyt is tartalmazó szennyvizét tisztítás nélkül engedte az öbölbe – több mint 40 éven keresztül. A sekély tengervízbe került, közel 150 tonna metil-higany feldúsult a táplálékláncban, s mivel az annak végén álló, a helyiek fő táplálékát adó halak károsodása nem volt észrevehető, a halászatból származó élelmiszerek sem keltettek gyanút az emberekben. A metil-higany a szerves higannyal ellentétben sokkal nehezebben ürül ki az emberi szervezetből, így az utóbbihoz képest jóval kisebb mennyiségben is végzetesnek bizonyult: a vér-agy gáton (és a méhlepényen) átlépve a felnőttekben agykárosodást, a magzatokban, a csecsemőkben és a gyermekekben fejlődési rendellenességeket és agyvérzést váltott ki – sok száz ember halálát okozva. A halászatot csak 1965-ben állították le; és bár az üzemnek megtiltották, hogy a metil-higany tartalmú szennyvizét az öbölbe engedje, szerves higannyal továbbra is szennyezte a térséget – arra ugyanis a tiltás nem vonatkozott, egészen 1968-ig. Akkor ugyanis még nem tudták, hogy a biometilációs (=biológiai szervezetek által végrehajtott metilezési) folyamatok révén a szerves higany jelentős részéből is metil-higany képződött [GRAEME 1998].

A higany esetében mutatkozott meg először, hogy ugyanazon elem eltérő oxidációs állapotú vagy eltérő ligandummal rendelkező formái akár végletekig különböző módon viselkednek az élő szervezetben. Egyidőben a higannyal, a króm élettani kutatásainak eredményei talán még nagyobb szenzációt keltettek a tudományos berkekben, hiszen a 6 vegyértékű formájának kiemelkedően rákkeltő jellege miatt toxikusnak tartott elem 3 vegyértékű állapotáról 1959-ben derítették ki, hogy fontos szerepet játszhat a glükózanyagcsere szabályozásában [SCHWARZ 1959]. A sort az arzén folytatta: 1977-ben EDMONDS és FRANCESCONI kutatópárosnak sikerült egy rákféléből izolálni az arzeno-betaint, az első olyan szerves arzénvegyületet, melynek bizonyítottan nincs toxikus hatása, s amely feloldotta a tengeri eredetű élelmiszerek arzéntartalmát és ennek ellenére veszélytelen fogyasztásuk között feszülő ellentmondást. Csupán 6 évet kellett várni az újabb – ez esetben negatív – példára: az elemi állapotban és szerves sóiban veszélytelennek számító ón hajófestékhez kevert tributil-származéka a célszervezetek közé nem tartozó élőlényeknél (pl. osztriga) genotoxikusnak bizonyult [WALDOCK 1983]. Végül, de nem utolsósorban a szelént és a vasat kell megemlítenünk, amelyek az eddig ismertetett, koncentrációtól részben független, „toxikus-létfonosságú” /króm(VI) vs. króm(III)/, „toxikus-valószínűleg nem toxikus” /általában az arzén vs. arzeno-betain; szerves ón-származék vs. szerves ón/ ill. „kiemelten toxikus-kevésbé toxikus” /metil-higany vs. szerves higany/ minőségi megközelítéseket új elemmel ötvözték: a koncentrációtól kiemeltebben függő,

„biológiailag jobban elérhető és/vagy biológiailag jobban hasznosuló és/vagy járulékosan jó/rossz hatást mutató/nem mutató” tulajdonságok megállapításával.

Az előző példák egyértelműen jelezték, hogy egy adott elem összes koncentrációjának megismerése már nem nyújt elegendő információt a vizsgált mintáról, lett légyen szó akár élelmiszerről, talajmintáról vagy öntözővízről – bármiről, amelyben a kérdéses elemnek egy vagy több, valamilyen szempontból kritikus kémiai-fizikai-élettani jellemzővel rendelkező formája fordulhat elő. Kialakult egy új, több tudományágat érintő szakterület, mely az analitikai-környezeti-élelmiszer-klinikai kémia, a biokémia és az élettan határmezsgyéjén helyezkedik el: a módosulatanalitika („speciation analysis”). A sok közös terület és a részbeni átfedések miatt egy ideig ugyanakkor nem volt egészen világos az új, külön tudományág létének jogosultsága, és helyzetének tisztázásához szükséges nevezéktani definíciók is hiányoztak még. Végül a IUPAC 2000-ben végre közzétette a pontos megnevezéseket, amelyeket konkrét példákkal látott el a lehető legpontosabb értelmezés végett [TEMPLETON 2000]. A definíciók szerint „egy elem kémiai módosulata („chemical species”) az elem egy adott formája, amelyet izotópösszetétele, vagy elektron- / oxidációs állapota, és/vagy komplex vagy molekuláris szerkezete határoz meg”; a módosulatanalitika pedig „azon analitikai tevékenységek összessége, melyek egy adott mintában lévő, egy vagy több egyedi kémiai módosulat minőségi és/vagy mennyiségi meghatározására irányulnak”. Meghatározásra került a korábban kellően meg nem különböztetett „műveleti módosulatanalitika” is, melyet a „frakcionálás” kifejezéssel láttak el véglegesen: „a frakcionálás az a művelet, melynek során egy adott mintában lévő, meghatározandó komponens vagy komponensek csoportját fizikai (pl. méret, oldhatóság) vagy kémiai (pl. kötések, reakcióképesség) jellemzők alapján osztályokba sorolunk”. A két szakterület így egyértelműen szétvált, bár – mint például az arzén módosulatanalitikai ismertetésénél látni fogjuk – gyakorlati okokból néhol együtt alkalmazzuk őket.

A kezdetben egymástól elszigetelten fejlődő, elemenként tárgyalt módosulatanalitika mára egységes egészévé vált és fontosságát mi sem igazolja jobban annál a ténynél, hogy az Európai Közösség 1998-ban külön tematikus hálózatot hozott létre „Speciation 21” névvel a legkiválóbb 21 nyugat-európai labor részvételével [CORNELIS 2000]. A hálózat abból a célból jött létre, hogy szakmai tanácsokkal segítse az élelmiszer-tudományi, környezetvédelmi és (munka)egészségügyi területen működő, döntéshozó szerveket a legújabb ismereteknek megfelelő szabályozások és határértékek megállapításánál. A korábban említett, Hg-Cr-As-Sn-Se-Fe elemek mellé időközben felzárkóztak a platinafémek (Pd, Pt), a nikkell és az ólom is, tovább bővítve a módosulatanalitika célterületét.

A módosulatanalitika felbecsülhetetlen értékű új ismeretanyaggal járult hozzá ahhoz, hogy munkakörülményeink, élelmiszereink, gyógyszereink biztonságosabbak legyenek, hogy környezetünk védelmét korszerűbb tudományos háttérrel biztosíthassuk és megérthessünk számos olyan biokémiai folyamatot, melyek szervezetünk működésében káros vagy épp ellenkezőleg, hasznos élettani hatást válthatnak ki. A következőkben ezen kutatások két jellegzetes szereplőjének, a szelénnek és az arzénnek módosulatanalitikai mintaelőkészítési eljárásainak ismertetésére kerül sor, valódi minták elemzésének tükrében – köztük egy olyan



mintánál is, amely remélhetőleg az első, természetes eredetű Se-módosulatanalitikai referenciaanyagként fog elterjedni.

## 1.2. CÉLKITŰZÉSEIM

A Se- és As-módosulatanalitika olyannyira fiatal tudományágnak számít, hogy egyszerre több, kiforratlanságából eredő „Achilles-sarokkal” jellemezhető; doktorandusztársaimmal együtt mindhármunknak jutott egy-egy: IPOLYI [2003] (módosulatanalitikai minőségbiztosítás) és STEFÁNKA [2003a] (módosulatanalitikai mintabeviteli technikák) mellett én a szinte minden mérési folyamatot megelőző mintaelőkészítés területén kutatva vittem végbe a PhD munkámhoz illeszkedő vizsgálataimat.

1999-ben, doktoranduszi tevékenységem kezdetén – már a módosulatanalitikai mintaelőkészítés berkein belül – világossá vált, hogy mely alfejezetekben lesz érdemes elmerülni, és a kezdeti kutatások az időközben csatlakozó módosulatanalitikai feladatokkal együtt csiszolódtak össze a következő három kérdéskörbe, melyek átszótték négy éves munkámat, és ebben az értekezésben teljesebben ki:

- milyen módon lehet fejleszteni a Se- és As-módosulatanalitikai mintaelőkészítést az enzimes módszerek kiterjesztésével, ill. bír-e általános létjogosultsággal az enzimek használata ezen a területen?
- lehet-e általános, könnyen követhető és viszonylag egyszerű „receptet” nyújtani a szerves eredetű, Se- és As-tartalmú minták módosulatanalitikai mintaelőkészítéséhez?
- elő lehet-e állítani természetes vagy mesterséges eredetű módosulatanalitikai referenciaanyagot a rendelkezésre álló felszereltséggel?

## 1.3. NEVEZÉKTANI ÉS FOGALMAZÁSTECHNIKAI MEGJEGYZÉSEK

Mielőtt sor kerülne az értekezés érdemi részére, célszerű kitérni a nevezéktan kérdésére. A fejlődő tudományterületek általános problémája, hogy a szaknyelv csak lassan tud átszűrődni a nemzeti szakmai szókincsbe, és meglehetősen hosszú átmeneti időszak szükséges a fogalmak letisztázódásához. Nincs ez másképp a módosulatanalitika esetében sem. Már maga a „módosulat” szó is sokszor képezi vita tárgyát, mivel az eredeti angol kifejezésből származó „speciesz” is meglehetősen elterjedtnek számít. A nevezéktani feladatok megoldásával foglalkozó bizottságok hivatalos álláspontjának hiányában egyéni döntések szolgálnak alapul ahhoz, hogy ki, melyik kifejezéscsaládot részesíti előnyben. Személy szerint, ebben a konkrét példában a „módosulat”-család mellett törtem lándzsát, számos okból kifolyólag: egyrészt a speciesz szó már korábban elfoglalta helyét a természettudományok rendszertani szegmensében, a különböző élőlények és vírusok azonosításánál, másrészt a módosulat szó magyar kifejezésnek számít, honosítási „erőszak” nélkül.

Azonban nem minden esetben nyílik erre mód. Az angol „spiking” és a „to spike sg” még nem rendelkezik magyar megfelelővel. Ebből kifolyólag először célszerű megmagyarázni őket:

1. „spiking”: az a tevékenység, amely során a vizsgálandó minta ismert mennyiségéhez, még a mintaelőkészítés előtt, a mennyiségi és/vagy minőségi elemzés tárgyát képező

módosulatokat standard vegyületek formájában, ismert mennyiségben hozzáadjuk. Amennyiben az adott módosulatból standard vegyület nem áll rendelkezésre, akkor a „spiking” során a módosulat bármely más, a mérőrendszer kalibrálására használt formáját kell használni. A „spiking” során adagolt módosulatok nem feltétlenül fordulnak elő eredetileg is a mintában. A művelet során törekedni kell arra, hogy a hozzáadott módosulatok lehetőleg azonos eloszlással, azonos kötési viszonyok közé kerüljenek a mintában eredetileg is előforduló módosulatokkal. A hozzáadás során biztosítani kell az adagolt módosulat(ok) (a) homogén eloszlását a mintán belül, így a művelet többnyire a minta és a standard vegyületek feloldásával, az egyensúlyi állapot eléréséig keveréssel/rázással történő homogenizálásával, majd az alkalmazott oldószer eltávolításával jár együtt; (b) átalakulás nélküli kezelését, tehát pl. az oxidáció elkerülését; így a folyamatot célszerű inert gázok (Ar, N<sub>2</sub>) jelenlétében végezni. A „spiking” nem feltétlenül biztosítja – olykor egyébként lehetetlen is lenne – az eredeti és a hozzáadagolt módosulatok mintaelőkészítés / mérés során tanúsítandó azonos viselkedését; szerepe gyakran arra korlátozódik, hogy megfigyelhetővé / tanulmányozhatóvá tegye a mintaelőkészítési módszerek módosulatokra gyakorolt hatását a mintamátrixban. Mintaelőkészítést nem igénylő, folyékony vagy légnemű halmazállapotú minták esetén a „spiking” megegyezik a standard addícióval.

2. „to spike sg”: a „spiking” művelete során a mintához adagolni a kiválasztott, elemzendő módosulat(ok) standard vegyületeit.

Számos kifejezeshonosítási kísérlet is lezajlott az utóbbi időben, amelyek pl. a „szilárd mintás addíció” használatát részesítették előnyben. Ez utóbbi azonban eredendően téves, mivel a „spiking” nem feltétlenül jelenti szilárd minta meglétét. A másik, tanszékünk által javasolt szó az „adalékolás”; ezzel a formával elkerülhetővé válik a (standard) addícióval történő, akár véltlen összekeverés, és maga a szó is valódi magyar kifejezés. Bár nem tökéletes, hiszen az „adalék” *többnyire* olyan vegyületet / anyagot jelent, amely nem fordul elő abban a dologban, amelyhez keverjük, míg a „spiking” során *általában* a mintában is megtalálható módosulatokat adagolunk; mindenesetre a dőlt betűvel szedett szavak átfedése elegendő teret nyújt ahhoz, hogy a szót ne vessük el. Értekezésemben – doktorandusztársaimhoz hasonlóan – az „adalékolás” kifejezést fogom használni.

Végül az igék egyes és többes számáról kell beszélnem. A mintaelőkészítés jellegzetesen olyan tevékenység, amely önmagában nem létezhet: míg pl. az elválasztástechnikai fejlesztéseket akár valódi minta nélkül, csupán standard vegyületekkel is el lehet végezni, addig a mintaelőkészítést mindig valamilyen – módosulatanalitikai vagy ún. hagyományos (lásd később) – mérés követi. Doktoranduszi munkám során a méréseket szinte minden esetben mások végezték, így az egyes szám első személy folytonos alkalmazása tisztességtelen eljárás lenne. Ebből kifolyólag az egyes szám első személy, a szenvedő szerkezet, az általános alany és a többes szám első személy felváltva, de következetesen fordul elő értekezésemben – remélem olyan módon, hogy kellő mértékben érezhetővé tegyem a legutóbbi mögött rejtőző konzulensem, doktorandusztársaim, kollégáim, diákjaim és segítőim pótolhatatlan munkáját.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A SZELÉN ÉS AZ ARZÉN MÓDOSULATANALITIKAI TÖRTÉNELME

#### **2.1.1. A szelénkutatás és a módosulatanalitika összekapcsolódása**

Csupán a tudósokat oly gyakran segítő szerencsés véletlennek köszönhető, hogy a 70-es évek végén ugyan már létfontosságúnak tartott, de a fő kutatási irányvonalaktól távol eső, élettani és analitikai szelénvizsgálatok újra lendületet vehessenek és a mai napig az élen maradjanak. Kína Keshan nevű tartományában felütötte a fejét egy furcsa betegség, mely szívizomgyengüléshez és halálhoz vezetett a tartomány lakosai között. A helyszínre érkező tudósok sok egyéb vizsgálat elvégzése mellett a helyiek táplálékát is elemzés alá vették, és úgy találták, hogy a betegség által sújtott területen élők tápláléka az átlagosnál jóval kevesebb szelént tartalmaz. A létező legegyszerűbb és legolcsóbb szelénvegyülettel, nátrium-szelenittel egészítették ki a lakosok étrendjét, és a rejtélyes betegség visszavonult [CHEN 1980]. Csak évtizedekkel később derült ki, hogy a lakosok panaszait nem közvetlenül a szelénhiány váltotta ki, hanem egy különleges kórokozó, a Cocksackie-vírus fertőzése; ez a vírustörzs azok közé tartozik, melyek sejten belüli reprodukcióját a szelén szelektíven gátolja [LEVANDER 1997]. A vírus megjelenése és Keshan tartomány szelénben szegény termőföldjei együttesen járultak hozzá ahhoz, hogy az eset fordulópontot jelenthessen a tudománytörténet és a szelénkutatás számára.

Mára a szelén egyike lett a leginkább tanulmányozott mikroelemeknek. 1957-ben SCHWARZ és FOLTZ közleménye volt az első, mely a májműködés területén létfontosságúnak kiáltotta ki ezt az elemet, azóta pedig számos élettani folyamatban bizonyították szerepét. Alkotója a 21. aminosavnak, a szelenociszteinnak (SeCys), mely valóban nem valamely meglévő aminosav utólagos módosításával jön létre, hanem – részben – saját kódonnal és tRNS-sel is bír [STADTMAN 1996]. A SeCys szabályozottan épül be egy sor enzimbe, amelyek katalitikus folyamataikhoz ez az aminosav elengedhetetlen: cseréje pl. a kéntartalmú ciszteinnel több nagyságrendnyi aktivitáscsökkenéshez vezet. Az emberi jodotironin-dejodináz a jód anyagcseréjében, a glutation-peroxidázok egész családja és a tioredoxin-reduktáz a sejtek oxidatív stressz elleni védelmében rendelkezik rákellenes hatással [SCHRAUZER 2000]. Ezekon kívül sikerült kimutatni SeCys-t tartalmazó, tehát vélhetően funkcionális, de még nem tisztázott feladattal rendelkező szeléntartalmú fehérjéket (az eddigiekben bemutatottakkal együtt összesen több mint 30 félé) pl. a mitokondriumokban, a prosztatában és a herékben is [BEHNE 1998]; ez utóbbi két előfordulási hely összecseng azon megfigyeléssel, miszerint a nem kielégítő szelénbevitel ronthatja a férfiak nemzőképességét [REILLY 1998]. Közvetlen vagy közvetett módon, de a szelénhiány többtucatnyi betegség kialakulásában vagy kórképének súlyosbodásában játszhat szerepet, mint például a felnőttkori cukorbetegség, szürkehályog, cisztás fibrózis, agyérkatasztrófa vagy vastagbél-fekélyesedés [NAVARRO-ALARCÓN 2000].

Azonban tévedés lenne azt vélni, hogy a korábbi, a szelént toxikus tulajdonsággal felruházó kísérletek tévedésen alapultak volna. A szelén a legszűkebb toleranciatartománnyal jellemezhető mikroelem: az ajánlott napi bevitel (kb. 70-100  $\mu\text{g}$   $\text{fő}^{-1}$   $\text{nap}^{-1}$ ) 3-4-szeresét meghaladó fogyasztás

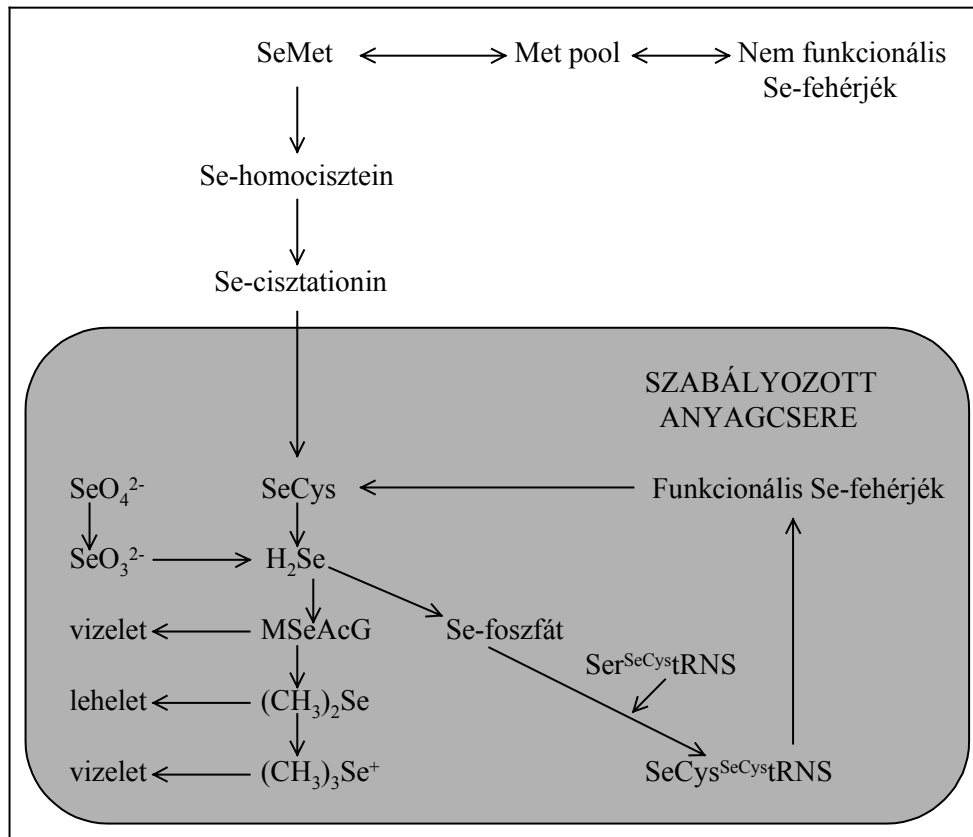
esetén először gyengébb, majd később rendkívül erőteljes mérgezési tünetek jelennek meg. Krónikus mérgezési jegyek közt a bőr-, szaruhártya- és körömváltozás, hajhullás, gyomor- és bélműködés zavara, fogazat romlása, fáradtság és szédülés említhető meg; akut mérgezés esetén a szervezetbe került szelén mennyiségétől függően, 5-10 mg testsúlykg<sup>-1</sup>-től kezdődően néhány órán belül beáll a halál [OLSON 1986].

A szelén a következő alapvető kémiai tulajdonságokkal rendelkezik: rendszáma 34, relatív atomtömege 78,96 g. Hat stabilis izotópja ismert, a leggyakoribb a <sup>80</sup>Se-izotóp. Többféle oxidációs számmal fordul elő, melyek rendre: -II, 0, +IV és +VI, de vegyületei a +IV-es oxidációs állapotban a legstabilabbak. A szelén megtalálható a talajban, a vizekben és a levegőben is; talajokban 0,1-0,2 µg g<sup>-1</sup> szelénkoncentráció a gyakori, míg a levegőben, városi környezetben 0,1-10 ng m<sup>-3</sup> található általában. A felszíni vizekben 0,06-400 µg l<sup>-1</sup> mennyiségben mutatták ki, bár oldódásának mértékét a víz pH-ja nagyban befolyásolja: kisebb pH esetén a Se koncentrációja megnő. A szelénterhelés forrásai között említhető a vulkáni tevékenység, valamint az ipar, közlekedés, tüzelés és a mezőgazdaság.

A szelén élettani tulajdonságait nem lehet anélkül bemutatni, hogy ne emelnénk ki: a 6. főcsoport tagjaként a kénnel analóg módon viselkedik és gyakorlatilag minden kéntartalmú molekulának létezik szelént hordozó, analóg vegyülete. A tömeghatás alapján a kén és a szelén egymással versengve szerepelhet számos biokémiai reakcióban, a szulfát helyébe szelenát léphet és fordítva. Így nem meglepő, hogy a 2. Melléklet táblázata által bemutatott szelénmódosulatokban szinte a teljes kénanyagcsere analóg molekuláris eszköztárát felfedezhetjük, a szervetlen szelenáttól kezdve a szelenocisztationinig. Az emlősök szervezete két folyamat esetén rendelkezik szelénre specifikus, szabályozott anyagcsereúttal: egyrészt a SeCys és az intermedier szerepet játszó szelenofoszfát szintézisének, másrészt a szelén kiválasztásának, amely finoman hangolt egyensúlyi folyamatokkal jellemezhető [KOBAYASHI 2002]. Ez utóbbi valószínűleg egyenes ági következménye a szervezet rendkívül kis szelénraktározó képességének, mivel a „szelenoprotein P” nevű, 10 SeCys-t hordozó fehérje az egyetlen, amely ha kis mértékben is, de szelént szállítani és tárolni képes [SUZUKI 1999]. Mihelyst a bejutó szelén mennyisége meghaladja a maximálisan szükséges (100-200 µg fő<sup>-1</sup> nap<sup>-1</sup>) értéket, a túlzott bevitel mértékének függvényében más és más típusú, más és más szabályozás révén kialakított szeléntartalmú molekula segít kiüríteni a felesleget (1. és 2. ábra), először a vizelet, majd párologtatás/verejtékezés révén.

A 2. ábrával kapcsolatban érdemes néhány dolgot kiemelni. Egyrészt világosan tetten érhető a szelén felhasználásának/beépülésének szabályozási módja: még az egyértelműen funkcionális molekulák között is fennáll egy fontossági sorrend, mely némelyiküket – így a reprodukcióhoz szükséges, még pontosan nem ismert szelenoproteineket is – előnyben részesíti a csupán „általánosan” létfontosságú Se-enzimekhez képest. Másrészt ezen vegyületek feltöltése után meglehetősen szűk tartományra korlátozódik a még egészségesnek tekinthető szelénbevitel, és már azon belül is funkció nélküli SeMet beépülés zajlik le. Ez utóbbi megítélése nem egyértelmű: a SeMet-t tartalmazó fehérjék térszerkezete kissé eltér a genetikailag kódoltan metionint hordozó típusoktól, tehát elvileg az eredeti fehérjefunkció – nem feltétlenül jó irányba

történő – változása következhet be. Ugyanakkor jelentős szeléntároló-kapacitás híján a szervezet ebben a formában, közvetett módon, a fehérjék körforgási folyamatain keresztül képessé válhat kis mennyiségű, szelenoprotein P-től független szelén raktározására (1. és 2. ábra).



1. Ábra. Az emberi szervezet Se-anyagcsere folyamatai [ŁOBIŃSKI 2000 és KOBAYASHI 2002 alapján].

Beépülő/ kiválasztódó főbb szelén- módosulat	SeCys	SeMet	MSe- AcG	TMSe <sup>+</sup>	DMSe
Jellemző anyagcsere- folyamatok	Létfonosságú Se-fehérjék szintézise (jodotironin- dehidrogenáz, mitokondriális és reprodukciós szervek-szövetek Se- fehérjéi, szelenoprotein-P)	Egyéb funkcionális Se-fehérjék szintézise (glutathion- peroxidáz család)	Nem funkcio- nális Se- fehérjék szintézise	Szeléntartalmú molekulák szintézise és ürítése a vizeleten keresztül	Szeléntartal- mú molekula szintézise és ürítése a verejtéken és légzésen keresztül
Anyagcsere jellege	BEÉPÜLÉS/ "FELHALMOZÁS"			KIÜRÍTÉS	
Szelén- bevitel, µg nap <sup>-1</sup> fő <sup>-1</sup>	0-70	70-450 optimum: 100-200 között		>450	

2. Ábra. Az emberi szervezet által szintetizált főbb szelénmódosulatok és szerepük a Se-anyagcsereben [STADTMAN 1996, REILLY 1998, BEHNE 1998 és KOBAYASHI 2002 alapján].

Éles határvonalakról, rögzített beviteli mennyiségekről a különböző szelénanyagcsere-szakaszok esetében nem lehet beszélni: az optimális tartomány felső régiójában már megindul a szelén kiválasztása a vizeleten keresztül, először a szervezetet legkevésbé terhelő szelenocukrok, majd a kissé mérgezőbb, de könnyebben szintetizálható  $\text{TMSe}^+$  formájában. A fokhagymaszagú  $\text{DMSe}$  lehelettel és verejtékkel történő eltávolítása már súlyos, akut mérgezésre utal.

Lassan elérkezünk ahhoz a ponthoz, ahol érthetővé és indokoltá válik a szelén módosulatanalitika létjogosultsága. Itt szó sincs az arzén esetén később bemutatásra kerülő, rendkívüli módon különböző  $\text{LD}_{50}$  értékkel jellemzett módosulatok által előidézett bizonytalanságról, miszerint egy adott (összes) As-tartalmú minta módosulateloszlása toxikus vagy egyáltalán nem mérgező módosulatoakat takar-e. Az élő szervezetekben kimutatott, nem illékony szelénmódosulatok – egyébként nagyon kicsi, 3-4 mg körüli –  $\text{LD}_{50}$  értékei közötti eltérés kisebb két nagyságrendnél, és a leggyakrabban vizsgált  $\text{Se(IV)}$ ,  $\text{Se(VI)}$ ,  $\text{SeMet}$  és  $\text{SeCys}$  esetén az átlagos eltérés mértéke kisebb 20%-nál [OLSON 1986]. A valódi különbség a módosulatok biológiai hozzáférhetőségében, hasznosulásában, felhalmozódásában, és a szervezetben kiváltott esetleges oxidatív terhelésben ölt testet. Ha a tulajdonságok ezen körét a már ismertetett, meglehetősen szűk Se-tolerancia (és egyben a szükséges szelénbeviteli mennyiség) tükrében tekintjük, egyértelműen körvonalazódnak látszanak azok az alkalmazási területek, melyeken a szelén módosulatanalitika teret nyert ill. amelyekre kiterjesztése várható:

(a) A szelén – szelénhiányos táplálkozás esetén – minden módosulata hasznos és adott esetben életmentő, mivel létfontosságú enzimek alkotórésze. Az éppen kielégítő szintet elérő ellátottságtól kezdve azonban jelentős különbség bontakozik ki az egyes módosulatok között, melyek a szelén járulékos jótékony hatásait csökkenthetik ill. teljesen meg is szüntethetik. A legfőbb eltérést a szelén rákellenes hatásával kapcsolatban mutatták ki a kutatások. Jelenlegi ismereteink alapján úgy tűnik, hogy a Se-metilszelenocisztein és a  $\gamma$ -glutamil-Se-metilszelenocisztein szignifikánsan hatékonyabb rákellenes vegyületnek bizonyultak bármely más szelénmódosulathoz képest, *in vivo* vizsgálatok esetében is [WHANGER 2000, BLOCK 2001]. Az egyik leggyakrabban vizsgált szelénmódosulat, a SeMet szelénpótlásra alkalmas ugyan, de ez az aminosav a metionin útját analóg követve először az aminosavpoolba, majd ezen keresztül a fehérjék körforgási folyamataiba jut; egyrészt tehát szöveti szeléndúsulás jöhet létre, melynek megítélése mai ismereteink alapján a „nemkívánatos” kategóriába tartozik, másrészt járulékos rákellenes hatás nem érvényesül [BESSER 1993, KOTREBAI 1999a]. Szervetlen  $\text{Se(IV)}$  sót tartalmazó készítmények esetén szöveti felhalmozódás nem alakul ki, azonban ennek a szelénmódosulathoz képest a felvételénél reaktív oxigénradikálokat tartalmazó molekulák keletkezhetnek, amely a szelénit a többi módosulathoz képest toxikusabbá teszi [KOBAYASHI 2001]. A szelénát bevitel nem vált ki a másik szervetlen módosulathoz hasonló negatív hatásokat, azonban biológiai felvehetősége csupán 25%-os a  $\text{Se(IV)}$ -hez képest, és egy része változatlan formában azonnal kiürül a vizeleten keresztül [GÓMEZ 1998, KOBAYASHI 2001]. Mindezek után világossá válhat, hogy ismereteink alapján képesek vagyunk túllépni a korábban kielégítőnek vélt, a táplálék összes szeléntartalom-meghatározásán valamint a csupán vélt vagy valódi határértékeken alapuló gondolkodásunkon és minőségi ugrást hajthatunk végre a

valóban optimális szelénbeviteli elvek kialakítása felé. Természetesen mindehhez elengedhetetlen a gyakran fogyasztott, jelentős szeléntartalmú élelmiszereinkben található szelénmódosulatok azonosítása és az élettani kutatások további bővítése, módosulatanalitikai ismereteink felhasználásával.

(b) A standard szelénvegyületekkel végzett kísérleteknek köszönhetően többé-kevésbé tisztában vagyunk azzal, hogy a különböző módosulatok felszívódásuk után milyen szerepet töltenek be a szervezet szelénháztartásában és egyéb folyamataiban. Ha azonban az adott szelénmódosulat nem magában, hanem valódi étel/ételkiegészítő mátrixban jut be a szervezetbe, az emberi emésztés gyakorlatilag fekete dobozként takarja el előlünk, mi is zajlik le az összességében több mint száz különböző, emésztésben szerepet játszó enzim és egyéb segédvegyület (epesavak, sósav, stb.) közreműködésével, az emésztőrendszer egymást követő, térben és időben elválasztott szakaszaiban. Meghatározhatjuk és megismerhetjük a „bemeneti paramétereket”, tehát az elfogyasztandó étel/ételkiegészítő módosulatanalitikai összetevőit – feltéve, hogy sikerül nagy kinyerési és azonosítási hatásfokú mintaelőkészítési módszert fejlesztenünk; vizsgálhatjuk a „kimeneti paramétereket” – a főleg vizelettel eltávozó szelén mennyiségét és módosulatait, a vörösvérsejtek szeléntartalmának változását és megmérhetjük a legfőbb, szelénhasznosulás mennyiségi meghatározására szolgáló értéket, a glutation-peroxidáz aktivitását. A teljes kép azonban annyira összetett, hogy a mai napig nem tudjuk megmagyarázni a mérési eredmények által szolgáltatott – valószínűleg csak látszólagos – ellentmondásokat. Minden bizonnyal a vizsgálatban részt vevő kísérleti alanyok szervezetének egyedi tulajdonságai, a teljes mértékben sosem azonos kísérleti körülmények és az éppen tanulmányozott vagy együttesen fogyasztott élelmiszerek egyéb komponensei (pl. aszkorbinsav, mint a szerves szelénmódosulatokat elemi – tehát nem felszívódó – formává redukáló vegyület) állnak az eltérések hátterében [FAIRWEATHER-TAIT 1999]. Átlagosnál nagyobb szeléntartalmuknak köszönhetően a tengeri halakat például ideális szelénpótló étel/ételkiegészítőnek vélnék, és erre utal HAGMAR et al. [1998] lettországi táplálkozás-élettani vizsgálata – ha nem igazolná ennek pontosan az ellenkezőjét is kísérletek egész sora [THORNGREN 1987, MELTZER 1993, HUANG 1995]. Szelénnel dúsított csiperkegomba *in vivo* patkánykísérletben nagyobb rákellenes hatást biztosított a szelént nem tartalmazó gomba fogyasztásához képest [SPOLAR 1999], ugyanakkor a gombák szeléntartalmának biológiai hozzáférhetősége nagyon kicsinek adódott CHANSLER et al. [1986] vizsgálata alapján. A felsorolt kísérletek során nem, vagy csak korlátozott mértékben végezték el az előzetes módosulatanalitikai elemzéseket, rávilágítva arra a hiányra, amely a valódi, hétköznapi élelmiszerek módosulatanalitikai elemzésénél tapasztalható. Napjaink egyik legfőbb szelén módosulatanalitikai kihívása ezeknek a komplex mátrixszal jellemezhető mintáknak a mintaelőkészítése és mérése.

(c) A szelén létfontosságú mikroelem volta csak az 1970-es évek végére szűrődött le az átlag fogyasztó szintjére, amikor számos ország – köztük az Egyesült Királyság, Új-Zéland és Finnország – vezetése szembesült a ténnyel: a lakosság átlagos szelénbevitelével jóval elmarad az optimálisnak tekintett észak-amerikai szinttől és mindez súlyos egészségügyi kockázatot rejt magában [REILLY 1998]. A válaszreakció országoként más és más formát öltött: míg

Finnországban és Új-Zéland szelénhiányos vidékein bevezették a szeléntartalmú műtrágyák használatát, addig az Egyesült Királyságban sajtóközlemények útján biztatták a lakosságot táplálékkiegészítők és a közismerten nagy szeléntartalmú brazil dió fogyasztására. Részben ennek köszönhetően a szelénrel dúsított élesztőtabletták, fokhagymakivonatok és funkcionális élelmiszerek, mint pl. a szelénés „szupertójás” [SURAI 2001] soha nem látott mértékben árasztotta el a boltok pultjait. Ezen készítmények egy része úgy hirdette – és hirdeti a mai napig – magát, miszerint „szerves kötésben” lévő szelént tartalmaznak, a szeleno-aminosavak szerves szelénmódosulatokhoz viszonyított, nagyobb biológiai elérhetőségére utalva. Számos tanulmány bizonyította időközben, hogy a gyártók közül jó páran sajnos csupán szerves Se-sók bekeverésével oldották meg a feltüntetett szeléntartalom biztosítását. Nem csupán a fogyasztó megtévesztéséről van szó: nem világos ugyanis, hogy a szerves Se-sók élettanilag kedvezőbb vagy kedvezőtlenebb hatásúak-e a kötött szerves módosulatokhoz képest. A témával foglalkozó közlemények szerint patkányok esetében a szelénrel dúsított élesztő fehérjében kötött SeMet tartalma jóval kevésbé terheli a szervezetet és sokkal nagyobb hatásfokkal szívódik fel a szerves Se-sókhoz vagy magának a tisztán adagolt SeMet-hoz képest [YOSHIDA 1999], míg sertések esetén részben ellentétes eredményre jutottak a kísérletek során [MAHAN 1997]. Fontos kiemelni, hogy az előző vizsgálatokat emlősökön végezték, ugyanis a SeMet halak és madarak esetében egyértelműen toxikusabb a szerves Se-sókhoz képest [FAN 2002]. Mindenesetre, amíg nem rendelkezünk elegendő információval az esetleges káros ill. kedvezőtlen hatásokról, legalább a termék által valóban hordozott módosulatok összetételét lenne érdemes tisztázni és feltüntetni a fogyasztó tényszerű tájékoztatása végett – ehhez pedig feltétlenül szükség van szelén módosulatanalitikai vizsgálatokra.

(d) A szeleno-aminosavak természetesen mind D-, mind pedig L-enantiomer formában is megtalálhatóak. Kémiai szintézis esetén racém vegyület jön létre, a két forma 50-50%-os megoszlásával; biológiai minták esetén pedig szinte kizárólag L-szeleno-aminosavakat mutattak ki. A „szinte” szó alkalmazása mögött az a megfigyelés áll, hogy 100°C körüli hőmérsékleten az élelmiszer-fehérjékben racemizáció indulhat meg, így például a szelénrel dúsított élesztő porlasztva szárítása során elvileg D-szeleno-aminosavak képződésére nyílik mód [MAN 1987]. PÉREZ MÉNDEZ et al. [2000] kutatásai igazolták, hogy mindez nem csupán elvi lehetőség: az általuk vizsgált élesztőminta SeMet-tartalmának 18%-a bizonyult D-térállásúnak. A gyógyászati készítmények egy része kémiai szintézissel előállított vegyületeket, tehát például racém SeMet-t tartalmaz [MONTES-BAYÓN 2001]. Ugyanakkor a táplálkozástudomány jelenlegi állása szerint nem rendelkezünk elég információval arról, hogy a D-szeleno-aminosavak milyen szerepet tölthetnek be az emberi táplálkozásban. Annyi már bizonyos, hogy tiszta formában az L-SeCys<sub>2</sub> szignifikánsan toxikusabb D-enantiomer párjánál [MCADAM 1987]. Nagyon valószínű, hogy a D-(szeleno-)aminosavakkal kapcsolatos ismereteink bővülése az eddigieknél is szélesebb körben vonja majd maga után a szelén módosulatanalitika enantiomerekkel foglalkozó ágának kibővülését.



### **2.1.2. Két dolog, mely elválaszthatatlan egymástól: az arzén és a módosulatanalitika**

Talán az egyetlen elem, amelynek neve nem csupán elválaszthatatlanul összeforrott a mérgezés fogalmával, hanem szinte szinonimájává is vált. „Fehér arzénként” ismert arzén-trioxid vegyülete íztelen és szagtalan megjelenése miatt a középkor és az újkor bérgyilkosainak kedvelt eszközévé vált. Albertus Magnus, a természeti és természetfeletti tudománnyal egyaránt elkötelezett domonkosrendi szerzetes 1250 körül fedezte fel és különítette el először elemi állapotában, ugyanakkor már Hippokratész művei között is fellelhető a később arzén-szulfidként azonosított vegyületet tartalmazó, fekélyek elleni kenőcs leírása [MANDAL 2002]. Íme a kettősség, amely sokáig feloldhatatlanul övezte az arzén megítélését: gyógyszerek és gyorsan ölő mérgek is tartalmazhatják, gyógyíthat és árthat egyszerre. Az ipari forradalmat követően ismét mindkét oldalra jutottak példák. A rendkívül toxikus, belélegezve akut mérgezéshez vezető arzinszarmazékok megismerése elméleti háttérül szolgált az I. világháború során bevetett harci gázok (pl. a hírhedt „Lewisite” /2-klorovinil-dikloroarzin/) kialakításához. Másrészről az Erlich által szintetizált, szintén As-tartalmú „Salvarsan” egészen a penicillin 1943-as megjelenéséig a szifilisz legfőbb gyógyszerének számított, és egyes protozoon-betegségek (trypanosomiázis) kezelésénél a mai napig alkalmazzák a „Melarsoprol” készítményt [GRAEME 1998].

Az arzén a következő alapvető kémiai tulajdonságokkal rendelkezik: rendszáma 33, atomtömege: 74,922; elektronhéj-szerkezete  $3d^{10} 4s^2 4p^3$ , oxidációs állapota -III, 0, +III, +V lehet, Pauling-féle elektronegativitása: 2,0. A természetben előforduló arzén a stabil 75-ös arzénizotópból áll, a radioaktív 72-, 74- és 76-os arzénizotópokat az orvosi diagnosztikában használják. Annak ellenére, hogy az arzén összes mennyisége a földkéregben és a tengervízben igen csekély ( $5,5 \cdot 10^{-4}$  m/m % és  $1 \cdot 10^{-4}$  m/m %), mégis meglehetősen elterjedt: a 41. elem a gyakorisági sorrendben. Körülbelül 200 ásványa ismert; kimutatható tenger- és édesvizekben ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  nagyságrendben), talajban 0,05-50  $\mu\text{g g}^{-1}$  mennyiségben (feltéve, hogy nem zajlott le mesterséges szennyezés), és rétegvizekben is; valamint állati és növényi szövetekben: a legtöbb szárazföldi élőlény általában 1 mg testsúlykg<sup>-1</sup>-nél kevesebb arzént tartalmaz, míg a tengeri szervezetekben 1-100  $\mu\text{g g}^{-1}$  közötti értékben található meg. Ez utóbbi érték különösen szembetűnő, főként ha figyelembe vesszük, hogy a tengerekkel, tengeri halászati kultúrával rendelkező országokban évente és személyenként akár 50-60 kg hal és egyéb tengeri eredetű étel is fogyasztásra kerülhet.

Az arzén élő szervezetekben megismert viselkedése részben annak tulajdonítható, hogy a periódusos rendszer 5. főcsoportjának tagja; ebből kifolyólag a nitrogén és a foszfor vegyületekkel analóg, As-tartalmú molekulákban (pl. As-betain és As-kolin) gyakran fordul elő, és bizonyos vegyületeinél ebből fakad toxicitása is. Konkrétan az arsenát a foszfáttal versenyez, így annak helyébe lépve megszakítja az oxidatív foszforilációt és gátolja az ATP szintézisét. A másik gyakori szervetlen forma, az As(III) mérgezési hatásmechanizmusa eltérő biokémiai háttérrel jellemezhető: szelektíven kötődik a szulfhidril-csoportot aktív helyen tartalmazó enzimekhez, amelyeket inaktívál, és lelassítja ill. leállítja mind a sejtlégzést, mind pedig a szénhidrát-anyagcserét.

Az arzén „bűnlajstroma” korántsem ér véget az említett két szervesen As-származék nagy mennyiségű adagolásánál fellépő, akár percek alatt halálhoz vezető kórképben. A kis mennyiségű, például ivóvízzel nap mint nap elfogyasztott néhány 100 µg As hosszú távon gyakorlatilag a teljes szervezetet károsíthatja: légzési- és keringési rendszer elemeit (tüdő, légcső, légúti nyálkahártyák, szívizom, érfalak stb.) sorvasztja; gyomor- és bőrbántalmakat vált ki, beleértve a hírhedt, fekélyesedéssel járó „feketeláb-betegséget”; károsítja a májat, a vesét; a vérképet és az idegrendszeri paramétereket (koncentrálóképesség, reflexek) rontja; fejlődési és reprodukciós zavarhoz vezet; az immunológiai rendszer leépülését váltja ki; mutagén, karcinogén, genotoxikus, teratogén; felnőttkori cukorbetegség okozója lehet és végül: több mint 200 emberi enzimet részben vagy teljesen inaktivál [MANDAL 2002]. Ha szervesen arzén kerül a szervezetbe, akkor beindul az eltávolítását szolgáló, detoxikációs folyamat, mely részben az arzén sorozatos metilezésében és vizelettel történő kiürítésében, részben pedig keratinhoz (haj, köröm) történő irreverzibilis kötésében ölthet testet.

Néhányszor 10 mg fehér arzén gyors halált okoz. Ha ezt a tényt annak az adatnak a tükrében nézzük, hogy a tengeri eredetű halak, rákok, kagylók összes arzéntartalma akár egyetlen éttermi fogásnál meghaladhatja akár a 10-20 mg-os mennyiséget is, természetesen adódik a kérdés: mi szabja meg, hogy ugyanazon As-tartalom mikor jelent élelmiszer-biztonsági kockázati tényezőt és halálos fenyegetést ill. mikor tekinthető veszélytelennek. A megoldás a korábban már sejtetett, hol „származék”, hol pedig „formák” megnevezéssel illetett, valójában a különböző arzénmódosulatokban rejlik, melyek leggyakoribb példáit a 3. Melléklet táblázata ismerteti.

A táblázatban felsorolt több tucat vegyület azokat a módosulatokat fedi le, melyeket biológiai rendszerekben azonosítottak ill. melléktermékként szabadulhatnak fel ipari folyamatok során. „Jellemző előfordulási hely” alatt azon mintatípus értendő, melyből leggyakrabban mutatták ki az adott módosulatot – természetesen nem kizárólagos esetekről van szó, hiszen pl. a tengeri élőlényekben oly gyakori AsB szárazföldi gombákban is előfordul [KUEHNELT 1997]. A gyógyszerként vagy egyéb céllal (rovarölőszer, faanyag-tartósító vegyület, háziállatoknak roborálószer) szintetizált vegyületek nem kerültek említésre, mivel felhasználásuk – és így előfordulásuk – célzott, tehát ismert és korlátozott mértékű. Az általában patkánykísérletek alapján meghatározott LD<sub>50</sub> értékek alapján három csoportot lehet kialakítani, amelyek egyben választ is adhatnak az élelmiszer-biztonsági kérdésekre:

(a) Kiemelten toxikus módosulatok – az arzinek, a szervesen As(III) - As(V), és a három vegyértékű metilezett származékok tartoznak ide. Az arzinek problémája munkaegészségügyi kérdés, kellő felügyelettel és óvintézkedéssel a mérgezés veszélyét le lehet csökkenteni. A szervesen módosulatok sajnos jellegzetes összetevői lehetnek mind a talaj- és ivóvizeknek, mind pedig a talajoknak, ebből fakadóan mennyiségi meghatározásuk olykor létfontosságú feladat. A három vegyértékű, metilezett származékokat csak 2000-ben mutatták ki először emberi vizeletben [LE 2000], és jelenlétük – ill. rendkívüli toxicitásuk (*in vitro* mérések szerint akár 386-szor mérgezőbbek az As(III)-nál [MASS 2001]) – fenekestül forgatta fel azt a korábban elfogadott magyarázatot, miszerint az arzén detoxikációs folyamata során a metilezés a szervesen módosulathoz képest kevésbé toxikus intermediereket és végtermékeket eredményez.

Ezen új ismeretek még inkább arra a következtetésre vezetnek, hogy a szerves As-módosulatok emberi szervezetbe történő bevitelét a lehető legkisebb mértékre kell csökkenteni.

(b) Átmeneti tartományt képviselnek az öt vegyértékű metilezett származékok és a négy metilcsoportot hordozó TETRA. Ugyan az MMA(V) és DMA(V) LD<sub>50</sub> értéke jóval nagyobb az első csoport módosulatainál, ám a három vegyértékű metilezett származékok felfedezése során szerepük újra értékelésre került: mivel az emberi szervezetben három vegyértékűvé redukálódhatnak, közvetve válhatnak ki mérgezési tünetegyüttest.

(c) AsB, AsC, arzenocukrok. Az első két módosulat, melyek együtt jelentős, olykor 100%-át adják a tengeri állatok As-tartalmának, gyakorlatilag nem tekinthető mérgezőnek. Amióta felfedezték [EDMONDS 1977], szinte minden tengeri állatban kimutatták már az AsB-t, és aprólékos vizsgálatok egész sorával igazolták, hogy az emberi szervezet semmilyen módon sem dolgozza fel [LARSEN 1993], így „közvetlen” (pl. nyers hal) fogyasztása egészségügyi kockázatot nem jelent. Az AsB-ből túlhevítéssel, túl nagy hőmérsékleten (>180°C) végzett sütés során kialakuló TETRA jelenléte azonban nagyobb veszéllyel jár, így a fogyasztók figyelmét mindenképpen érdemes felhívni – az egyébként semmilyen szempontból sem ajánlott – helytelen sütési szokások elkerülésére [HANAOKA 2001]. Az alacsonyabb rendű növényi szervezetekben talált arzenocukrok toxicitásáról meglehetősen keveset tudunk; vélhetőleg az AsB-hez hasonlóan nagy LD<sub>50</sub> jellemzi őket.

A módosulatok megismerése után az elmúlt években valószínűleg hosszú távon is véglegesnek tekinthető irányvonalak alakultak ki az arzén módosulatanalitika területén, melyek mind a mintákat, mind pedig az alkalmazható mintaelőkészítési módszereket keretbe foglalják:

1. Tengeri eredetű élelmiszereket nagymértékben fogyasztó országokban merült föl a kérdés, hogy a különböző tengeri állatokban (puhatestűek, rákok, halak) az arzén milyen formában van jelen, ill. ezen előfordulási formák hordoznak-e valamilyen veszélyforrást élelmiszer-biztonsági szempontból. Ma már ismert, hogy az ilyen élelmiszerek arzéntartalma főként a nem, vagy csak kevésbé toxikus AsB formájában található meg; azonban a tengervízből felvett szerves arzén detoxikálási folyamata időigényes mechanizmus, így az esetlegesen nagyobb tengeri területet érő hirtelen arzénkoncentráció-emelkedés – amely lehet mesterséges (szennyezés) vagy geológiai (vulkáni tevékenység élénkülése) okokra visszavezethető – megnövelheti az AsB-nél toxikusabb intermedierek koncentrációját.

2. Ivó-, öntöző- és talajvizek esetében geológiai oka van a szerves arzénmódosulatok előfordulásának (mivel szerves arzéntípusokkal nem kerül kapcsolatba a víztároló kőzet, így a víz szinte csak As(III)-t vagy As(V)-t tartalmazhat). Ebben az esetben tehát a módosulatanalitikai vizsgálatokat nem abból a szempontból kell elvégezni, hogy az adott víz mennyire mérgező vagy sem, hiszen élelmiszer-biztonsági szempontból elegendő információt szolgáltat ilyenkor az összes As-tartalom megállapítása. Fő cél a szerves arzénmódosulatok egymáshoz viszonyított arányának meghatározása, ugyanis az As(III) és As(V) koncentrációjának ismeretére szükség lehet a víztisztítási technológia megválasztásában (e két szerves arzénvegyület közül ugyanis az As(V) jó hatásfokkal eltávolítható a vízből

membránszűrés segítségével). Az öntözővíz arzéntartalma különösen a távol-keleti rizsültetvények veszélyeztetettségét befolyásolja.

3. A talajok biológiailag hozzáférhető arzéntartalma természetett növényeinkbe általában szervesen – tehát kiemelkedően toxikus – módosulatként épülhet be; ebből kifolyólag mind maguknak a talajoknak, mind pedig a feljavításukra szánt iszapnak és üledékeknek is célszerű elvégezni a hozzáférhető/összes arzénarány és a módosulatok eloszlásának megállapítását.

4. Valószínűleg mindinkább élénkülő figyelem kíséri majd az arzén detoxikációval kapcsolatos témakört, amely maga után vonja a testfolyadékok (vér, vizelet) további módosulatanalitikai elemzésének szükségességét.

5. Az élelmiszerek elkészítése során a módosulatokat ért behatások (hőkezelés, oxidatív körülmények, folyékony-szilárd extrakciós folyamatok gyenge savakkal /ecetsav, citromsav/ és lipofil vegyületekkel /olajok, zsírok/ készített öntetek, szószok és páclék használatánál stb.) miatti átalakulások és megoszlások vizsgálata fényt deríthet egyrészt a ma még feltáratlan, pl. az arzenocukrokkal kapcsolatos bomlási folyamatokra, másrészt az esetleg toxikusabb módosulatok migrációjára az élelmiszerben és környezetében.

A felsorolt öt témakört illetően hazánk főként az első kettőben érintett. Magyarország egyike azon kevés európai országoknak, ahol valódi gondként jelentkezik az Alföld As-tartalmú ivóvizeinek jelenléte és kezelése [VERES 1991, VARSÁNYI 1991, BÖRZSÖNYI 1992, SMEDLEY 2002], így a módosulatanalitikai vizsgálatok minden bizonnyal az eddiginél szélesebb körben válnak ismertté és kerülnek gyakorlati felhasználásra. A 100%-ban importból származó, tengeri eredetű élelmiszereink forgalomba hozatali engedélyeztetésénél pedig el kellett hagyni az egészen 2003. március 12-ig érvényes, összes As-tartalom meghatározásán alapuló vizsgálati előírásokat és határértékeket, mivel ezek elavultnak bizonyultak az egyre szélesebb körben elfogadottá vált As-módosulatanalitikai ismeretek tükrében; várhatóan a közeljövőben módosulatanalitikai módszer használatát írja majd elő az illetékes minisztérium [EGÉSZSÉGÜGYI 2003].

Végül szót kell még ejteni a magyar módosulatanalitikai nevezéktanral kapcsolatos kérdéskorról is. A teljes módosulatanalitikai témakör – elemektől függetlenül – viszonylag új tudományterületnek számít, nem is beszélve a csupán néhány éve felfedezett módosulatokról. Jellemző, hogy még az angol elnevezések sem egyeznek meg minden esetben (tipikus például szolgáljanak erre három, viszonylag új összefoglaló közlemény nevezéktani ellentmondásai: [GONG 2001, 2002] és MCSHEEHY [2003a]), így a magyarra történő átültetés részben úttörő feladatnak számít. Legfőbb gond a metilezett arzénmódosulatok különböző vegyértékű formáinál adódott. Ezekben az esetekben az angolban „arsonous”, „arsinous”, „arsinic”, „arsonic” és „arsenic” tagok egyaránt előfordulnak, sajnos olykor ugyanazon vegyületre is. A 3. Melléklet táblázatában a GONG-féle nevezéktan mellett tettem le voksomat, így külön taggal („arzinsav” és „arzonsav”) láttam el a dimetil- ill. monometil-származékokat, és „-es, -os” képzők jelzik a három vegyértékű módosulatokat.

## 2.2. MINTAELŐKÉSZÍTÉSI ELJÁRÁSOK: HAGYOMÁNYOS MÓDSZEREK – TELJES FELTÁRÁS

A teljes feltárás célja a minta szervesanyag-tartalmának tökéletes elroncsolása anélkül, hogy figyelmet szentelnénk az elem eredeti formájának megőrzésére. Ez a folyamat együtt járhat a minta eredeti módosulatanalitikai tulajdonságainak elvesztésével, de ebben az esetben mindez nem jelent hátrányt. A teljes feltárás ugyanis alapvetően a módosulatanalitikai mérések keretét adja meg, és használatát két fő ok jellemzi: (1) egyrészt a minta összes As- és/vagy Se-tartalmának ismeretében lehetőségünk lesz dönteni arról, hogy érdemes-e egyáltalán módosulatanalitikai vizsgálatokat is végrehajtanunk (figyelembe véve pl. arzén esetében az adott ország élelmiszer-biztonsággal kapcsolatos szabályozását) ill. (2) amennyiben szükséges a módosulatanalitikai megközelítés, úgy a teljes feltárással meghatározott összes As és/vagy Se mennyiség a mérések anyagmérlegének összeállításához nyújt alapvető információt.

A teljes feltárás végrehajtása során olyan módszerhez kell folyamodnunk, amely lehetőleg az összes módosulatot – szerveseket és szervetleneket egyaránt – azonos állapotba hozza. Természetesen a folyamatot úgy kell megválasztanunk és vezetnünk, hogy a végére kialakuló módosulat leginkább megfeleljen a feltárást követő mérés technika kívánalmainak. Ez a feltétel a Se és az As esetén különös hangsúlyt kap – mégpedig okkal. A gyakorlatban ugyanis a feltárással együtt járó hőmérséklet-emelést és erőteljes oxidatív környezetet illetően mind a Se, mind pedig az As rendkívül eltérő stabilitású módosulatokkal rendelkezik, amelyek igen gyakran egymás mellett is előfordulnak az adott mintában. Így azonban előfordulhat, hogy a nem kellő figyelemmel vezetett feltárás nem eredményez homogén módosulateloszlást. A mérőrendszereket általában arra a feltételezésre építve használjuk, hogy a mintában a feltárással/mintaelőkészítéssel egyféle módosulat alakul ki, és annak analitikai tisztaságú standardként is elérhető formájával kalibráljuk a mérőműszert. Ha azonban a vizsgált elemre nézve inhomogén elegy kerül mérésre, a kalibrációs görbe alapján számolt értékek nem feltétlenül tükrözik majd a valódi koncentrációkat. Mindez kiemelt jelentőségű problémát jelenthet a mai napig széles körben elterjedtnek számító, a két elem hidridképzési képességére építő HG-AAS vagy HG-AFS technikák esetében, ugyanis a Se és As módosulatok csak egy része képes hidridet fejleszteni, ráadásul különböző hatásokkal. Az ebből fakadó hibalehetőségek és azok kiküszöbölési módjai a két elemnél külön-külön kerülnek bemutatásra.

Napjainkra már elmondhatjuk, hogy a teljes feltárás területén a különböző oxi- és halogenidsavakkal végzett, megnövelt hőmérsékleten és nyomáson lejátszódó nedves roncsolások egyeduralkodóvá váltak – természetesen mindig az adott mintához és az alkalmazandó analitikai mérőrendszerhez illesztve. Bár az említett nagy hőmérsékletet olyan, hagyományosnak mondható módszerekkel is el lehet érni, mint pl. a laboratóriumi nyomástartó edényzet, a mikrohullámú berendezések térnyerését nem lehet vitatni. Ez utóbbiak esetén nem csupán a mintaelőkészítési idő csökkentése, hanem nagyfokú automatizáltságuk és az akár mintahelyenként szabályozható, dokumentálható és rekonstruálható paramétereik (nyomás, hőmérséklet, reflux) igazolják elterjedésüket mértékét. Legalább ugyanilyen módon kezd egyeduralkodóvá válni a nedves roncsolás területén a teflonedények (PTFE) felhasználása: sav-, lúg- és hőállóságuk, könnyű tisztíthatóságuk és gyakorlatilag bármilyen formában történő

gyártásuk önmagukért beszélnek. Kivételt csupán a különleges, ún. blokkroncsolókban alkalmazott kvarcedények jelentik, amelyek azonban nem teszik lehetővé folyssavas feltárások végrehajtását.

A nedves roncsolást követően a mintát a várható Se/As koncentráció függvényében – gyakran hidridfejlesztést követően – AAS, ICP-OES vagy ICP-MS készülékkel elemzik. Külön figyelmet érdemelnek azok az esetek, amikor a minta összes Se/As tartalmának meghatározásához nincs szükség mintaelőkészítésre. Ilyen lehetőség állhat elő a roncsolásmentes mérési technikák (pl. INAA) illetve a közvetlen szilárd mintás („solid sampling”) módszerek használata esetén. Az előbbi eljárásnál a rendszerint vízmentesített és porított mintát 40-60 órás neutronbesugárzásnak teszik ki, amelyet néhány napos hűtés és a vizsgált radionuklidok gamma-spektrometriás mérése követ [DE BRÄTTER 1995]. Az utóbbiak szilárd minta bemérésével-elpárologtatásával (pl. egyes grafitkemencés ill. LA megoldások) közvetlen kapcsolatot teremtenek a mérőrendszerrel (AAS vagy ICP-MS). Bár mindkét módszer, az INAA és a közvetlen szilárd mintás mintavétel is kétségtelen előnyökkel jár, az előbbit nagy költségigénye, az utóbbit pedig a minta inhomogenitásából fakadó, átlagosnál gyengébb ismételhetőségi paraméterei gátolják a szélesebb körű elterjedésben.

A folyékony minták átmenetet képeznek a mintaelőkészítést nem igénylő és az előkészítendő mintatípusok között. A talajvizeket általában csupán gyenge savanyításnak ill. 0,45 µm-es membránon keresztül történő szűrésnek teszik ki [RAESSLER 2000]. A vizeletminták kezelése lehet hasonlóan egyszerű, szűrés hígítással kiegészítve [LINDEMANN 2000], vagy kicsit összetettebb (dúsítás céljából liofilizálás, amelyet kisebb térfogatban történő oldás követ: CAO [2001]) ill. enyhébb (hidrogén-peroxid + UV-besugárzás: LINTSCHINGER [1998]) vagy erőteljesebb nedves roncsolás (HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: SABÉ [2001]).

Mielőtt sorra kerülne a teljes feltárást célzó eljárások konkrét, elemekre és mintatípusokra lebontott ismertetése, nem szabad említés nélkül hagyni két alapvető feltételt: a vizsgálandó minta homogenitását és reprezentatív jellegét. Hiábavaló ugyanis a bármely tökéletességgel elvégzett roncsolás, ha az előkészítés során nem szentelünk figyelmet az előző paramétereknek. Még a szigorú követelményeket kielégítő CRM-ek esetén is megadásra kerül, milyen módon szükséges az anyagot homogenizálni ill. mekkora a legkisebb, még reprezentatív tömeg. Ezen okokból kifolyólag a (szilárd) mintát – a lehetőségekhez képest – előzetes szemcseméret-csökkentésnek (aprítás-darálás) és méret szerinti osztályozásnak (szitálás) célszerű kitenni – mindezek elmaradása később rosszabb ismételhetőségben / reprodukálhatóságban testesülhet meg.

## **2.2.1. Teljes feltárás összes szeléntartalom meghatározás céljából**

### **2.2.1.1. Általános ismertetőjegyek**

A szelén esetében a teljes feltárás műveletének fejlődése együtt haladt a különböző Se-módosulatok megismerésével, felismerve azok eltérő érzékenységét a különféle hőmérsékleti és vegyi behatásokra. Általánosságban a következő jellegzetességeket célszerű kiemelni:

1) Bármilyen feltárást is alkalmazunk, kizárólag a zárt rendszerek bírnak létjogosultsággal, mivel a szelén-halogenidek illékonyak, így HCl vagy HF használata csak ilyen rendszerben teszi lehetővé a veszteségmentes mintaelőkészítést [D'ULIVO 1997].

2) A kellő figyelemmel végzett nedves roncsolás a mintában eredetileg jelen lévő összes szelénmódosulatot Se(VI) formába alakítja. Mivel a szelén +6 oxidációs állapotban nem képez hidridet, a feltárást követően redukciós lépést kell beiktatni a hidridképző Se(IV) létrehozásához. Mindehhez leggyakrabban sósavas kálium-bromid vagy kálium-bromát reagenst használnak [VILANÓ 1998].

#### 2.2.1.2. A jellegzetes mintacsoportok kezelése

Talaj- és üledékminták esetében a teljes feltáráshoz elengedhetetlen a HF alkalmazása. A mintaelőkészítés általában 2 fő lépésben zajlik: a teflonedénybe kimért anyaghoz először savkeveréket adnak a szervesanyag-tartalom roncsolása céljából (leggyakrabban HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HClO<sub>4</sub> ill. királyvíz) amelyet a szilikátok oldása érdekében HF adagolással fejeznek be [ITOH 1988, ELWAER 1995, MARTENS 1997]. A feleslegben maradó folyadék bórsavval kötik meg.

Szerves eredetű (növényi, állati, élelmiszer, stb.) mintáknál szinte kivétel nélkül egyetlen műveleti lépés elegendő a már közvetlenül elemezhető állapot eléréséhez – ez az egyetlen lépés pedig a salétromsavval, salétromsav-perklórsav eleggyel ill. az előzőek hidrogén-peroxiddal történő kombinálásával végrehajtott nedves roncsolás. A mikrohullámú berendezéssel vagy blokkroncsolóval, tisztán HNO<sub>3</sub> adagolásával, teflonedényben végzett kezelés képes már olyan komplex mintákat is feltárni, mint pl. szelén-fitoremediációs célból telepített mustárnövény [MONTES-BAYÓN 2002a], tengeri pérhal [MAHER 1997], kék-zöld alga [CASES 2002], tejsavbaktérium-készítmény [MICHALKE 2001] és szelénrel dúsított élesztőből készült táplálékkiegészítő [B'HYMER 2000]. Bizonyos – főként nagy lipidtartalmú – mintáknál perklórsavval együtt válik teljessé a feltárást; így például szója [WANG 1996], nem zsírtalanított brazil dió [CHANG 1995] és tengeri rák [GÓMEZ-ARIZA 2002] esetében használták ezt a savkeveréket. A hidrogén-peroxid adagolása egyfajta „oxidatív sokk” révén ugyancsak a tökéletes roncsolást segíti elő; alkalmazása nem mintafüggő, és a szakirodalom alapján nem lehet egyértelmű okot találni használatára ill. mellőzésére. Ebből fakad, hogy részben a fent említett mintákról is találhatunk olyan közleményeket, ahol a roncsolást HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> párossal végezték (élesztő és élesztő-táplálékkiegészítő: ZHENG [2000], UDEN [1998]). Természetesen találkozhatunk több, független csoport által is mindig HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel eleggyel feltárt mintatípussal is: ilyenek pl. a kalapos gombák, ahol valószínűleg a nehezen roncsolható kitines sejtfal igényli a hidrogén-peroxid használatát [VETTER 1990, 1993; KUEHNELT 1997; RÁCZ 2000a,b]. UDEN et al. [1998] egy egész sor mintánál (hagymafélék, állati trágya, növényi és állati eredetű CRM-ek, lucerna, stb.) építettek a mikrohullámmal társított HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> használatára összes Se-tartalom meghatározása céljából, és kielégítő eredményekre jutottak mindegyik mintatípus ill. CRM esetén. Általános szabályként azt lehetne kijelenteni, hogy amennyiben a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adagolásával megnövelt roncsolási térfogat – s ezen keresztül a mintaoldat hígulása – még nem rontja le a mérés pontosságát és megbízhatóságát, úgy a hidrogén-peroxid

használata több mint célravezető. Mindenesetre annyi bizonyos, hogy míg nagytisztaságú salétromsavhoz viszonylag könnyű hozzájutni (leggyakrabban az analitikai tisztaságú sav desztillálásával), addig összevethető mértékben szennyeződésmentes  $\text{H}_2\text{O}_2$  jóval nehezebben/költségesebben úton állítható elő vagy szerezhető be.

Egyetlen olyan szelénmódosulatot említ a szakirodalom, amelynek roncsolásához, szervesetlen módosulattá alakításához a felsorolt savkombinációk nem elegendők: ez pedig a vizeletből kimutatható  $\text{TMSe}^+$  [SABÉ 2001]. Ennél a vegyületnél kizárólag salétromsav-kénsav keverék segítségével válhat teljessé a mintaelőkészítés olyan módon, hogy a  $\text{TMSe}^+$ -t először szelenáttá, majd később redukcióval szelenitté alakítják.

Szerves eredetű minták esetén ritkán ugyan, de találkozhatunk a TMAH használatára építő feltárással is. 25 m/m %-os, rendkívül lúgos kémhatású oldatával végzett hidrolízis oldatba visz minden szerves mintaalkotó komponens, és az esetleg kötött állapotban lévő fémionokat is felszabadítja. Bár létezik olyan tanulmány, amely szerint ez a kezelés nem vált ki módosulátalakulást [DE LA CALLE-GUNTIÑAS 1997], azonban ez a feltevés később többször megdőlt, már 2,5 m/m % koncentráció esetén is [CASIoT 1999; B'HYMER 2000; MARTÍN 2001] és jelenleg csak mint a savas feltárás alternatívájaként játszik szerepet [CASES 2002]. A lúgos pH-érték a TMAH-hoz képest jóval gyengébb bázis, az  $\text{NH}_3$ -oldat alkalmazása esetén is már 4 m/m %-os koncentrációnál bizonyítottan a szelénmódosulatok átalakulását eredményezi [EMTEBORG 1998], így szelén módosulatanalitikában a biológiai pH-tartomány feletti kémhatású közegek nem játszanak szerepet.

## **2.2.2. Teljes feltárás összes arzéntartalom meghatározás céljából**

### **2.2.2.1. Általános ismertetőjegyek**

A mintában található összes arzén meghatározása sok közös tulajdonságot mutat a szelénrel, amelynek részben kémiai (ugyancsak hidridképző és viszonylag nagy ionizációs energiaszükséglet jellemzi – ebből kifolyólag viszonylag nehezen gerjeszthető), másrészt gyakorlati okai vannak (hasonló eljárások alkalmazhatóak mindkét elemre, akár egyidejű mintaelőkészítési célzattal). Ebből kifolyólag az általános jellegzetességek részben egyezők:

1) A zárt rendszerű feltáró berendezések használata előnyösebb a nyitottakhoz képest, mivel egyes tengeri eredetű ill. talajminták illékony arzénmódosulatokat (pl. arzineket; TURPEINEN [2002]) tartalmazhatnak, így a veszteségmentes feltárás kialakítása külön figyelmet érdemel.

2) Minél többszörösebben metilezett, minél több arzén-szén kovalens kötést tartalmaz az adott arzénmódosulat, annál ellenállóbb az oxidatív savas feltárásnak. Emellett a különböző fokban metilezett származékok eltérő mértékben képeznek hidridet. Ebből az következik, hogy amennyiben (a) a teljes feltárás nem vezet egy adott arzénmódosulat (pl.  $\text{As(V)}$ ) homogén elegyéhez, (b) az arzén csak részben alakul át hidridképző módosulattá és (c) a mérőrendszer előzetes kromatográfiás elválasztás nélkül, hidridképzésen alapuló detektálást végez, téves eredményt kaphatunk az arzéntartalommal illetően.



Mivel az előbb bemutatott problémakör jellegzetesen mintafüggő jelenség, a következőkben mintacsoportok szerint ismertetem az összes As meghatározásánál alkalmazott mintaelőkészítési módszereket.

#### 2.2.2.2. A jellegzetes mintacsoportok kezelése

Üledékmintáknál a szelénhez hasonlóan az arzén esetében sem lehet folytasavas kezelés nélkül összes arzénkinyerést elérni, míg talajok esetében a nagyobb szervesanyag- és a kisebb szilikáttartalom miatt olykor elegendő a királyvizes oldás is. Akár ipari tevékenység, akár természetes eredet okozza a talajokban az As jelenlétét, általában csak szervesetlen sóiban, arzenitként vagy arzenátként található meg, így a bevezetőben említett többszörösen metilezett módosulatokkal – adalékolt mintáktól eltekintve – nem találkozunk. Ugyanígy talajvizek esetében e két vegyületen kívül nem szokott más arzénmódosulat előfordulni – ebből fakadóan különleges előkészítésre az esetleges lebegő szennyeződések eltávolítását célzó membránszűrésen kívül nincsen szükség [RAESSLER 2000].

Szerves eredetű minták esetében azonban jóval összetettebb a kép. Amennyiben a feltárt mintát nem hidridfejlesztést alkalmazó módszerrel elemzik (pl. hagyományos porlasztásos mintabevitel ICP-OES vagy MS készülékbe), úgy nincs szükség az As-módosulatok tökéletes, szervesetlen arzenáttig vezetett roncsolására, és megelégszenek a szelén esetében is gyakran kielégítő  $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$  keverék teflonedényben („bombában”) történő alkalmazásával. Optimalizált mikrohullámú kezelés esetén a salétromsav magában is elegendőnek szokott bizonyulni [BRANCH 1994], de az átlagnál nagyobb zsírtartalmú minták miatt a  $\text{H}_2\text{O}_2$  használata mindenképpen ajánlott [MATUSIEWITZ 1989, YBÁÑEZ 1991, EL MOLL 1996]. Közlemények, elemzett CRM-ek és valódi minták egész sora igazolja, hogy ez a megközelítés nem okoz szignifikáns mérési hibát, hiába különbözhetnek egymástól a kalibrálásra szánt, rendszerint As(V) és a roncsolt mintában fellelhető arzénmódosulatok. Konkrét példaként: bébiételek [PARDO-MARTÍNEZ 2001], zöldség [GOESSLER 1997], erdei és termesztett gombák [VETTER 1990], különböző rizsfajták [D'ILIO 2002], kagyló- és emberi hajminták [BERMEJO-BARRERA 1999] ill. tengeri halak [MAICHIN 2000] esetében az elemzések az együtt vizsgált CRM-ekkel kielégítő As-méréseket eredményeztek.

Hidridfejlesztéshez kapcsolt mérési összeállításoknál fokozottabb figyelmet kell szentelni a minta jellegének. A talán leggyakrabban tanulmányozott tengeri eredetű minták (halak, a tenger gyümölcsei, az ezekből készült élelmiszerek) ugyanis többnyire AsB-t tartalmaznak, amely egyrészt nem hidridképző, másrészt egyike az oxidatív savas kezeléseknek leginkább ellenálló As-módosulatoknak. ŠLEJKOVEC et al. [2001] kísérleteik alapján arra a véleményre jutottak, hogy az AsB 100%-os roncsolását csak salétromsav, kénsav és hidrogén-peroxid együttes adagolásával lehet elérni, mivel magában a 65 m/m %-os salétromsav 200°C fokon csupán kb. 50%-ban volt képes ezt a metilezett arzénmódosulatot arzenáttá oxidálni. Érdeemes megjegyezni, hogy a kénsav oxidálóképessége ugyan gyengébb a salétromsavnál, azonban forráspontja nagyobb, így hozzá tud járulni az AsB konverziójához ideálisnak tartott 300°C fok eléréséhez. Ugyanezen nagy hőmérséklet eléréséhez léteznek alternatív megoldások is: az ún. fókuszált

mikrohullámmal működő roncsolók akár kénsav használata nélkül, salétromsavas közegben is képesek biztosítani a kívánt konverziós hatásfokot, áttörést jelentve az arzéntartalmú tengeri minták mintaelőkészítésének területén.

Az ETV-AAS mérőrendszerhez történő mintaelőkészítés – bár nem igényli az arzénvegyületek hidridképző módosulatokká történő bontását – határesetnek tekinthető az előbb bemutatott két csoport, a hidridképzésre építő ill. azt mellőző között. Ennek az az oka, hogy a különböző arzénmódosulatok más és más hőmérsékleten párolognak el az ETV felfűtési szakasza közben, s ezáltal az arzén egy része még a mérési szakasz előtt elillanhat a mérőcellából, veszteséget okozva az arzénmérlegben. A pontos mérés végrehajtásához így két lehetőség marad: vagy a hidridképzésen alapuló mérésekhez szánt (erőteljesen oxidatív) mintaelőkészítést hajtjuk végre, vagy pedig ún. módosító vegyületekkel (Pd- és Mg-sók) vesszük elejét az idő előtti As-elillanásnak [DEAKER 1999].

### 2.3. MINTAELŐKÉSZÍTÉSI ELJÁRÁSOK: MÓDOSULATANALITIKAI MÓDSZEREK

A teljes feltárással ellentétben a módosulatanalitikai mintaelőkészítés kifejezetten azt a célt szolgálja, hogy a mintában található As- és Se-módosulatok átalakulás nélkül kerülhessenek meghatározásra. Azonban nem ez az egyetlen különbség a két megközelítés között: a teljes feltárással ellentétben léteznek módosulatanalitikai feladatok, amelyek nem tűzik ki célul az összes módosulat kinyerését, így azok egy része biztosan feltáratlan marad. Másrészt – sajnos – meglehetősen gyakori az olyan mintatípus, amelyből nem nyerhető ki az összes módosulat, hiába lenne célunk a 100%-os extrakciós hatásfok.

A módosulatanalitikai mintaelőkészítés azután indult fejlődésnek, amikor ismertté vált, hogy ugyanazon elem különböző módosulatai eltérő módon viselkednek ill. eltérő tulajdonságokkal bírnak. Arzén esetében 1973-ig [BRAMAN 1973], míg szelénél egészen a 60-as évekig kell visszanyúlnunk az első módosulatanalitikai mérések megismeréséhez [többek közt MARTIN 1966]. Ezt követően minden egyes új, gyakorlatban használhatónak bizonyuló mintaelőkészítési eljárás nyomot hagyott a soron következő, elemzendő minta megközelítésében, ugyanis az egyszer már alkalmasnak talált, módosulátváltozást nem okozó módszert egyfajta tartalékként, referenciaként használták az újabb módszerek mellett. Ez az egymásra épülés tökéletesen kimutatható mind az As, mind a Se esetében, és általában a korábban még nem vizsgált minták párhuzamosan alkalmazott, eltérő mintaelőkészítésében nyilvánul meg. Ebből kifolyólag nehéz lenne a módosulatanalitikai mintaelőkészítési módszereket jellegzetes mintatípusok szerint csoportosítani, mivel ugyanazon mintát eltérő, de azonos kinyerési hatásfokot biztosító módszerekkel is fel lehet tárni. Másrészt, mint korábban említésre került, nem feltétlenül cél a minél nagyobb kinyerés, így nem lehet „ideális” módszert javasolni az adott mintatípusra – bár a leggyakoribb minták és a hozzájuk kapcsolódó feladatok mára már kijelöltek egynéhány „minta + ajánlott előkészítési módszer” párost, amelyekre a következőekben bemutatásra kerülő, legnagyobb gyakorlati jelentőséggel rendelkező módszerek szolgáltatnak példákat.

## **2.3.1. Módosulatanalitikai mintaelőkészítési eljárások szelénre**

### **2.3.1.1. Általános ismertetőjegyek**

Az alkalmazható módszereket alapvetően három tényező szoríthatja korlátok közé. Egyrészt figyelemmel kell lenni a szerves szelénmódosulatok általános érzékenységre, így például nagyobb hőmérsékleten ( $> 70^{\circ}\text{C}$ ) a Se(IV) módosulat Se(VI)-tá oxidálódhat [ZHANG 1997], ill. a pH számottevő változása az előbbi két szelénvegyület közt fennálló redox egyensúlyt tolhatja el egyik vagy másik irányba [SHARMASARKAR 1998]. Másrészt a szelén élettani szerepének további tisztázását sürgető igények és a „proteomics” („fehérjetudományok”) térnyerésének köszönhetően egyre több kutatócsoport foglalkozik a szelén fehérjeszintű módosulatanalitikájával, amelyben természetesen csak korlátozott mértékben lehet fordulni az olyannyira elterjedt teljes fehérjehidrolízis eszköztárához. Harmadrészt még nem ismerjük eléggé a szeléntartalmú aminosavak és újonnan felfedezett származékaik tulajdonságait, így az óvatos, inkább kisebb kinyerési hatásfokot nyújtó, de módosulatváltozást „biztosan” nem okozó módszerek előtérbe helyezése mindenképpen indokolt. Mindezek figyelembevételével még mindig meglehetősen bő választék áll rendelkezésünkre a választható eljárásokat illetően.

### **2.3.1.2. Pufferelt és nem pufferelt („vizes”) közeggel végzett extrakciók**

A leginkább „gyengéd”-nek tekintett mintaelőkészítési eljárásokkal állunk szemben. Az alkalmazott pH-értékekre pufferelt közeg esetén az ún. biológiai puffer-tartomány (pH=5-9) jellemző, a kezelés 1-2 órás kevertetésben-ráztatásban testesül meg, míg a kezelési hőmérsékletek a szobahőmérséklet és  $80-90^{\circ}\text{C}$  között mozognak, az utóbbinál természetesen csak – vélhetően – főleg szerves módosulatot hordozó minták esetében. Ezzel a módszerrel a nem kötött formában lévő szerves szelénsók többségét, a szabad aminosavakat és származékaikat illetve semleges körüli pH esetén a fehérjék 20-30%-át lehet kinyerni a mintából. Mivel a várható extrakciós hatásfok inkább függ a mintától, mintsem a választott extraháló oldattól, célszerű mintacsoportok szerint bemutatni a konkrét alkalmazási példákat.

Talaj- és üledékminták esetében a csupán desztillált vízzel végzett extrakció rendkívül kis részét szabadítja fel a szelénnek: MARTENS és SUAREZ [1997] 1,0 és 7,0% közötti értéket kapott. A mintától függően olykor még az extraháló vízben ioncserélő célzattal oldott KCl adagolása sem növeli a hatásfokot: ZHANG és MOORE [1997] még az előző csoport eredményeihez képest is kisebb, 1,4-1,8%-os hatásfokot könyvelhetett így el. Lényegesen nagyobb kinyerést tesz lehetővé a többértékű aniont, jellemzően foszfátot hordozó oldatok alkalmazása: az előbbi szerzőpáros 72-100%-ra emelte meg a kinyert szelén mennyiségét  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ , pH=7,0 kálium-foszfát puffer segítségével. A foszfát-puffer ott nem ért el 100% körüli kihozatalt, ahol jelentős volt a talajminta Se(0) és Se(-II) módosulattartalma; ezen esetekben  $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  oldat utólagos szekvenciális használata – oxidáló hatása révén – tette teljessé a kinyerést. Fontos megjegyezni, hogy a talajok és üledékek kizárólag szerves szelénvegyületeket hordoznak mérhető koncentrációban, és ezeknek jellemzően Se(IV) és Se(VI) a két legfőbb összetevőjük.

Növényi eredetű mintáknál a vizes oldás mind minőségileg, mind mennyiségileg teljes mértékben eltérő szelénkinyerést eredményezhet – még azonos fajon belül is. Ennek az oka, hogy amennyiben a talaj szeléntartalma kiugró, úgy bizonyos típusú növények (pl. napraforgó) kiemelkedő mértékben veszik fel ezt az elemet (akár  $900 \mu\text{g g}^{-1}$  értékig), de a feldúsított szerves szelénsókat anyagcseréjük nem hasznosítja, és belőlük ez a szelénmennyiség 100%-ban kinyerhető egyszerű vizes oldással [LINTSCHINGER 2000]. Ahogy azonban kevesebb szelént hordozó talajról származó napraforgót vizsgálunk, a metabolizált Se aránya emelkedik, és ezzel együtt csökken a könnyen kioldható Se mennyisége. A hagymafélék eltérő módon viselkednek: a fokhagyma egy bizonyos szelénellátottságig a  $85\text{-}90^\circ\text{C}$  fokos vízzel szinte 100%-ban kioldható, kiemelkedően rákellenes hatású  $\gamma$ -glutamil-Se-metilszelenociszteint állítja elő [MCSHEEHY 2000, IP 2000], míg a tápoldatban/talajban rendelkezésre álló nagyobb szelénkoncentráció esetén megjelenik a Se-metilszelenocisztein és a fehérjébe épített – így vízzel nem extrahálható – SeMet is, csökkentve a vizes oldás hatásfokát [KOTREBAI 2000]. Más hagymafélék (*Allium tricoccum*, WHANGER [2000]; vöröshagyma, KOTREBAI [2000]) valamivel nagyobb arányban szintetizálják a fehérjébe épített SeMet-t az előbb említett, közvetlenül vízoldható módosulatokhoz képest, így a vizes kinyerés hatásfoka általában 90% alá csökken.

Az ún. szelén-fitoremediációs növények (*Brassica ssp.*) a hagymafélékhez képest eltérő Se-anyagcsereútjaik következtében más eredményt adnak vizes ill. pufferelt közegű extrakció esetén: ZHANG és FRANKERBERGER [2001] ill. KOTREBAI et al. [2000] vízzel 60,4-72,6%-os kinyerést értek el, főleg Se(VI), szabad szeleno-aminosavak és származékaik kimutatása mellett; MONTES-BAYÓN et al. [2002a] TRIS-HCl puffer segítségével (pH=8,0) 46,5%-os hatásfokot tudtak felmutatni, de a kinyert módosulatok jelentős részét nem sikerült azonosítani.

A gyakorlati szempontból talán legfontosabb szeléntartalmú mintát, a szelénrel dúsított élesztőt is vizsgálták már vizes ill. pufferelt közegű ( $30 \text{ mmol l}^{-1}$  TRIS-HCl, pH=7,0) kezelést követően. A vizsgálatok során a kutatócsoportok a következő, szinte tökéletesen azonos eredményre jutottak: a vizes extrakció ( $50\text{-}90^\circ\text{C}$ , 1-2 óra) és a pufferes kezelés is ( $37^\circ\text{C}$ , 1 óra) egyaránt kb. 10%-os kinyerési hatásfokot eredményezett, fő komponensként pedig Se-adenozil-szelenohomocisztein mellett némi szabad SeMet-t ill. a fermentáció során felvett, de nem metabolizált szerves Se(IV)-t mutattak ki [CASIOT 1999; KOTREBAI 1999a és 2000; IP 2000; MCSHEEHY 2001a].

A vizes-pufferes extrakciót felhasználhatják még egyrészt a vízoldható Se-tartalmú peptidek-polipeptidek kioldására az adott mintamátrixból, amelyet legtöbbször a kinyert molekulák SEC vagy SDS-PAGE elválasztása követ: csiperkegombánál [VAN ELTEREN 1998], tengeri halaknál [ÖNNING 2000] és szójánál [WANG 1996] ezzel a megközelítéssel jellemezték a minta Se-tartalmú fehérjéit, azok méretét és mintán belüli eloszlását vizsgálva. Másrészt ez az extrakciós eljárás lehetőséget adhat arra, hogy – egyfajta előkezelésként – eltávolítsuk a mintából azokat a könnyen extrahálható fémionokat, amelyek pl. enziminhibíciók keresztül akadályoznák vagy meggátolnák a tervezett módosulatanalitikai mintaelőkészítés végrehajtását [ABOU-SHAKRA 1997].

Érdeemes pár szót szólni a vizes-pufferes kezelések során felhasznált járulékos vegyszerekről is. Enzimaktivitást gátló (kataláz) és baktericid tulajdonsága miatt a  $\text{NaN}_3$ , redukáló és antioxidáns szerepe miatt a  $\beta$ -merkaptoetanol, fehérjedenaturáló hatásának köszönhetően a SDS, szelektív proteáz inhibitor jellege miatt pedig a PMSF gyakori összetevője az extraháló oldatoknak.

### 2.3.1.3. Szerves oldószeres extrakció

Napjainkig még nem azonosítottak egyetlen hidrofób karakterű Se-módosulatot sem. Ennek ellenére – főleg a korábban még nem tanulmányozott minták esetében – találkozni lehet olyan irodalmi utalásokkal, amelyek kloroform-metanol 1:2 vagy 2:1 arányú elegyével végrehajtott extrakciót említene. WANG et al. szójabab [1996], ALSING PEDERSEN és LARSEN [1997] és EMTEBORG [1998] fehér lóhere CRM, MAHER et al. [1997] pedig szívagylyó és pérhal minták esetében használták az említett keveréket. Ezek közül kizárólag a kagyló bizonyos alkotóiból (kopolyú) sikerült számottevő, az összes Se-tartalom 30%-át kitevő szelénmennyiséget kinyerni, a többi esetben 0,2-19% körül maradt az extrakciós hatások. Mivel a kagylóminta esetén ennek a frakciónak nem zajlott le módszeranalitikai vizsgálata, nem tudjuk, hogy valóban lipofil Se-módosulatok megléte, mintaelőkészítési hiba, ill. esetleg a már korábban azonosított szeleno-aminosavak és származékaik lipoproteinekbe való épülése váltotta-e ki az egyébként szokatlanul nagy, lipidoldékony Se-frakció megjelenését. Mindenesetre az irodalomban azóta sem szerepel kifejezetten zsírodékony Se-módosulatra utaló nyom [LARSEN 2002], mi több, a szerves oldószeres kezelés hatástalan volta miatt előtérbe helyeződtek az egyéb, pl. enzimes mintaelőkészítésre építő módszerek [ALSING PEDERSEN 1997]. Ebből kifolyólag a vízzel egyáltalán nem, vagy alig elegyedő oldószereket rendszerint a minta lipidtartalmának eltávolítására használják fel a szelén módszeranalitikai mintaelőkészítése során; így például KANNAMKUMARATH et al. [2002] kloroform-metanol eleggyel zsírtalanítottak brazil dió őrlményt, GÓMEZ-ARIZA et al. [2002] pedig diklór-metánnal vonták ki kagylómintákból a kromatográfiás elválasztást zavaró lipid vegyületeket.

Külön érdemes foglalkozni a vízzel jól elegyedő metanollal és etanollal, amelyeket számos, egymástól eltérő célzatú, bár hasonló működési elven alapuló mintaelőkészítési lépés során vonhatnak be a szelén módszeranalitika fegyvertárába. A közös alapelv arra a jelenségre épít, hogy 40 V/V % körüli alkoholkoncentrációt meghaladó elegyben a fehérjék többsége csapadékként kiválik, s így azok az oldattól centrifugálással ill. mikroszűréssel eltávolíthatóak. Ezáltal lehetővé válik a zavaró, elemzésre nem szánt fehérjék – pl. mintaelőkészítésnél alkalmazott fehérjebontó enzimek és nem hidrolizált mintafehérjék – leválasztása [VONDERHEIDE 2002], ill. ezzel ellentétes céllal, a szelént tartalmazó – tehát vizsgálandó – fehérjék egy vagy többlépcsős frakcionált oldószeres csapadékképzése [WANG 1996]. 40 V/V %-nál kisebb koncentrációnál az etanolt ill. metanolt általában  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  HCl oldattal elegyítik; ezeknek az extraháló elegyeknek a használata kis extrakciós hatásokkal (10-14%) jár együtt és a felhasználásuk a vízoldható módosulatok – pl. szabad Se-aminosavak – kinyerésében merül ki [UDEN 1998, LE 1998, CASIOT 1999]. Bár néhány csoport próbálkozott azzal, hogy

közvetlenül – az arzén módosulatanalitikában oly gyakori (lásd 5. Melléklet táblázata) – 1:1 vagy 9:1 metanol-víz eleggyel hajtja végre valódi minta (fehér lóhere CRM: ALBERTI [1995], EMTEBORG [1998]; ezüstsirály tojása: JAKUBOWSKI [2001]) szelénmódosulatainak extrakcióját, az elért hatásfok jóval kisebbnek bizonyult 50%-nál még akkor is, amikor sósav adagolásával próbálták növelni a művelettel kinyerhető szelén mennyiségét.

#### 2.3.1.4. Az ún. biológiai pH-tartománynál kisebb kémhatáson végzett extrakciók és kezelések

##### 2.3.1.4.1. „Tömény” ( $1 \text{ mol l}^{-1}$ koncentrációnál töményebb) oldatok felhasználása

Talán a Se-módosulatanalitika egyetlen más területén sem lehet ennél ellentmondásosabb szakaszra bukkanni. A kérdés a következő: „tömény” savak és lúgok alkalmazhatóak-e módosulatanalitikai mintaelőkészítésre? Mint ahogyan a 2.2.1. szakaszok rámutattak, a salétromsav, a kénsav, ill. a perklórsav biztosan nem; azonban a sósav megítélése már korántsem ilyen egyértelmű. Az anaerob körülmények között, 24 óra alatt, 110-120°C hőmérsékleten  $6 \text{ mol l}^{-1}$  sósavval végrehajtott fehérjehidrolízisre épülő aminosav-analizátorok számítottak szinte az első automatizált szerves kémiai műszernek és felhasználásuk a mai napig töretlen. Miután a 60-as években egyre nyilvánvalóbbá váltak a szelén bizonyos aminosavakba történő épülésének bizonyítékai, ezt az akkor már széles körben elterjedt módszert is alkalmazták – és alkalmazzák a mai napig is – szeléntartalmú fehérjék hidrolízisére és aminosavaik vizsgálatára. A hangsúly a fehérjékre helyeződik, mivel az eljárásnak gátat szabhat bizonyos szelénmódosulatok, különösen a szerves Se(IV)-Se(VI) egyensúly instabilitása, így a sósavas hidrolízis nem teszi lehetővé a szerves módosulatok állapotának megőrzését. Így amennyiben nem valósul meg a minta fehérjetartalmának elkülönített vizsgálata, a minta szelénmódosulatainak egy bizonyos hányada csupán „összes szerves Se-frakció”-ként lesz jellemezhető. Ettől a hátránytól eltekintve a sósavas hidrolízis egyik legfőbb előnyeként kell megemlíteni, hogy a mikrohullámú technika bevezetése lecsökkentette a 24 órás időigényt kevesebb, mint fél órára [CAVALLI 1995].

Az elmúlt években számos példa látott napvilágot a hagyományos ill. továbbfejlesztett (mikrohullámmal végrehajtott) sósavas hidrolízis felhasználásáról biológiai minták szelén módosulatanalitikai vizsgálatára. Szelénnel dúsított tejsavbaktérium [CALOMME 1995b] és alga [FAN 1998], delfinmáj [CAVALLI 1995], szívbeteg és pérhal [MAHER 1997], ill. kísérleti állatok szervei [BEHNE 1998] esetében a módszerrel 90% feletti kinyerési hatásfokot értek el és a szerzők szerint sikerült megóvni a szeleno-aminosavakat az emelt hőmérséklet által előidézett esetleges bomlástól és/vagy átalakulástól. Mindezek ellenére a sósavas hidrolízis egyedüli üdvöztető volta több mint megkérdőjelezhető. Nem világos, hogy a szerzők jelentős csoportja miért nem fektet hangsúlyt a fenol alkalmazására, amely elvileg alapvető fontosságú az oxidáció elkerülése szempontjából, különösen az arra érzékeny SeCys esetében. Mások szerint sem a fenol adagolása, sem pedig a lényegesen rövidebb ideig tartó mikrohullámú kezelés nem képes biztosítani a szeleno-aminosavak épségét [HUBER 1967, MACKAY 1982, SOCHASKI 2001, KROLL 1998]. Mindezekből az következik, hogy amíg nincs kereskedelmi forgalomban szelén módosulatanalitikai célokra szánt CRM, amellyel minden kétséget kizárólag bizonyítani lehetne egyik vagy másik fél igazát, addig kételyek kísérik majd a sósavas hidrolízis ezen a területen

való felhasználásának jogosultságát. Másrészt azokban az esetekben, ahol a fehérjéket még részben sem választják el a mátrixtól (pl. izmok elkülönítése a többi szervtől halmintánál, MAHER [1997]), csak a nagy mennyiségben szervetlen szelénmódosulatokat hordozó (s így a sósavas kezelés miatt módosulatváltozást szenvedő) mintáknál érhető el az elvárt (80-90% feletti) extrakciós hatások (pl. szelénes táplálékkiegészítők: B'HYMER [2000]).

#### 2.3.1.4.2. „Híg” ( $1 \text{ mol l}^{-1}$ koncentrációnál hígabb) oldatok felhasználása

Ezen csoport legjellegzetesebb tagja a triklór-ecetsav (TCA), amely rendszerint jéghideg, 1-12 m/m %-os oldatban kerül felhasználásra. Alkalmazásának legfőbb célja, hogy a pH és a fehérjék hidratációs potenciáljának csökkentése révén a nagy molekulatömegű fehérjéket csapadékként leválassza az oldatból, s így azok eltávolítása után lehetővé teszi a kis molekulatömegű vízdékony szelénmódosulatok (szervetlen sók, metilezett származékok, szabad aminosavak stb.) vizsgálatát. Ebből következik, hogy a TCA-s kezelés egyfajta alternatív lehetőséget nyújt a szeléntartalmú komponensek molekulatömeg szerinti, közelítő jellemzésére, ha sem ultraszűrési, sem pedig méretkizáráson alapuló módszerek nem állnak rendelkezésre. Ugyanakkor a szétválasztást illetően a „kis” és „nagy” molekulatömeg közötti határvonal nem egyértelmű, mivel mind a fehérjék mérete, mind pedig hidrofób karakterük meghatározza oldhatóságukat a TCA oldatban. Általános elvként az mondható el, hogy a fehérjék közül a hét aminosavnál rövidebbek még biztosan nem csapódnak ki [ÖNNING 1999]. A TCA alkalmazási területe meglehetősen széles: *Chlorella* zöldalga [FAN 1998, LARSEN 2001], tőke- és lepényhal [ÖNNING 1999], brazil dió [VONDERHEIDE 2002], tejsavbaktérium [CALOMME 1995a] és szójabab [WANG 1996] szerepel a közleményekben. Érdeemes továbbá megemlíteni, hogy a TCA illékonyága lehetőséget ad a mintából liofilezéssel történő eltávolítására, amely tulajdonság különösen előnyös a kis szeléntartalmú minták ill. mintafrakciók kezelésénél.

Bár a molekulatömegre nézve ugyan még ilyen mértékben sem nyújt információt, ennek ellenére ugyancsak használatban van az általában  $0,4 \text{ mol l}^{-1}$  koncentrációjú perklórsav és a  $0,1-1 \text{ mol l}^{-1}$  sósav a kis molekulatömegű szelénmódosulatok kinyerése céljából. Mivel az utóbbi – főleg mikrohullámú berendezésben végzett extrakció esetén – már  $0,5 \text{ mol l}^{-1}$  koncentrációban is képes megváltoztatni a Se(IV)-Se(VI) arányát a mintában, így a szervetlen Se-módosulatokról többnyire csak „összes szervetlen” adat gyűjthető [MONTES-BAYÓN 2002a]. Ezek után felmerülhet a kérdés, miért célszerű egyáltalán híg savakkal végezni extrakciót, például egyszerű vizes kezelés helyett. A válasz abban rejlik, hogy a szabad vagy gyengén kötött aminosavakat és származékaikat a gyenge savak szignifikánsan nagyobb mértékben szabadítják fel a mintából, mind a biológia pH-tartományra pufferelt oldatokhoz, mind pedig a hagyományos vizes extrakcióhoz képest. Ezt a tényt különböző mintákon végzett összehasonlító kezelések sora igazolja, pl. szójafehérje [YASUMOTO 1988] szelénnel dúsított élesztő [CASIOT 1999], szelénakkumuláló fitoremediációs növények [MONTES-BAYÓN 2002b], tejsavbaktérium [MICHALKE 2002], fehér lóhere [EMTEBORG 1998], és brazil dió [VONDERHEIDE 2002] vizsgálatánál.

Egyetlen irodalmi hivatkozás ismertet olyan vizsgálati eredményeket, amelyeknél a híg sósavoldattal végzett extrakció kisebb extrakciós hatásfokot eredményezett a vizes extrakcióhoz képest. LINTSCHINGER et al. [2000] búza- és lucernacsírákat neveltek szeléntartalmú folyadékkultúrás módszerrel. Azt tapasztalták, hogy a csíramintákból  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  koncentrációjú NaOH oldattal lehetett a legnagyobb mennyiségű szelént kinyerni, bár az extrahált módosulatok egy részét nem sikerült azonosítani az eredeti komponensek degradációja vagy ismeretlen szelénmódosulatok jelenléte miatt. A  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  koncentrációjú sósavoldattal – az összes kinyert szelén mennyiségét tekintve – még a vizes kezeléshez képest is kisebb hatásfokú extrakciót lehetett csupán elérni. Mindkét jelenség szokatlannak számít, és rávilágít arra a tényre, hogy szelén módosulatanalitikai mintaelőkészítésénél nem létezik egyetemes megközelítés, ugyanis minden mintatípusra egyedi elbírálást kell vagy célszerű alkalmazni.

#### 2.3.1.5. Enzimes hidrolízis – fehérjebontó és nem fehérjebontó enzimek

A szeléntartalmú fehérjék vizsgálatának területén hosszú évtizedeken keresztül egyeduralkodónak számító,  $6 \text{ mol l}^{-1}$  sósavas hidrolízisen alapuló módszer megítélése a 80-as évek elején több tényező együttes fellépése miatt kedvezőtlen irányba változott meg. Egyrészt problémák merültek fel magával a sósavas hidrolízissel kapcsolatban, ugyanis megkérdőjeleződött a szeleno-aminosavak épségének megőrzése az anaerob környezet és a fenol jelenléte ellenére [HUBER 1967, MACKEY 1982]. Másrészt megjelent egy új igény, a szelén biológiai hozzáférhetőségének megállapítása különböző élelmiszerekben, hiszen az étkezéssel ill. táplálékkiegészítőkkel bejuttatott szelénmennyiséget még csak „összes szelén”-ként tudták társítani az addigra már jól ismert, szűk szeléntolerancia-tartományhoz. Mivel az emberi emésztést nem lehetett csupán sósavas hidrolízissel modellezni, a korábbiaktól eltérő módszerre volt szükség. Ez az új megközelítés vezetett el lassanként a szelén módosulatanalitika kiterjesztéséhez az élettani-biokémiai területről a táplálkozástudomány és élelmiszer-kémia berkeibe – s ezen irányvonal hívta életre az enzimes mintaelőkészítést, mely az első, szójababbal foglalkozó közlemény óta [YASUMOTO 1983], általánosan teret nyerve vált szinte egyeduralkodóvá.

Az elmúlt 20 év három szakaszra osztható mind a felhasznált enzimeket, mind a konkrét célkitűzéseket tekintve. A 90-es évek közepéig a biológiai hozzáférhetőség megismerése mellett törtek lándzsát a kutatók és ebből kifolyólag az emberi emésztést próbálták modellezni, általában többlépcsős enzimes kezelésekkel, csak a fehérjebontó vagy az összes, emberi emésztőrendszerben szerepet játszó enzimescsoportokra helyezve a hangsúlyt. A vizsgálatoknál nem szántak elsődleges szerepet a maximális elméleti kinyerési hatásfok elérésének, célul a „felvehető-e a szelén az adott élelmiszerből, és ha igen, milyen mértékben” típusú kérdések megválaszolását tűzték ki. Ezen típusú problémafelvetés a mai napig tetten érhető, s bár jelentősége egy időben lecsökkent, újbóli előtérbe kerülésének lehetünk szemtanúi az elmúlt 1-2 évben.

1995-ben jelent meg az a – mondhatni úttörőnek számító – közlemény, amely a 2. szakasz eljövételét váltotta ki. GILON et al. [1995] az azóta több mint félszáz alkalommal idézett



munkájukban vezették be az egy lépéses enzim mintaelőkészítést a szelén módosulatanalitika témakörében, felkínálva egy viszonylag egyszerű, – s ami a másik legfőbb újdonságot jelentette – nagy kinyerési hatásfokot megcélzó módszert. Részben nekik, részben pedig a cikkük után piacra kerülő új műszereknek köszönhető, hogy egész garmadáját ismertük meg a különböző szerves szelénmódosulatoknak az 1995-től kb. 2002-ig tartó kutatási időszakban. Ezt követően láttak napvilágot a 3. generációs szelén módosulatanalitikai közlemények, amelyek egy szinttel feljebb, az aminosavaktól és származékaiktól a szeléntartalmú fehérjék és egyéb makromolekulák szintjére helyezve a módosulatanalitikát, ismét más enzimeket vetnek be az új cél, a szeléntartalmú fehérjék szekvenciájának megállapításához.

Mindhárom szakaszban, mindezen kísérletekkel párhuzamosan az adott minták vizsgálata során felmerülő, sajátos mintaelőkészítési problémák megoldására a fehérjebontó enzimek mellett fel-feltűntek a más osztályokba tartozó enzimek is. Az utóbbiak természetesen csak közvetve, a fehérjebontó enzimek feladatát segítve járulnak hozzá a mintaelőkészítéshez, például a hidrolizálható fehérjékhez történő hozzáférés javításán keresztül. Ugyanakkor a jelenleg futó kutatási területeket figyelve nem kizárt, hogy a közeljövőben főszereplökké is előléphetnek egy-egy új, nem fehérjeeredetű szelénmódosulat kapcsán.

#### 2.3.1.5.1. Az enzim mintaelőkészítés általános jellemzői

Az emberi emésztés modellezésén és a biológiai hozzáférhetőség-felvehetőség becslésén kívül az enzim mintaelőkészítések mindazon tulajdonságokkal jellemezhetőek, amelyekkel a módosulatanalitikai szempontok alapján kívánt kíméletes, de mégis hatékony módszernek rendelkeznie kell. Alkalmazásuk nem jár nagy hőmérséklet-emeléssel: rendszerint 30-50°C fokon, tehát jóval a határértéknek kikiáltott 70°C alatt zajlik le. A gyomorműködést modellező kísérleti rendszerektől eltekintve nem igényelnek szélsőségesen savas vagy lúgos kémhatást, mivel pH-optimumuk leggyakrabban az ún. biológiai tartományban található. Használatukhoz nincs szükség különleges műszerekre, általában a termosztálható rázó gép jelenti az egyetlen, nem feltétlenül minden laboratóriumban elérhető berendezést. A mikrohullámmal társított, 6 mol l<sup>-1</sup> sósavas hidrolízisen alapuló módszerhez képest azonban hátrányként említhető az olykor nagy időigény (egészen 36-64 óráig), némelyik enzim viszonylagos drágasága, ill. a minta szemcseméretének eloszlására való érzékenység, amely nem kellően porított-homogenizált minta vizsgálata esetén kis kinyerési hatásfokban és nagy mérési bizonytalanságban ölthet testet. A nem általánosan jellemző alkalmazási előnyök és hátrányok az adott enzimeknél külön-külön kerülnek bemutatásra.

#### 2.3.1.5.2. Enzim hidrolízis – fehérjebontó enzimek alkalmazása az emberi szervezet emésztési folyamatainak modellezésére

A fehérjebontó enzimek mindazon esetekben sikeresen járulhatnak hozzá a szelénmódosulatok mintából történő kinyeréséhez, amelyekben a minta biológiai eredetű, feltételezhetően jelentős mértékben tartalmaz fehérjéket és ezek a fehérjék közvetlenül hozzáférhetőek az enzimek számára. A felsorolt – és az előző szakaszban említett általános –

feltételek együttes teljesülése a kulcs a sikeres mintaelőkészítéshez; ekkor ugyanis a megfelelő hőmérséklet, pH és kevertetés beállítása után az enzim – típusától függően – a minta fehérjéit aminosavakra vagy kisebb-nagyobb peptidekre hidrolizálja. A legfontosabb feladat a célnak megfelelő enzim kiválasztása.

Az emberi szervezet a teljes értékű fehérjét 95-98%-ban aminosavakig képes lebontani. Ebből indultak ki YASUMOTO és társai [1983, 1988], amikor elsőként a világon enzimes mintaelőkészítést terveztek meg szeléntartalmú szójafehérje-izolátum vizsgálatára. Több lépéses mintakezelésüket 1 m/m %-os pepszinoldatban indították, a gyomorra jellemző pH=1 és hőmérséklet (37°C) beállításával. Ezt követően a mintát a fehérjebontó aktivitással is rendelkező enzimkeverékkel, a hasnyálmirigyben termelődő pankreatinnal (1 m/m %, pH=7,5), majd végül pronázzal (1 m/m %, pH=7,5) kezelték. A felsorolt enzimek közül a pepszin és a pankreatin főként peptidekre, míg a pronáz (nem szubsztrátspecifikus, endo- és exopeptidázokat is tartalmazó, fonalas baktérium által előállított enzimkeverék) aminosavakig bontotta a szójafehérjét. A mintaelőkészítés folyamata 63 órát vett igénybe. A kezeléseket dializáló csőben hajtották végre, így végig nyomon követhették a hidrolízis során felszabaduló kis molekulatömegű, szeléntartalmú köztes- és végtermékek mennyiségét. A kísérletek alapján egyértelművé vált, hogy a szójafehérje szeléntartalma főleg SeMet formájában található meg.

CREWS et al. [1996] főtt tonhalat vetettek alá *in vitro* emésztőrendszeri bontásnak. Kezelésük két lépésből állt: először pepszines közegben (1 m/m %, pH=2,0; + 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl), majd pankreatint is tartalmazó oldat hozzáadásával (1,5 m/m %, pH=6,9; + 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl, 0,5 m/m % amiláz és 0,15 m/m % epesó), összesen 8 órás időtartammal modellezték az emberi szervezet működését. A viszonylag rövid kezelés és a kifejezetten aminosavakig bontó enzim hiánya miatt az előkészítést követően csak szerves Se(IV)-et sikerült azonosítani a mintaelegyből, szeleno-aminosavakat nem.

THOMAS et al. [2001] sült hús, észak-amerikai (tehát szelént valószínűleg kimutatható mennyiségben tartalmazó) pirítós és különböző gyártóktól származó szeléntartalmú táplálékkiegészítők vizsgálatát végezték el az előző két csoport módszereinek vegyítésével: dializáló csőben, kétlépéses *in vitro* emésztőrendszeri modellezéssel becsülték fel az élelmiszerminták szeléntartalmának biológiai hozzáférhetőségét. Ez utóbbi mérőszámaként a dializáló csőből eltávozó szelén mennyiségét vették alapul, és nem törekedtek tökéletes hidrolízisre. Eredményeik alapján a sült és a pirítós 40-50%-ban, míg a táplálékkiegészítők 70-100%-ban tartalmaznak hozzáférhető szelént, amely az előbbieket esetében főként SeMet, míg az utóbbiaknál SeMet és Se(VI) formájában volt jelen.

MARTÍN et al. [2001] szelénrel dúsított élesztőt mesterséges gyomornedvvel (1 m/m % pepszin, pH=1,8; 0,9 m/m % NaCl) próbáltak lebontani, egyetlen 4 órás lépésben. Mint várható volt, kizárólag a pepszin nem volt képes teljes hidrolízist végrehajtani, így az összes szelénmennyiség csupán 11%-át tudták azonosítani SeMet és Se(IV) formájában.

Az előzőekben ismertetett eredmények mindegyike ugyanazon értékeléssel jellemezhető: teljes hidrolízishez feltétlenül szükség van a nem specifikus enzimek használatára, mivel csak így biztosítható kellő mértékben a szelénmódosulatok kinyerése és azonosítása.

### 2.3.1.5.3. Enzimes hidrolízis – fehérjebontó enzimek alkalmazása egylépéses mintaelőkészítési módszerekhez

Olykor több napos mintaelőkészítés, köztes beavatkozási lépések (pl. dializáló folyadék és pufferek cseréje, új enzimek hozzáadása, akár többszöri liofilezés közbeiktatása) sokasága, sterilitás hiányában az időben elnyúló kezelés során esetlegesen fellépő mikrobiológiai tevékenység által okozott módosulatalakulás lehetősége – mindezen tényezők miatt csak valóban indokolt esetben célszerű az emberi emésztést modellező, rendszerint dializálással egybekötött módszerekhez folyamodni. Másrészt az élelmiszer-fehérjéről nincs okunk feltételezni, hogy lebontásuk csak részlegesen történne meg az emberi szervezetben: általában az elfogyasztott fehérjék mindössze 2-5%-a kerül el az emésztést [GANONG 1990], és kifejezetten az emésztőenzimek hozzáférését lehetetlenné tevő térszerkezettel csak szélsőséges esetekben (pl. a scrapie, a kergemarhakór és embereknél a Kreutzfeld-Jacobs szindróma kialakulásáért felelős prionfehérjék élelmiszerbe való kerülésénél) találkozhatunk. Amennyiben tehát sikerülne egyetlen lépésben, az emberi szervezetben akár elő sem forduló enzimmel vagy enzimekkel lebontani a mintafehérjét, úgy egyszerre három célt is elérhetnénk: (a) valósabb képet kaphatnánk a minta szeléntartalmának biológiai hozzáférhetőségről, (b) a szinte teljes bontás kiemelkedő kinyerési és azonosítási határfokot tenne lehetővé ill. (c) rövidebbé tehetnénk a mintaelőkészítés folyamatát.

Természetesen ez csupán az elmélet. A gyakorlatban az élelmiszerek nem csak fehérjéből állnak, összetett, „víz-lipidek-szénhidrátok-élelmi rostok-fehérjék-ásványi anyagok- és egyéb” mátrixot alkotnak, amelyek lebontására a szervezet különböző enzimek százait veti be – tehát az *in vitro* kimutatott, esetlegesen kicsiny szelénkinyerési határfok nem feltétlenül jelenti a hozzáférhetőség hiányát. A szelén módosulatanalitika porított alapmintái (élesztő, hagymafélék, lisztek) – élelmiszer vagy táplálékkiegészítő voltak ellenére – komplexitásukban még gyakran távol állnak a valódi élelmiszermintáktól, de ugyanakkor lehetővé teszik egyrészt az egyszerűbb mintaelőkészítési megközelítést, másrészt az élelmiszer-alapanyagok vizsgálatára építve a kész élelmiszernek a fogyasztók szelénrel való ellátásában betöltött szerepének felmérését.

Az elmondottak alapján érthető, hogy a GILON et al. [1995] által bevezetett, egylépéses enzimes mintaelőkészítés miért válhatott alpmódszerré a szelén módosulatanalitikában. Eljárásuk lényege a következő: a kellően homogenizált és porított mintához a *Streptomyces griseus* fonalas baktérium által kiválasztott „pronáz E” (vagy a gyártótól függően „aktináz E” vagy XIV-es típusú proteáz /EC 3.4.24.4 és 3.4.24.31/ néven ismert) enzimet keverik nagy feleslegben, az enzim pH- és hőmérsékleti optimumának beállítása (pH=7,4-8,8; 37-40°C) mellett. A „nagy felesleg” azt jelenti, hogy 100 mg mintára 10 mg enzim jut; ez az arány valóban óriási mind az enzim eredeti gyakorlati felhasználása, a DNS-RNS kivonatok fehérjementesítésénél felhasznált koncentrációk [DAVEY 1981], mind pedig az élő szervezetekben tapasztalható, akár 1:10000 enzim:szubsztrát (mól)arányhoz képest. Az ok nyilvánvaló: *in vitro* (tehát nem optimális) környezetben kell elérni a lehető legtökéletesebb fehérjehidrolízist, emésztési szempontból előkészítetlen, olykor szárítás és egyéb műveletek miatt koagulálódott-irreverzibilisen kicsapódott mintafehérjéken. A pronáz enzim azonban a

rendelkezésre álló 20-24 óra alatt a mintától függően valóban elérheti a közel 100%-os hidrolízist (4. Melléklet táblázata). Mindennek háttérben az áll, hogy nem egyetlen, hanem a gyártótól függően akár 10, eltérő aktivitású (endo- és exo-, proteáz + peptidáz, valamint N- és C-terminális felől is hasító) fehérjebontó enzimről van szó [YAMSKOV 1986]; ezek eredője egy nem szubsztrátspecifikus, nagy aktivitású keverékben („crude” enzim) ölt testet, amely néhány különleges szerkezetű fehérjétől (pl. keratin: BERMEJO-BARRERA [1999]) eltekintve valóban szinte minden típusú fehérjét hidrolizálni képes. Némely gyártó (Sigma-Aldrich) a *S. griseus* által kiválasztott extracelluláris enzimkeverékből a legfőbb komponenst, egy szerin proteázt izolálva, kalcium-acetát kísérővegyülettel forgalmazza, kb. 4-5 U mg<sup>-1</sup> szilárd készítmény aktivitással. Más cégek (pl. Merck) meghagyják az összes, fehérjebontó aktivitással rendelkező enzimet, és három nagyságrenddel nagyobb összesített aktivitást érnek így el (4000 U mg<sup>-1</sup>). Mindezek ellenére – némileg meglepő módon – a közlemények 95%-át a kisebb aktivitású Sigma készítmény használata jellemzi, amelyet a táblázatban a Sigma-Aldrich katalógus nevezéktana szerint feltüntetett „proteáz XIV” túlsúlya támaszt alá.

A pronáz használatán alapuló egy lépéses mintaelőkészítés robbanásszerűen terjedt el az említett közlemény után, amelyhez nagymértékben járult hozzá az a szerencsés egybeesés is, hogy 1997-1998 körül számos nyugat-európai és egyesült államokbeli laboratórium indított el szeléndúsítási kísérleteket hagymafélék és élesztő felhasználásával. Ennek háttérben az 1996-ban lezárult, 10 évig vezetett CLARK-tanulmány sikere állt, mely szerint a szelénrel dúsított élesztő fogyasztása szignifikánsan csökkentette bizonyos ráktípusok (pl. a prosztatata- és tüdőrák) előfordulását [CLARK 1996, SCHRAUZER 2000]. Az elkészített, kilogrammos nagyságrendben rendelkezésre álló, kiemelkedő szeléntartalmú mintákat szétküldték a témával foglalkozó 4-5 kutatólaboratóriumnak, ahol az ezt követően felfutó feltárási-azonosítási kísérletek eredményei 1999 és 2001 között többtucatnyi (igényes) közleményben öltöttek testet (4. Melléklet táblázata).

E táblázat adataival kapcsolatban érdemes felhívni a figyelmet néhány érdekességre ill. magyarázatra szoruló jelenségre. Egyrészt szembeűnő a szelénrel dúsított, tehát étrendi szereppel (még) csupán alig jellemezhető mintatípusok, s legfőképpen az élesztő térnyerése. Ez teljes mértékben érthető: könnyen előállítható tesztmintáról van szó, számtalan kisebb-nagyobb cég gyártja és készít belőle tablettázott táplálkozáskiegészítőt, és a már említett CLARK-tanulmány [1996] is ennek fogyasztására épített. Elemzése egyszerre szolgál általános (pl. módszerfejlesztési) módosulatanalitikai célokat és a bizonyítottan rák megelőző tulajdonság háttérének kiderítését. További jellegzetesség az 1999-2000 körül hirtelen felfutó, egyre több módosulatot azonosító közlemények száma, amely a szelén módosulatanalitika eddigi legsikeresebb korszakát jelezte, lévén ekkorra érett egységes egészé a mintaelőkészítés, az elválasztástechnika (főleg a RP-HPLC) és a szelektív detektáláshoz szükséges műszerezettség (ICP-MS, ESI-MS). Ugyanakkor e három közül az első kettő még jócskán bír hiányosságokkal, hiszen a mai napig találkozni lehet kis kinyerési határfokkal jellemzett mintákkal. A táblázat utolsó oszlopa külön figyelmet érdemel: a felsorolt és azonosított módosulatok kb. háromnegyede csak kis számú kutatócsoport részére érhető el, ebből kifolyólag nem zárható ki, hogy a gyakran nem kielégítő azonosítási arány háttérben a kereskedelmi forgalomba még nem

bocsátott, standard vegyületek hiánya áll. Másrésről a csupán egyetlen elválasztási eljárást használó módszerek alkalmazása során szinte lehetetlen kizárni a különböző, akár ismeretlen szelénmódosulatok együttes elúciójából fakadó, téves azonosítást és mennyiségi meghatározást; így nem véletlen, hogy pl. a szelénnel dúsított élesztő elemzését bemutató közlemények meglehetősen hasonló (többnyire 80% feletti) azonosítási határfok-tartományt jeleznek – akkor is, ha 3, s akkor is, ha 8 módosulat adja ki ezt az értéket.

A pronáz működésére nézve optimális pH-értéket általában a 6-9-es pH-tartományokban jól használható szervetlen vagy szerves pufferekkel állítják be (4. Melléklet táblázata). Ugyanakkor találkozni lehet olyan közleményekkel is, ahol vélhetően a mintaelőkészítést követő mérés technika kívánalmainak megfelelően nem növelik meg a mintaoldat iontartalmát a pufferekkel bevitt sókkal, és csupán ioncserélt vizes közeget (pH~5,5-6) használnak. Személyes tapasztalatom szerint a nagy fehérjetartalmú minták pronázos bontása során a puffereletlen közeg pH-ja néhány óra alatt akár 2-3 egységgel is csökkenhet, amely a mintaoldatot kivonja az enzim optimális pH-tartományából, s így csökkenő kinyerési határfokhoz vezethet. Ebből fakadóan a 4. Melléklet táblázatában puffereletlen desztillált vizes közeggel végrehajtott kísérletekre utaló referenciák esetében feltüntetett, olykor az átlagnál kisebb extrakciós határfokok mögött ez a jelenség is állhat.

Időközben a pronáz mellett egyéb fehérjebontó enzim(keverék)ek is feltűntek a szelén módosulatanalitikai mintaelőkészítés porondján. Közös jellemvonásuk, hogy nem szubsztrátspecifikusak, és legtöbbjük korábbi (és jelenlegi) felhasználási területe a molekuláris biológiában DNS-RNS kivonatok fehérjementesítése ill. különböző szennyező (=káros aktivitású) vagy feladatukat elvégzett enzimek hidrolízissel történő inaktiválása. A baktérium eredetű szubtilizin (más néven VIII-as típusú proteáz; forrás: *Bacillus licheniformis*; EC 3.4.21.14), a penészek által termelt proteináz K (forrás: *Tritirachium album*; EC 3.4.21.64), és egy Novo enzimkeverék, a Flavourzyme (forrás: *Aspergillus oryzae*) különböző mértékben bizonyult alkalmasnak a minták szeléntartalmának kinyerésére, és az azonosított vegyületek aránya is eltérőnek adódott. Fontos kiemelni, hogy ez utóbbi mérőszám (az ún. „Column Recovery”) nagyban függ a rendelkezésre álló mérőrendszertől és standard vegyületektől, így a kutatócsoportok által közölt értékekben való eltérés nem feltétlenül utal a mintaelőkészítés sikeres/sikertelen voltára. Ugyanígy, maga a kinyerési határfok megállapítása sem tesz mindig lehetővé összehasonlítást, mivel a mintaelőkészítés tartalmazhat olyan, nem általánosan alkalmazott lépéseket (pl. centrifugálást követő ultraszűrés, TCA csapadékképzés), amelyek akár 10-20%-kal csökkenthetik az említett értéket.

A felsorolt enzimeket többen is összehasonlították abból a célból, hogy ki lehessen alakítani egy általánosan alkalmazható eljárási rendet. MORENO et al. [2001] kagyló- és osztrigamintákon próbálták ki szubtilizin és pronáz enzimeket. A csoport által párhuzamosan használt pufferek egyike (foszfátpuffer) a Sigma-Aldrich által gyártott pronáz készítményében található  $\text{Ca}^{2+}$ -sókkal csapadékot képzett, így kísérleteiket kizárólag szubtilizinnel folytatták. Mivel az összehasonlítást nem vezették végig – tehát nem próbálták meg a pronázt más, például TRIS-pufferrel alkalmazni, vagy például Merck készítményre váltani –, nem lehetett végső

következtetést levonni a két enzim használhatóságáról. GÓMEZ-ARIZA et al. [2002] adalékolt kagylómintákat kezeltek VIII-es típusú proteáz és pronáz enzimekkel; eredményeik szerint egyik sem volt tökéletesen alkalmas a négy tanulmányozott és mintához adalékolt szelénmódosulat (SeCys<sub>2</sub>, SeMet, Se(IV), Se(VI)) kinyerésére, amelynek az alkalmazott „clean-up” technika és az enzimekhez gyárilag kevert kísérővegyületek összeférhetlensége volt a legfőbb oka. MONTES-BAYÓN et al. [2002] proteináz K és pronáz összevetését végezték el indiai mustár szelén-fitoremediációs növénymintákon; a kinyerési hatások és az azonosított módosulatok területén a proteináz K valamivel jobbnak bizonyult a pronáz enzimhez képest. Ugyanakkor ebben a kísérletben puffereletlen közegben zajlott le az enzimes kezelés, amelyet a végeredmények kiértékelésénél nem vettek figyelembe.

#### 2.3.1.5.4. Enzimes hidrolízis – egyéb, nem fehérjebontó enzimek alkalmazása

A minták – lett legyen szó élelmiszerről, fitoremediációs vagy konyhakerti növényről – nem csak fehérjéből állnak: teljesen nyilvánvaló tény. Társítsuk ehhez azt a megfigyelést, hogy a fehérjebontó enzimekkel végzett enzimes mintaelőkészítések nem mindig vezetnek kiemelkedő (a frakciók összes szeléntartalmának megállapításán alapuló) szelénkinyerési eredményekhez. A szakirodalomban fellelhető, legkevésbé sikeres, XIV-es típusú proteáz használatán alapuló módosulatanalitikai mintaelőkészítés szelénrel dúsított tejsavbaktérium minta vizsgálatához fűződik, amelyből MICHALKE et al. [2002] mindössze kb. 8%-os kinyerési és 27%-os azonosítási arányt tudtak felmutatni. A háttérben két ok bújhat meg: egyrészt létezhetnek idáig még nem azonosított, nem fehérjékhez kötődő szelénmódosulatok, amelyeket a korábban felsorolt enzimek nem képesek polimereikből vagy bizonyos sejtalkotókról leszakítani, másrészt elképzelhető, hogy a valóban fehérjékben fellelhető szelénmódosulatokhoz nem tudnak az alkalmazott enzimek hozzáférni, mivel valamely mintakomponens ennek gátat szab. Rendszerint két olyan összetevő kerül reflektorfénybe, amely felelős lehet a kinyerési hatások csökkenéséért: növényi, baktérium és gomba eredetű mintáknál a sejtfal, amely a később mintául szolgáló alapanyag (pl. frissen szedett kalapos gomba) aprítási-szárítási-örlési és egyéb kezelésétől függően többé-kevésbé épen maradhat, ill. növényi és állati eredetű mintáknál a lipidtartalom. Így nem sokkal a korábban említett, 2. generációs mintaelőkészítéseket elindító közlemény [GILON 1995] után napvilágot láttak a sejtfal- és lipidbontó enzimek használatára építő mintaelőkészítési módszerek.

Elsőként 1999-ben szelénrel dúsított élesztő vizsgálatánál került sor a már jól bevált pronáz mellett egy élesztőgomba eredetű lipidbontó enzim (VII-es típusú lipáz, EC 3.1.1.3; forrás: *Candida rugosa*) alkalmazására [CASIoT 1999], még hozzá egyszerre, ugyanazon pufferelt oldatban. Elvileg a mintában lévő lipidek bontására két okból lehet szükség: egyrészt a kromatográfiás oszlopra juttatott mintaelegyben a lipidek jelenléte terhelheti leginkább a rendszert, másrészt a minta tartalmazhat lipoproteineket, melyek fehérjebontó enzimmal történő hidrolíziséhez azokat először hozzáférhetővé kell tenni. A GILON et al. [1995] közleményhez képest legalább ugyanolyan mértékben idézett munka azonban meglehetősen sok kérdést hagyott lezáratlanul, mivel nem végezték el – pontosabban nem említették – a két enzim által (egymástól

függetlenül) elérhető kinyerési hatásfokot, így nem derült ki, hogy valóban szükséges volt-e egyáltalán a lipidbontó enzim bevetése. Ráadásul a két enzim ugyanabban az oldatban történő használata felveti annak a lehetőségét, hogy a nem szubsztrátspecifikus fehérjebontó enzim a másik enzimet szubsztrátként kezelve annak aktivitását csökkenti. Bár módszerükkel még lehetett későbbi közleményekben is találkozni [CASES 2002], az 1999 után, szelénrel dúsított élesztő vizsgálatáról publikált több tucat cikk már nem említi a lipáz használatát. Tehát élesztőnél nem – azonban a nála nyilvánvalóan nagyobb mennyiségben lipidet tartalmazó tengeri eredetű élelmiszereknél igen. GÓMEZ-ARIZA et al. [2002] kagyló- és rákminták esetében csak lipázzal kombinált fehérjebontó enzimes kezeléssel tudtak kielégítő kinyerési hatásfokot elérni.

A CASIOT-közlemény [1999] vezette be – a lipázhoz képest jóval megalapozottabb módon és kézzelfoghatóbb eredményre jutva – a sejtfalbontó enzimeket is a szelén módosulatanalitika területére. Drizelázt, egy kalapos gombaféléből (*Basidiomycetes ssp.*) kivont „crude” enzimkeveréket használtak fel abból a célból, hogy az eredendően növényi és gomba protoplasztok készítésére alkalmazott, többek közt laminarináz, xilanáz, pektináz, amiláz, proteáz és celluláz aktivitással rendelkező készítménnyel az esetleg sejtfalhoz kötött szeléntartalmú komponenseket vagy módosulatokat felszabadítsák. A szerzők alaposságára jellemző, hogy PMSF adagolásával biztosították a drizelázból ill. esetleg magából az élesztőből származó fehérjebontó enzimek gátlását, megbízható alapot szolgáltatva a különböző enzimek által elérhető kinyerési hatásfokok összehasonlításához. A sejtfalbontó enzim segítségével szignifikánsan nagyobb mennyiségű szelént szabadítottak fel az élesztőből az ioncserélt vizes ill. pufferelt közeggel végzett extrakciókhoz képest, így indirekt módon bizonyították a szelén jelenlétét nem csupán fehérjékhez kapcsolódó molekulákban is. A rendelkezésre álló mérés-technika azonban még nem tette lehetővé számukra a sejtfalbontásból származó frakció további vizsgálatát, azonosítatlanul hagyva a minta szeléntartalmának kb. 15%-át kitevő komponenseket. WROBEL et al. [2002] baktérium (*Arthrobacter luteus*) eredetű, ugyancsak PMSF adagolásával kiegészített lizáló enzimkeverékkel tárták fel a mintául szolgáló, szelénrel dúsított élesztőt, hogy fehérjehidrolízis nélkül tanulmányozhassák a szelénanyagcsere köztes vegyületeit. MICHALKE et al. [2002] szelénrel dúsított tejsavbaktérium mintaelőkészítésénél a sejtfal szerkezetének megfelelően lizozim enzimet társítottak pronáz enzim használatával. A kezelések során a két enzimmel külön-külön és együtt is végrehajtották az extrakciós műveleteket, amelyek az összes szelénre vetítve kiemelkedő (85-105%), míg azonosított szelénmódosulatokra nézve rendkívül kicsi (8-12%) hatásfokra vezettek. Az előbbiben a pronáz, az utóbbiban a lizozim alkalmazása során nyerték ki / azonosították a legnagyobb mennyiségű szelént; a két enzim együttes alkalmazása nem jelentett egyértelmű előnyt. Mindezen eredmények mögött a nem tökéletes hidrolízis, a túlzottan kis számú, kereskedelmi forgalomban elérhető szelénmódosulat-standard ill. valószínűleg az előzetesen nem kezelt (pl. szárítás, őrlés elmaradása) minta enzimekkel szembeni részleges ellenállása mutatható ki.

LARSEN et al. [2001, 2003] elegáns és egyszerű eljárás segítségével hidalták át azt a problémát, amely az ugyanazon elegyben alkalmazott enzimek kapcsán merült fel. Szelénrel dúsított élesztő vizsgálatánál szekvenciális enzimes mintaelőkészítést állítottak össze, amelyben

első lépésként a Novo dán cég által gyártott „Novozym 234” ( $\beta$ -glükozidáz) sejtfalbontó enzimet adták a mintához, amelyet 3 óra után az ugyancsak Novo „Flavourzyme 1000L” széles szubsztrátspektrummal rendelkező fehérjebontó enzimkeverék hozzáadása követett. Bár a szerzők nem közölték az egyenkénti kezeléssel elért extrakciós hatásfok mértékét, az enzimek alkalmazásának egymásra építésével elsők közt tették lehetővé a két bontási fázis akár külön-külön végrehajtható optimalizálását.

Az emberi emésztést modellező (1. generációs) kísérletek túlnyomó része is – ugyan más célkitűzésből kiindulva, nem az előbbi gondolatmeneteket követve, de a végső módszert tekintve – hasonló végkifejletre jutott: a pepszin mellett egyéb, nem fehérjebontó enzimek is bevezetésre kerültek. A valamennyire életszerű modell felállításához ugyanis figyelembe kellett venni, hogy az elfogyasztott élelmiszerre enzimes családok egész sora támad, amelyek nem feltétlenül a szeléntartalmú komponenseket veszik célba, de a komplex élelmiszermátrix lebontásával hozzáférhetővé tehetik azokat. Érdekes kihívás mindez a mérés technika szemszögéből is, hiszen minél több monomer, vízoldható molekula, ion stb. szabadul fel és kerül a vizsgálandó szelénmódosulatokkal egy oldatba, a felvitt mintaelegy annál jobban terheli meg a kromatográfiás oszlopot vagy egyéb, elválasztási feladatokat ellátó berendezést és növeli meg a detektálás során tapasztalható interferencia mértékét. Leggyakrabban a keményítő-, lipid- és fehérjebontó aktivitással is rendelkező, hasnyálmirigy-kivonatból készített pankreatin szerepel a közleményekben az összetett enzimes kezelés tagjaként: szójamintánál [YASUMOTO 1983, 1988], sült húsnál és észak-amerikai piritósnál [THOMAS 2001], és főtt tonhálnál [CREWS 1996] általában semlegeshez közeli pH-értéken került felhasználásra, sokszor epesavakkal együtt (a lipidfázis emulgeálása céljából). Az utoljára említett tonhalminta esetében a pankreatinhoz hasonló pH-optimummal rendelkező és a szervezetben is a másik enzimkeverékkel egyidőben aktív hasnyálmirigy  $\alpha$ -amilázt is adagoltak a kutatók az emésztést végző enzimelegyhez. A korábban említett probléma, az enzimek együttes alkalmazásából fakadó esetleges aktivitáscsökkenés az emésztést modellező kísérleteknél nem jelent gondot, mivel mindez az emberi szervezetben is előfordul és a kinyerési hatásfok maximalizálása ezeknél a kísérleteknél nem képezi a vizsgálat célját.

#### 2.3.1.6. Kételyek az enzimes mintaelőkészítés kapcsán – új módszerek keresése

A maguk elé lehetőség szerint teljes kinyerést és azonosítást célul tűző kutatócsoportok 1995 után egymást követően, közlemények tucatjaiban tették le voksukat a pronáz – vagy más, nem specifikus fehérjebontó enzim(keverék)ek – felhasználása mellett, olykor 100% közeli kinyerési hatásfokokat és szelénmódosulat-azonosítási értékeket bemutatva. Ennek ellenére több jel is utalt arra, hogy legalábbis bizonyos minták esetében a nem kielégítő azonosítási hatásfokok hátterében nem a hiányzó szelénstandardok, vagy az enzimek fehérjékhez történő hozzáféréseinek gátlása, hanem egyértelműen a tökéletlen enzimes fehérjehidrolízis áll. MONTES-BAJÓN et al. [2001] szelénés élesztőből készített táplálékkiegészítő elemzésénél a proteínáz K-val történő bontást utólagosan aminopeptidáz-M segítségével tették teljessé. MORENO et al. [2001] osztrigák vizsgálatánál kénytelenek voltak a nagy feleslegben adagolt



szubtilizin enzimmel kétszer egymás után kezelni ugyanazt a mintát, hogy kielégítő extrakciós és azonosítási hatásfokot érjenek el. Az utóbbi esetben viszonylag nagy pufferkapacitású ( $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  TRIS-HCl, pH=7,5) oldatban, állati eredetű (=sejtfalat nem tartalmazó) mintával zajlott le a reakció, tehát az esetleg átlagnál nagyobb lipidtartalomtól eltekintve semmi sem gátolta a fehérjehidrolízist. VONDERHEIDE et al. [2002] zsírtalanított brazil dió proteináz K-val történő bontásánál a kevésbé komplex mintamátrix ellenére sem tudtak a 83%-ot kitevő kinyerési hatásfok mellett 11%-nál nagyobb mennyiségű szelénmódosulatot azonosítani. A felsorolt közlemények szerzői kísérleteik során arra utaló jeleket találtak, hogy az alkalmazott enzimek a mintafehérjéket nem hidrolizálták teljes egészében aminosavakig. Mindez részben érthető, ismerve a két említett enzim (a proteináz K és a szubtilizin) hasítási tulajdonságait, melyek nem feltétlenül biztosítják a szerzők által elvárt hidrolízisfokot. Ugyanakkor a GILON et al. [1995] közleményben felvezetett pronáz használatakor sem mindig sikerült 90-100%-ban kinyerni a szelénmódosulatokat a mintából (lásd 4. Melléklet táblázata), így valóban felmerült az igény egy új, nem az enzimes kezelés (és nem a  $6 \text{ mol l}^{-1}$  sósavas hidrolízis) alapjain nyugvó fehérjehidrolízis módszerre.

Végül WROBEL et al. [2003] ismertettek egy olyan megoldást, melynek lényege a metánszulfonsav  $4 \text{ mol l}^{-1}$  koncentrációjú, az oxidáció elkerülése végett  $\beta$ -merkaptóetanollal kiegészített oldatának használata. Szelénnel dúsított élesztőmintán és zsírtalanított brazil dión végzett kísérleteik szerint a legfeljebb 16 órás, melegített és refluxszal visszavezetett metánszulfonsavas elegy szignifikánsan nagyobb mennyiségű SeMet-t szabadított fel a mintákból, mint a párhuzamosan végzett, először proteináz K, majd XIV-es típusú proteázzal végzett szekvenciális enzimes kezelés. Ugyanakkor arra is fény derült, hogy a módszer a hőmérséklet emelése és az erőteljesen redukáló közeg miatt alkalmatlan a szerveszélénmódosulatok (és minden bizonnyal a SeCys) állapotának megőrzésére, és a SeMet egy része, kb. 2%-a biztosan károsodik a folyamat közben. Mindezekből az következik, hogy ezen új módszer csak rész megoldást kínált az esetlegesen fennálló problémákra, és további fejlesztések szükségesek ahhoz, hogy valódi alternatívát kínáljon a ma széles körben elfogadott és használt enzimes módszerek helyett.

#### 2.3.1.7. „Mintaelőkészítés” a szelén fehérjeszintű módszeranalitikai vizsgálataihoz

Az eddigiekben megszokottnak és általánosnak beállított, szelén módszeranalitikai mintaelőkészítési lépésekben volt két közös pont: egyrészt szilárd mintából indultunk ki, másrészt egészen az alkotó monomerekig vagy „szabadon álló” vegyületekig, aminosavakig, származékaikig vagy szerveszélén sókig hatoltunk le a molekuláris szerveződés-biokémia szintjein. Mindez nem feltétlenül szükséges, mi több: vannak esetek, amelyekben egyáltalán nem célszerű – hiszen eggyel magasabb szerveződési szinten, például a fehérjék között ott találhatóak a funkcióval rendelkező szelén-enzimek és a nem funkcionális (véletlenszerű) szelénbeépülésen átesett fehérjék; az előbbieket kivétel nélkül SeCys-ben, az utóbbiak SeMet-ként hordoznak szelént. Ezen molekulák megismeréséhez, jellemzéséhez hozzátartozik ép állapotban, hidrolízis nélküli vizsgálatuk is. Csak magában a humán élettani kutatások – és a velük párhuzamos

állatkísérletek is – egész sorát szolgáltatják azon mintáknak, melyek szeléntartalmú, és ismeretlen szereppel rendelkező fehérjéket tartalmaznak. Ezekben az esetekben a fehérjék hidrolízise csak részét képezheti az átfogó vizsgálatoknak; az ép fehérjék molekulatömeg-meghatározáson (SDS-PAGE, 2D-IEF, SEC, MALDI-TOFMS) és szerkezetvizsgálaton (NMR, ESI-MS/MS) jutnak keresztül abból a célból, hogy működésük és az élő szervezetben betöltött funkciójukat megismerhessük [BEHNE 1998, ŁOBIŃSKI 2000, CHEN 2002]. Fontos tisztázni, hogy mindenféleképpen határterületre értünk, hiszen élelmiszeripari szempontból lényegtelen, milyen funkcióval rendelkezik az adott, ételként elfogyasztott fehérje, ugyanakkor a bioanalitika és élelmiszer-kémia berkeiben kifejlesztett módosulatanalitikai mintaelőkészítés értékes hozzájárulásként nyilvánulhat meg a szelén élettani vizsgálatának kapcsán.

Az előbb leírt elemzések „belépőszintjét” azon fehérjevizsgálatok képezik, ahol lehetőség szerint egyetlen lépésben, közelítő molekulatömeg meghatározás után kerül sor a szeléntartalom megállapítására, és nincs mód (vagy értelme) a mintát szolgáltató rendszert befolyásolni az esetlegesen megváltozott körülmények által okozott változások kimutatásának céljából – vagyis a mintából kell visszafelé következtetni a kiindulási rendszerek különbözőségére és azok okaira. Jellegzetes példa erre az anyatej vizsgálata, ahol a szeléntartalmú fehérjéket és kisebb molekulákat SEC-HPLC vagy C(Z)E ill. IEF által történő elválasztást követően a közvetlenül vagy pl. ETV berendezésen keresztül csatolt ICP-MS detektálja, azok szeléntartalma alapján [MICHALKE 1997, 1998]. Ezeknél a mintáknál az előkészítés többnyire csupán centrifugálással történő zsíreltávolításban merül ki.

#### 2.3.1.8. Zárszó a szelén módosulatanalitikai vizsgálataihoz

A mintaelőkészítési módszerek ismertetése után érdemes pár szóval utalni a szelén módosulatanalitika fejlődésének azon érdekes jelenségére, hogy az azonosított módosulatokat illetően alig néhány év már elegendőnek bizonyult a korábbi mérések eredményeinek akár teljes körű felülvizsgálatához és megkérdőjelezéséhez. Mint ahogy a 4. Melléklet táblázatának eredményei jelzik, a leginkább tanulmányozott mintából, a szelénrel dúsított élesztőből több kutatócsoport is kimutatta a SeCys<sub>2</sub> jelenlétét – ugyanakkor egy 1999-ben elkészült tanulmány szerint az élesztőgenom nem tartalmazza az ezen aminosav szintéziséhez szükséges szakaszokat [KRYUKOV 1999]. Erre a tényre először LARSEN et al. [2003] hívták fel a módosulatanalitikai kutatásokkal foglalkozó szakemberek figyelmét, utalva arra, hogy a korábbi – valószínűleg téves – azonosítások háttérben a SeCys<sub>2</sub> általában visszatartással nem rendelkező, kromatográfias futtatás holtterefogatában más, akár ismeretlen komponensekkel együtt eluálódó viselkedése állhat. Ez az esemény összhangot mutat azokkal a megfigyelésekkel, hogy a módosulatanalitikai vizsgálatok detektálási feladatára a csupán elemszelektív műszerek olykor már nem nyújtanak biztos megoldást, és előtérbe kerül a molekulaszintű azonosításra alkalmas készülékek használata – ott, ahol az anyagi háttér vagy a nemzetközi kapcsolatrendszer mindezt lehetővé teszi [MCSHEEHY 2003b].

## **2.3.2. Módosulatanalitikai mintaelőkészítési eljárások arzénre**

### **2.3.2.1. Általános ismertetőjegyek**

Instabil oxidációs állapot – három szó, amely talán legjobban jellemzi az arzén módosulatanalitikai mintaelőkészítés általános problémáját. Ráadásul ezen jelenség a napjainkig megismert, kb. 25 As-módosulat közül sajnos pont a leginkább mérgezők körében tapasztalható: a szerves As(III) – As(V), a metilezett MMA(III) – MMA(V) ill. DMA(III) – DMA(V) kétirányú egyensúlyi átalakulás főleg az utóbbi származékok körében gyors és – ami talán a legfontosabbá teszi az egész kérdéskört – toxicitásban rendkívüli mértékben különböző módosulatok között játszódik le. Míg az As(III) és As(V) közötti átmenet gyakorlatilag az arzén módosulatanalitika hajnalától ismert, és a tanulmányozása révén szerzett tapasztalatok segítenek többek közt ivóvizeink As-mentesítésében (pl. az As(V) módosulat nanoszűrővel vagy fordított ozmózissal történő eltávolításán keresztül; BRANDHUBER és AMY [1998], URASE [1998], NING [2002]), addig a metilezett módosulatok instabilitása és egyáltalán: a jóval mérgezőbb három vegyértékű MMA(III) és DMA(III) jelenléte az emberi szervezetben és vizeletben „vadonatúj” megfigyelés [LE 2000, GONG 2002]. A háromértékű metilezett származékok oxidációjával (egyben tehát vegyértékvaltozással is) járó reakciói az általános mintaelőkészítési körülmények között néhány óra alatt végbemehetnek, így amennyiben jelenlétükre számítani lehet, különleges figyelemre van szükség [GONG 2001].

Eltekintve az utóbbi három évben felfutó, a humán arzénanyagcseréhez kapcsolódó vizsgálatoktól és mintáktól (vérszérum, vizelet, stb.), a legtöbb arzén módosulatanalitikai mérés három mintacsoportra összpontosul: öntöző-, ivó- és szennyvizekre, talaj-, iszap- és üledékvizsgálatokra ill. tengeri eredetű mintákra és az azokból készült élelmiszerekre. A három célterület közül az első kettő közös tulajdonsága, hogy gyakorlatilag csak a két szerves arzénszármazékot (As(III) és (V)) hordozzák, így mintaelőkészítésük során az egyik legfőbb kihívásnak a két származék közötti redox átmenet gátlása számít. Ugyanakkor a talaj- iszap- és üledékvizsgálatok mintaelőkészítése külön ággá fejlődött, mivel e két módosulat együttes kinyerése meglehetősen bonyolult, többlépcsős extrakciós módszereket, ún. SEP(T) /sequential extraction procedures(techniques)/ eljárásokat tesz szükségessé. A harmadik ág különleges szerepet tölt be az arzén módosulatanalitikában: az ehhez a csoportba tartozó mintákban fedezték és fedezik fel napjainkban is az új arzénmódosulatok 95%-át, és ennek a csoportnak tulajdonítható, hogy az arzén módosulatanalitika a higany után talán a legnagyobb sajtónyilvánosságot kapó módosulatanalitikai területnek számít. Mindennek oka prózaian egyszerű: kizárólag a módosulatanalitika képes feloldani a látszólagos ellentmondást a tengeri élelmiszerek olykor kiemelkedő arzéntartalma és az ennek ellenére „hiányzó” mérgezési problémák között. Az elmondottakból fakadóan a mintaelőkészítések és a hozzájuk kapcsolódó vizsgálatok a legutolsó mintacsoportnál két fő irányvonal mentén zajlanak: olykor elegendő a mintából kinyerni és meghatározni csupán a mérgező(bb) szerves arzénszármazékokat (akár indirekt módon, hidridfejlesztési képesség vizsgálatán keresztül), amely megközelítés viszonylag kis kinyerési hatásokkal járhat együtt; máskor cél a lehetőség szerint teljes mértékű azonosítás.

Természetesen a két megközelítés mind módszereiben, mind mintáikban át- meg átszövi egymást, így elkülönítésük az elmúlt évek közleményeiben már kevésbé érvényesül.

### 2.3.2.2. „Mintaelőkészítés nem igénylő” esetek: folyékony minták az arzén módosulatanalitikában

A folyékony mintákat a szilárd mintákhoz képest „nem szükséges” előkészíteni – már amennyiben a mintaelőkészítés fogalma alatt a meghatározandó komponens mérhető állapotba történő hozatalát értjük, amely rendszerint oldatba vitel formájában testesül meg. Ugyanakkor néhány alapvető műveletet mindenképpen el kell végezni a mintával, amelyek között a legáltalánosabbnak a 0,45 µm szűrő segítségével történő tisztítási (és elvileg sterilizálási) lépést vehetjük, ugyanis az esetlegesen jelen lévő szilárd szemcsék, csapadékok ill. sejtek lerakódásukkal eltömhetik mind a kromatográfiás oszlopot, mind pedig a porlasztórendszereket. Ugyanakkor feltétlenül említést kell tennünk a minta tárolásáról is, hiszen a minta stabilitásához nagymértékben hozzájáruló szűrést nem feltétlenül követi azonnal a mérés folyamata. A korábban említett, redox egyensúlyban lévő szervesetlen és metilézett As-módosulatok stabilitását alapvetően 4 tényező, a hőmérséklet, a módosulatok koncentrációja, a pH és a mintamátrix határozza meg. Általános szabályként az mondható el, hogy 20 µg ml<sup>-1</sup>-nél nagyobb koncentrációban, hűtőben (egyben tehát a fénytől is védve), fagyasztás nélkül (0 és 4°C fok között), ioncserélt vízben oldva a módosulatok standardjai ill. a szűrt talaj-, ivó- és szennyvizekben található módosulatok kielégítő mértékű stabilitással bírnak több héten keresztül [JÓKAI 1998, LINDEMANN 2000]. Egyedüli kivételnek az oxidációra rendkívüli érzékeny DMA(III) számít, amely az előzőekben leírt tárolási körülmények között sem stabilabb 2-3 napnál hosszabb ideig, és DMA(V) módosulattá alakul [GONG 2001]. Vizeletminták esetén a három vegyértékű DMA és MMA még hűtőben tárolva sem stabilabb egyetlen napnál, mi több, a DMA(III) órák alatt 100%-ban öt vegyértékűvé oxidálódik. Amennyiben tehát a vizeletből e két módosulat meghatározása a cél, úgy a méréseket lehetőség szerint *in situ* kell elvégezni; egyéb módosulatoknál az akár néhány hetes, hűtőszekrényben való tárolás sem okoz szignifikáns változást. A tartósítószeres használatát célszerű elkerülni, mivel nem javítják érdemben a módosulatok stabilitását, míg az oxidáció ellen adagolt vegyületek (pl. aszkorbinsav) hozzájárulhatnak az öt vegyértékű módosulatok redukciójához, megváltoztatva az eredeti egyensúlyt és ismeretlen, a standardokhoz képest eltérő retenciós idejű komponensek kialakulásához vezethetnek [LARSEN 1993, EDWARDS 1998, HALL 1999].

Érdemes kiemelni, hogy az oldatok fagyasztása rontja mind a vizeletminták, mind pedig a valódi mintákból származó extraktumok As-módosulatainak kinyerési értékeit, így tárolásra nem célszerű 0°C foknál kisebb hőmérsékletet választani [FELDMANN 1999].

Kiemelkedő vastartalommal rendelkező talaj- és ivóvizek mérésénél a mintát feltétlenül savanyítani érdemes abból a célból, hogy meg lehessen előzni a vas-oxi-hidroxidok és az arzén együttes kiválását. Az oldat kémhatását általában sósavval, pH=1-2 állítják be; a minta túlzott savanyítása azonban kerülendő az As(III)-As(V) egyensúly érzékenysége miatt [FELDMANN 1999, RAESSLER 2000].

Legvégül szólni kell a kifejezetten a mérőrendszer által igényelt mintaelőkészítési lépésekről. Amennyiben vizeletmintákat közvetlenül, kromatográfiás elválasztás nélkül, ICP-MS berendezés segítségével elemezzük, úgy elkerülhetetlen a minta legalább 1:5 arányú hígítása, mivel a vizelet kb. 1 m/m %-os NaCl tartalma az átlagos felbontású MS készülékek esetén szinte lehetetlenné teszi az egy izotópos  $^{75}\text{As}$  mérését a 75-ös tömegszámra jelentkező  $\text{ArCl}^+$  többatomos interferencia miatt [LINTSCHINGER 1998]. Egyéb, pl. ICP-OES vagy AAS berendezések használatánál ez a probléma nem lép fel [BECKER-ROSS 2000]. A vizeletminták hígítása az  $\text{ArCl}^+$  zavarás mérséklése mellett közvetett módon, a mátrixban lévő oxidáló vegyületek koncentrációjának csökkentése révén az As(III) módosulat stabilitásához is hozzájárul [LARSEN 1993].

### 2.3.2.3. A metanol-víz oldószer-páros és a szerves oldószerek szerepe szilárd minták előkészítése során

Ahogy a tudomány mai állása szerint a szelén módosulatanalitikai mintaelőkészítése szinte elképzelhetetlen enzimes módszerek nélkül, úgy az arzén módosulatanalitika sem említhető meg a metanol és víz különböző arányú elegyével végzett extrakciók nélkül. Az első, kifejezetten arzén módosulatanalitikai mintaelőkészítés céljából alkalmazott metanolos kezelés 1988-ban történt bemutatása óta [BEAUCHEMIN 1988] gyakorlatilag nem létezik olyan szerves eredetű, arzéntartalmú minta, amelynek mintaelőkészítése során ne végezték volna el legalább összehasonlítási céllal ezt az extrakciós műveletet. A kezelés háttérében azon ismeretünk húzódik meg, hogy az élő szervezetben az arzén detoxikáció gyakorlatilag teljes folyamata fehérjékhez kapcsolatosan zajlik le: fehérjék szállítják, enzimek metilezik és transzportfehérjék segítségével zajlik le a vizeleten keresztüli kiválasztás is [STÝBLO 2002]. A fehérjék térszerkezetét irreverzibilisen megváltoztató metanolos kezelés felszabadítja és oldatba viszi a detoxikálási folyamat különböző szintjein időző arzénmódosulatokat, így azok a mintából kinyerhetővé válnak.

Elméletileg. A gyakorlat azonban azt mutatja, hogy a kinyerési hatásfokot mind a minta jellege, mind pedig a benne fellelhető módosulatok képesek befolyásolni. Ennek háttérében főleg egy összetételi paraméter, a minta zsírtartalma áll, összefüggésben a hidrofób molekulaszakaszokkal rendelkező As-módosulatokkal. A kinyerési hatásfok növelésének érdekében tehát célszerű lehet a metanol-víz kettőssel végzett extrakciót a minta zsírtartalmának eltávolítását-elkülönítését célzó szerves oldószeres kezeléssel összekapcsolni. Mindez azért is fontos, mert a metanolos extraháló oldószerkelet emulziót képezhet a minta zsírtartalmával, amely rendkívüli mértékben megnehezítheti a mintaelőkészítés folytatását, és szignifikáns értékben csökkentheti az elérhető kinyerési hatásfok értékét [YBÁÑEZ 1995]. Emiatt a kezelés legtöbbször úgy zajlik le, hogy a mintát először kloroform-metanol meghatározott arányú elegyével extrahálják rázógéppel vagy ultrahangos készülékkel, majd centrifugálás segítségével kiülepítik a szuszpenzióból a mintaszemcséket és a felülúszót metanol-víz hozzáadása után választótölcsérben osztják meg. Az elkülönítés után szerves fázisban maradó arzén mennyiségét az oldószer elpárologtatása után rendszerint hagyományos roncsolással, összes arzénként – tehát

módosulatanalitikai vizsgálatok nélkül – adják meg; az utóbbi elemzések tárgyát a metanol-víz fázis arzéntartalma képezi, rendszerint a metanol vákuumbepárlással történő eltávolítását követően [lásd 5. Melléklet táblázata].

Amennyiben a minta összetétele – jelentős mennyiségű lipidtartalom híján – nem indokolja szerves oldószerek alkalmazását, úgy a művelet gyakorlatilag egymás után többször – legfeljebb ötször – megismételt, metanol-víz eleggyel elvégzett extrakcióra és centrifugálásra korlátozódik. Ezt követően az összetartozó felülúszókat egyesítik és a fent leírt elv alapján járnak el vele. A metanol-víz arányt illetően nem létezik általános recept, ugyanis figyelembe kell venni az elemzendő minta víztartalmát is. Tisztán metanolt csak akkor érdemes alkalmazni, amennyiben a minta friss és kezeletlen, tehát sem hagyományos, sem pedig fagyasztva szárításon nem ment keresztül – ekkor ugyanis a mintától függően akár 80-90%-ban jelen lévő víz „hígítja ki” megfelelő mértékben a metanolt [MCSHEEHY 2000, SZPUNAR 2000]. 100%-ban metanollal végzett extrakcióra csak a viszonylag korai közlemények sorában találni példákat [YBÁÑEZ 1995, VELEZ 1995, SHIOMI 1995]; mindez arra utal, hogy a hidratált fehérjéktől könnyebb elválasztani és kinyerni az arzénmódosulatokat. Általában az 1:1 V/V körüli (40:60, 50:50, 60:40) metanol-víz arány bizonyul a legjobb választásnak, ugyanakkor nem ritka az olyan közlemény, ahol az 1:9 elegyítést találták a legjobbnak [JÓKAI 1998] – ill. olyan eset is előfordul, hogy egyáltalán nem tapasztaltak eltérést a különböző arányú oldószerelegyeknél, a teljes, 0-100 V/V % közötti metanol tartományt figyelve [MCSHEEHY 2001b]. Ehhez hasonló következtetésre jutottak LAGARDE et al. [1999], akik közleményükben a „BCR-CRM 627” arzén módosulatanalitikai tonhal CRM hitelesítési körelemzése során tapasztalt érdekességek között említették meg a metanollal és metanol nélkül végzett minta-előkészítések azonos kinyerési hatásfokát. Talán a legszokatlanabb és legkevésbé a metanol használatával elérhető kinyerési hatásfokkal kapcsolatos indokot a HELGESEN és LARSEN szolgáltatották [1998]: arzéntartalmú talajon termelt répák vizsgálatánál az extraháló oldószerelegyben csupán antibakteriális céllal használtak 10 V/V % metanolt.

Az 5. Melléklet táblázata a különböző (tengeri, szárazföldi, élelmiszer stb.) minták tekintetében nyújt áttekintést az alkalmazott oldószerarányokról és az elért extrakciós hatásfokértékekről. Kizárólag olyan közlemények kerültek bemutatásra, melyeknek szerzői a legfőbb alkotó (pl. AsB) vagy lehetőség szerint az összes extrahált módosulat mennyiségi meghatározására törekedtek. Mindez – sajnos – nem minden esetben járt együtt összes As-mérleg felállításával, illetve a közölt értékek alapján néhol meglehetősen összetett feladatnak bizonyult a kinyerési vagy azonosítási arány kiszámolása: a szerzők néha még a minta összes As-mennyiségét sem közölték egyértelmű módon. A „felhasznált (esetenként leghatékonyabb) oldószer V/V arány” oszlopban feltüntetett értékek értelmezésénél figyelembe kell venni, hogy az adatok a mintához adott oldószerek arányát jelzik, nem pedig a minta víztartalmával korrigált értéket, így az értékek a közvetlen összehasonlításhoz nem minden esetben szolgáltatnak alapot. A közlemények jelentős részében a metanol-víz oldószeres extrakció mellett más fajta (pl. enzim) minta-előkészítés is helyet kapott; ezekben az esetekben a feltüntetett táblázati értékek csak az előbbi módszer segítségével elért hatásfok-értékeket tartalmazza. Amennyiben nem a

metanol-víz módszer bizonyult a leginkább hatékony kezelésnek, úgy az azonosított módosulatok sora a végső módszer felhasználásával kimutatott típusokat tükrözi.

Mindenképpen magyarázatra szorul a táblázat „Azonosítási arány, a kinyert As %-ában” oszlopa. A módosulatanalitikai közleményekre sajnos jellemző, hogy a szerzők gyakran elmulasztják megadni az ún. „Column Recovery” értéket, amely az azonosított és mennyiségileg meghatározott módosulatok arányát mutatja a minta összes vagy extrakcióval kinyert arzéntartalmához képest. Ennek ismeretében elvileg egyszerűen eldönthető, hogy az adott módszer – a mintaelőkészítéstől kezdve a kalibrációig, detektálásig stb. – milyen mértékben és milyen minőségben volt képes a vizsgált minta módosulatainak azonosítására. A gyakorlat azonban kissé bonyolultabb képet fest ezen érték megadásáról. Egyrészt a különböző módosulatokat a rendelkezésre álló standard vegyületek eltérő tisztasága, koncentrációjuk pontossága, a mintaelőkészítés által csatolt szórástényező, a kromatográfiás elválasztás során kialakult csúcstisztaságuk más és más bizonytalansági értékkel esik latba a végső mennyiségi meghatározás során, nem is beszélve bizonytalanságuk függéséről, amelyet az adott mintában kimutatható koncentrációjuk rendkívüli mértékben befolyásol. Talajok, üledékek és magasabb rendű növényi minták esetében, amelyek szinte kizárólag szervesetlen As-módosulatokat hordoznak, a „100% körül” bejegyzés valódi eredményt takarhat. Állatoknál és alacsonyabb rendű növényeknél azonban a mai napig „házilag” kénytelen a kutató szintetizálni vagy ismert mintából izolálni és tisztítani az As-módosulatok számos képviselőjét – feltéve, hogy egyáltalán tudomást szerzett valamilyen úton-módon arról, hogy mely különlegesebb módosulat várható az általa vizsgált mintában. A régóta ismert, és standardjaikat tekintve reménytelenül elérhetetlen arzenocukrok mellett tipikus állatorvosi lónak számít a macskacápa izomszövetből készített, DORM-1 CRM-et 1996-ban felváltó DORM-2 esete. Ez a CRM 1999-ig hálás, „100% körüli” azonosítási arányú mintának számított [ACKLEY 1999], majd 2000-ben FRANCESCO et al. [2000] kimutatták, hogy egy korábban ismeretlen AsB származék alkotja a minta arzéntartalmának jelentős részét. Ettől kezdve az AsB-2-nek vagy TMAP-nek nevezett módosulatot DORM-2-ből – és az időközben ugyancsak AsB-2-t hordozó CRM-ként azonosított TORT-2-ből – preparatív kromatográfiás módszerekkel nyerték ki [MCSHEEHY 2001b, KIRBY 2002], és a „100% körül” érték valósággá válhatott. Természetesen ezen eredmények is rendelkeznek „átfutási idővel”, tehát a már bejáratott elválasztási módszereket csak lassan váltják fel a már AsB-2-t is minőségileg meghatározhatóvá tévő eljárások: például PARDO-MARTÍNEZ et al. [2001] közleményében a DORM-2 mint 100%-ban AsB-t hordozó CRM-ként kerül minőségbiztosítási alkalmazásra. Ugyanakkor más mintafajtáknál, így algáknál, hínároknál az arzenocukrok annyi új válfaja válik ismertté napjainkban is, hogy a DORM-2 és az AsB-2 esete valószínűleg még évekig analóg, azonosítási siker nélküli példának számít majd ezen minták körében, kérdésessé téve a 100%-os módosulatazonosítást.

Az 5. Melléklet táblázata jól tükrözi, hogy a metanollal végzett oldószeres extrakció a minták jelentős részénél kielégítő kinyerési hatásfokhoz vezet. Ugyanakkor ez a módszer két, napjainkban egyre fontosabbnak nyilvánított területen részben elmaradottnak, fejlesztésre várónak számít; e két terület a vezérelhetőség-automatizálhatóság ill. a rövid időigényű kezelés

kialakítása. A hagyományos metanolos kezelést rázógéppel segítségével hajtjuk végre, majd ezt követő centrifugálással és manuális fázisválasztással fejeződik be a mintaelőkészítés, és mintától függően akár 10-12 órát is igénybe vehet. Az elmúlt években két olyan technológia bevezetésére is sor került, amelyeknek az előző módszer helyébe kellett volna lépnie: az ún. ASE (Accelerated Solvent Extraction, gyorsított oldószeres extrakció; ritkábban PLE, Pressurized Liquid Extraction, nagynyomású folyadék extrakció) és a MAE (Microwave Assisted Extraction, mikrohullámmal támogatott extrakció).

Az ASE 1999-ben bukkant fel az arzén módosulatanalitika területén [MCKIERNAN 1999]. A módszer lényege abban rejlik, hogy az általában 3-11 ml térfogatú extraháló edényben elhelyezett mintát a kiválasztott oldószerrel nagy nyomáson (3-21 MPa) és hőmérsékleten (150-200°C) extrahálják [GALLAGHER 2001]. Az ASE készülék a kezelés összes jellemzőjét (időtartam, hőmérséklet, nyomás, oldószeres) automatikusan szabályozza és állítja be, kiemelkedő reprodukálhatóságot biztosítva. Mindezek ellenére az ASE technológia mégsem (ill. talán inkább „még nem”) tudott elterjedni, ugyanis extrakciós hatásokban nem képes túlszárnyalni ellenlábását, a hagyományos metanolos extrakciót [MCKIERNAN 1999], ill. ha mégis sikerülne, akkor rendszerint metanol nélkül, 100%-ban ioncserélt vizet alkalmazva, amely viszont a duzzadásra hajlamos minták esetében a készülék eldugulását váltja ki [GALLAGHER 2001, HEITKEMPER 2001]. Ráadásul az ASE kielégítő kinyerési hatásfokot többnyire csak 100°C-nál nagyobb hőmérsékletnél tud elérni, ahol viszont egyértelmű As(III)-As(V) átalakulás következik be [SCHMIDT 2000]. A másik automatizált technológia, a MAE sem bizonyította átütő erővel, hogy képes lenne a hagyományos oldószeres extrakció szerepét átvenni a mintaelőkészítés területén: HELGESEN és LARSEN [1998] ill. LARSEN et al. [1998b] csak meglehetősen körülményes eljárással, a mikrohullámú energia túlzott elnyelődése ellen védő, általuk „ballasztvíznek” nevezett – és mintánként többször cserére szoruló – vízköpennyel tudták elérni, hogy a csupán 75 W teljesítménnyel üzemelő mikrohullámú készülék ne hevítse túl a mintát; ebből fakadóan a kezelés időigénye összevethető mértékűvé vált a kiváltandó hagyományos eljárással. Ezen a technikai jellegű problémán ACKLEY et al. [1999] csak mintatartóhelyenként szabályozott hőmérsékletű és nyomású, igen költséges berendezés segítségével tudtak átlépni, és egy tengeri hal CRM-ből 100% körüli extrakciót elérni. KIRBY és MAHER [2002] RSM statisztikai eljárással két CRM-en optimalizálták a mikrohullámú berendezés segítségével, 1:1 V/V arányú metanol-víz eleggyel végrehajtott arzénextrakció körülményeit, melyet ezek után tíz másik CRM mintaelőkészítésére alkalmaztak – változó sikerrel: a minták egy részéből csak 66-76%-os kinyerést értek el.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy a rázógéppel vagy ultrahangos készülékben metanol-víz oldószerrel végzett szilárd-folyadék extrakció minden hátránya ellenére stabilan őrzi vezető helyét az arzén módosulatanalitikában, és a modernebb eljárások kizárólag az automatizáltság területén tudják megszorítani. Ugyanakkor világossá vált az a tény is, hogy a minta jellege és eredete döntő mértékben, kinyerési hatásokra vetítve akár 20-30%-ban is képes befolyásolni az akár végletekig optimalizált mintaelőkészítési folyamat végeredményét.



#### 2.3.2.4. Enzimes módszerek felhasználási területe az arzén módosulatanalitikában

A szelén és az arzén módosulatanalitikai enzimes kezelések között alapvető különbség fedezhető fel. Amíg a szeléntartalmú mintáknál az enzimes eljárás közvetlenül a szelénmódosulat kinyerését célozza meg, például a kovalens (peptid)kötésű szeleno-aminosavak fehérjékből történő le- ill. kihasításával, addig az arzéntartalmú minták esetében ez a behatás közvetett: a kezelés a minta mátrixát, a főbb alkotó komponenseket bontja le, hogy fizikailag hozzáférhetővé tegye az arzénmódosulatokat. Ebből fakadóan nincs szükség sem a nem specifikus (széles szubsztrátspektrumú), sem pedig a nagy tisztaságú, nagy aktivitású (egyúttal költséges) enzimek használatára. Mivel az arzénmódosulatok nem monomerekként találhatók meg az élő szervezet valamely alkotójában, a nem tökéletes enzimes hidrolízis nem rejti magában a szelénmódosulatoknál megismert, különféle oligomerek kialakulása miatt fellépő azonosítási hibák lehetőségeit.

Az arzén módosulatanalitika területén az enzimes kezelések csupán a 90-es évek elején jelentek meg. BRANCH et al. [1994] hét különböző tengeri hal mintaelőkészítését végezték el a hagyományosnak mondható kloroform-metanol-víz extrakcióval és ezzel párhuzamosan – nagy fehérjetartalmú mintáról lévén szó – tripszines bontással. Eredményeik nem tükrözték egyértelműen a tripszin alkalmazásának előnyeit, mivel a halak fajtájától függően jobb vagy rosszabb kinyerési hatásfokot sikerült elérni a szerves oldószeres extrakcióhoz képest, és az enzimes eljárás időigénye az utóbbi többszörösének adódott. LAMBLE és HILL [1996] az előző csoporttól átvett tripszines bontással 87% feletti extrakciós hatásfokig jutott két tengeri eredetű CRM vizsgálatánál, és mind az összes arzén mérleg, mind pedig a módosulatanalitikai értékek egyezést mutattak a hiteles ill. korábban közölt adatokkal. A két közlemény feltehetőleg azért jutott eltérő eredményre, mert az első esetben valódi minták, míg LAMBLE és HILL munkájában „csupán” CRM vizsgálatára került sor, tehát az utóbbi minták minden bizonnyal könnyebben feltárható anyagot jelentettek a mintaelőkészítés számára. PARDO-MARTÍNEZ et al. [2001] – ugyancsak a BRANCH-alapközleményre építve – hekk-, nyelvhal- és ördöghalatartalmú bébiételek As-módosulatanalitikai mintaelőkészítését végezték el tripszin és pankreatin enzimek segítségével. Vizsgálataik során a tripszin tökéletesen alkalmasnak bizonyult a meglehetősen komplex mátrixú minták feltárására és a – méréseik szerint – szinte kizárólag AsB-ből álló As-módosulatok kinyerésére, míg a pankreatin a módosulatok átalakulását váltotta ki, így használatát elvetették.

A fehérje mellett a keményítő számít olyan, nagy mennyiségben jelen lévő, enzimesen könnyen lebontható mátrixalkotónak, melyet arzén módosulatanalitikai mintaelőkészítés folyamatában enzimes úton próbáltak meg eltávolítani ill. megbontani. HEITKEMPER et al. [2001] rizsfajtákon végeztek arzén módosulatanalitikai vizsgálatokat, mely során 4 különböző mintaelőkészítési eljárást hasonlítottak össze, köztük  $\alpha$ -amilázzal végzett feltárást is. Ez a technika a metanolos extrakció előfutáraként alkalmazva a második legjobb kinyerési hatásfokot (59%) biztosította a TFA-val végrehajtott extrakció mögött, szignifikánsan megelőzve a tisztán metanollal végzett kezeléseket. Ugyanakkor több mint fél napos időigénye miatt nem folytatták vele a kísérleteket, így nem lehet megállapítani, hogy az enzim alkalmazása vajon csak

mennyiségileg vagy minőségileg is teljesebb képet adott-e volna a minta arzéntartalmáról. CARUSO et al. [2001] fagyasztva szárított, arzéntartalmú almaminták vizsgálatánál viszont egyértelműen az  $\alpha$ -amiláz által biztosított, legnagyobb elért kinyerési hatásfokról számolhattak be: az enzim használatával szignifikánsan, 10-20%-kal szárnyalták túl a hagyományosnak mondható metanolos-vizes extrakciók eredményeit – még úgy is, hogy a 6 órás kezelést nem rázógépen, hanem ultrahangos fürdőben hajtották végre, amely nem kifejezetten általános eljárás az ilyen jellegű behatásokra meglehetősen érzékeny enzimek tekintetében. Mindenesetre érdemes megjegyezni, hogy az előző két mintánál – vagy eredendően, vagy liofilezés útján – a keményítő lépett elő fő mátrixkomponenssé, így annak bontása során a kutatók teljes joggal várhatták a kinyerési határfok javulását. Ugyanakkor sem a rizs-, sem pedig az almaminta esetében nem képezett az  $\alpha$ -amiláz kezelés önálló előkészítési lépést, mivel az enzimes keményítő hidrolízis csupán előkészítette az utána következő metanolos kioldást – vagyis még inkább bizonyítottnak látszik azon értelmezés, miszerint az  $\alpha$ -amiláz enzimes kezeléseket „csupán” az arzénkomponensek hozzáférhetőségének javítása céljából kerülnek alkalmazásra, és felhasználásuk a „fő” mintaelőkészítés előfutárának szerepére korlátozódik.

#### 2.3.2.5. Pufferelt közegek és híg savak/lúgok alkalmazása: szekvenciális mintaelőkészítés a műveletileg meghatározott arzén módosulatanalitikában

Bár a „szekvenciális” kifejezés elvileg minden olyan mintaelőkészítési folyamatra alkalmazható, amely egymás követő lépésekből, pl. szerves oldószerrel végrehajtott zsírtalanításból és az utána alkalmazott, metanol-víz szilárd-folyadék extrakcióból áll, azonban a kifejezéssel leginkább összekapcsolódó fogalom, a SEP (Sequential Extraction Procedure, szekvenciális extrakciós művelet) jellegzetesen a talajok, üledékek sajátja. Az olykor több napot igénybe vevő, egymás után más és más extrakciós közegekkel dolgozó művelet sor alkalmazása azon a felismerésen alapul, hogy a talajok/üledékek eltérő szerkezetükből, összetételükből és eredetükből fakadóan különböző módon és erősséggel kötik meg a fémionokat. Ebből az következik, hogy pl. növénytermesztési területről származó talajminták teljes – királyvízzel és folyssavval végzett – feltárása során kinyert, esetleg kiemelkedő toxikus fémion-mennyiség nem feltétlenül jelent veszélyt a terményekre és azon keresztül a fogyasztóra, mivel biológiai hozzáférhetősége többek közt az adott elemtől és módosulatától, a természetett növénytől, az aktuális időszakban hullott csapadék kémhatásától függően akár elhanyagolható mértékű is lehet.

A biológiailag hozzáférhető arzén ugyanakkor az átlagosnál nagyobb figyelmet igényel, mivel mind a természetett növényekben, mind pedig a gyomnövénytársulásokba főként a szerves és toxikus arzénmódosulatok, az As(III) és As(V) formájában épül be [HELGESEN 1998, MATTUSCH 2000] – ráadásul e kettő közül az emberre még toxikusabb As(III) a gyakoribb beépülési forma, mivel a növények számára viszont a talajból a foszfátanyagcsere és felvétel útján versengéssel bejutó As(V) a mérgezőbb, így azt redukcióval, detoxikáció céljából arzenitté alakítják [MATTUSCH 2000, ZHANG 2002]. Kiemelt fontosságú tehát, hogy a természetésre szánt talajok ill. a talaj feljavítását célzó szennyvíziszapok és tavakból, folyókból

kikotort üledékek hozzáférhető As-tartalmát a lehető legpontosabban megállapítsuk. Ezen feladathoz, minden mintára érvényes, kizárólagosan követendő szekvenciális extrakciós művelet sor nem létezik. Különböző „iskolák”, szabványügyi testületek, ideiglenesen működő hivatalok (pl. a BCR) ajánlásai alapján választhatja a kutató vagy az ellenőrző állomás az adott mintára leginkább illeszkedő eljárást. A következőkben kizárólag olyan példák bemutatására kerül sor, ahol az elemzés részben vagy teljes egészében az arzénre irányult.

A magyarországi „veszprémi iskola” 1997-ben fejlesztette ki a főleg üledékek vizsgálatára szánt, 4 lépéses „leaching” (kioldási) folyamatot [BÓDOG 1997], amely a következő frakciókat nyeri ki a lépések során: (a) a környezettel dinamikus egyensúlyban lévő és karbonáthoz kötött /0,11 mol l<sup>-1</sup> ecetsavas extrakcióval/; (b) Fe- és Mn-oxidokhoz kötött /extrakció 0,1 mol l<sup>-1</sup> hidroxil-ammónium hidrokloriddal/; (c) szerves anyaghoz és szulfidokhoz kötött /8,8 mol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alkalmazása/; (d) savban oldható /cc. HNO<sub>3</sub> és HClO<sub>4</sub> adagolása/. Ezt a leírást követte POLYÁK és HLAVAY [1999], amikor a balatoni üledékből 15 helyen történő mintavétellel a tavat terhelő – többek közt toxikus (As, Cd) – elemek bekerülésével kapcsolatos elemzésüket hajtották végre. A teljes művelet sor kb. 60 órát vett igénybe. A frakciók arzéntartalmát nem az eddigiekben ismertett oxidációs állapot, hanem ún. műveletileg meghatározott módosulatanalitika (frakcionálás) szerint tudjuk értelmezni. Mindez azt jelenti, hogy az adott kezelés által kinyert összes As-mennyiséget tekintjük egyfajta As-frakciónak.

WENZEL et al. [2001] kifejezetten a talaj As-tartalmának frakcionálását célzó, 5 lépéses SEP-et mutattak be, amelyet 20, részben iparilag szennyezett talajminta vizsgálatánál használtak fel. Az általános módszerektől részben eltérő megközelítést az arzén oxianion jellege indokolja. A művelet sor összességében kb. 30 órát igényel és a következő terminológiai alapokon épül fel: (a) nem specifikusan adszorbeálódott As /0,05 mol l<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/; (b) specifikusan adszorbeálódott As /0,05 mol l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/; (c) amorf és nem tökéletes kristályszerkezetű Fe- és Al-oxihidroxidok /0,2 mol l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>-oxalát puffer, pH=3,25/; (d) tökéletes kristályszerkezettel jellemezhető Fe- és Al-oxihidroxidok /0,2 mol l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>-oxalát puffer, aszkorbinsavval, pH=3,25/; (e) maradék frakció / teljes roncsolás HNO<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> segítségével/.

Ahogy e két módszer leírásából világossá válhat, a műveleti módosulatanalitika mintaelőkészítése időigényes folyamat és az elemek oxidációs állapotának megőrzése nem szerepel célkitűzései között. Növényélettani vizsgálatokhoz, az arzén talajból történő felvételi mechanizmusának megismeréséhez azonban szükség van a talajban lévő, főként szervesetlen As-módosulatok /As(III), As(V)/ mennyiségének és arányának megállapítására. Tapasztalati tény, hogy e két módosulat már viszonylag rövid idő (órák) alatt is egymásba tud alakulni az adott műveleti lépés során, így hosszú, olykor 30-60 órás mintaelőkészítésre nem lehet építeni. THOMAS et al. [1997] úttörő közleményükben az elsők közt ismertettek egy „gyors módszert”, amelynek segítségével ki tudták váltani a hosszú mintaelőkészítést. LRM-ekből és CRM-ekből egyetlen, mindössze 20 perces lépésben, kis teljesítményű mikrohullámú kezeléssel (40W), 1 mol l<sup>-1</sup> koncentrációjú foszforsavval 81-100%-os extrakciós hatásfokot értek el, és adalékolással végzett ellenőrző méréseik szerint a mintaelőkészítés alatt nem történt szignifikáns mértékű As(III)-As(V) konverzió. VERGARA GALLARDO et al. [2001] az előző módszer

átvételével valódi minták felé fordultak, és a Távols-Keletről származó üledékmintákból 72-98%-ban tudták kinyerni és azonosítani a főként szervesen As-módosulatokat – kivételt csupán a talajminták képeztek, amelyek esetében szokásosnál gyengébb (60% körüli) hatásfokot mértek. MONTPERRUS et al. [2002] ugyanezen jelenséggel találták maguk szemközti: foszforsavas kezelésnél a talajmintákból elégtelen kinyerési hatásfokot értek el. Ebből fakadóan egyéb extrahálószerkeket vettek górcső alá, és igyekezetük sikeresnek bizonyult: a WENZEL et al. [2001] közleményben megismert, eredetileg egy SEP részét képező,  $0,2 \text{ mol l}^{-1} \text{ NH}_4\text{-oxalát}$  pufferral 18% alá csökkentették a mintában maradó, elemzésre nem kerülő As arányát.

Az utóbbi három közlemény általánosan igaznak bizonyul, szinte teljesen azonos összegzéssel zárta sorait, melynek lényegét két pontban lehet összefoglalni: (1) a talaj- és üledékminták egész sora kivétel nélkül csak As(III) és As(V), tehát toxikus arzénmódosulatokat hordoz mennyiségileg meghatározható mértékben; (2) a mintákban az As(III)/As(V) arány annál kisebb, minél hosszabb ideig volt kitéve az adott talaj vagy üledék aerob környezeti paramétereknek természetes környezetében ill. a mintavételi művelet sor alatt.

#### 2.3.2.6. Tömény savak és bázisok szerepe az arzén módosulatanalitikai mintaelőkészítésben

A tengeri eredetű élelmiszerek, CRM-ek és egyéb minták arzén módosulatanalitikai méréseinél meglehetősen gyakran fordul elő, hogy a kinyerési hatásfok, ha kevéssel is, de elmarad a 100%-tól, bármilyen módszert is alkalmazzon a kutató, lett légyen szó akár metanol-víz elegyes extrakcióról (lásd 5. Melléklet táblázata) vagy enzimikus kezelésről. 1997-ben fedezte fel STÝBLO és THOMAS [1997], hogy az As(III) módosulat szelektíven kötődhet a mintafehérjék szabad –SH (tiol) csoportjaihoz, S-As kovalens kötést kialakítva. Amennyiben a mintakezelés és -előkészítés nem elég drasztikus a fehérjék denaturálását illetően, úgy ezek a kötések épen maradván ezt a módosulatot az extrakciós maradékban tarthatják. Mivel a szervesen As mennyisége a mintákban általában csupán néhány százalékra rúghat [BROOKE 1981], így az As(III) hiánya lehet, hogy fel sem tűnik az összes arzénmérésben a többi mintaelőkészítési lépés bizonytalanságából eredő szórás miatt. MUÑOZ et al. [1999a,b] a problémára elegáns áthidaló megoldással álltak elő: kifejlesztettek egy, a szervesen As-módosulatokra nézve szelektív extrakciós technológiát, amely során a minta szükség szerint vízzel történő visszamedvesítését követően cc. sósavval teljes elfolyósítást hajtanak végre, majd kloroform-metanol eleggyel kirázzák [MUÑOZ 1999a], vagy mikrohullámú készülékkel végzett desztillációval együttesen, mint szervesen frakciót nyerik ki az As(III)-As(V) módosulatokat [MUÑOZ 1999b]. Amennyiben ezt a műveletet a hagyományos metanol-víz extrakcióval egészítik ki, úgy teljes arzén módosulatanalitikai képet kaphatnak a mintáról, mivel ez utóbbi módszer a legfőbb, tengeri eredetű mintában túlnyomórészt előforduló AsB módosulatot bizonyítottan mennyiségileg oldja ki. Ezt a gondolatmenetet követve közel másfél tucat CRM, kagyló, rák és hal vizsgálatát végezték el; eredményeik – amellet, hogy az adalékolással igazoltan 100% körüli As(III) extrakciót értek el – új módszerrel és új oldalról igazolták az emberre nem mérgező AsB legalább 85-90%-os jelenlétét ezekben a mintacsoportokban.

A sósav mellett még a leggyakrabban ionpárpépzőként használt trifluor-ecetsav alapú extrakciót említi a szakirodalom, mint savas közegű, arzén módosulatanalitikai mintaelőkészítést [HEITKEMPER 2001]: a szerzők kereskedelmi forgalomban kapható rizsminták arzénmódosulatainak meghatározására  $2 \text{ mol l}^{-1}$  koncentrációjú TFA oldatot alkalmaztak, mellyel 84-97%-os kinyerési hatásfokot mutattak fel. Ugyanakkor a szervesetlen módosulatok közti arány a minta As(V) tartalmának részbeni redukciója miatt megváltozott, így e két módosulat (MUÑOZ et al. [1999a,b] eljárásaihoz hasonlóan) együttesen, mint szervesetlen frakció szerepelhet a módosulatanalitikai anyagmérésben.

Sok szakember szerint ez nem is feltétlenül jelent problémát. Határozzuk meg a szervesetlen módosulatok összegét, mivel oly nagy toxikológiai különbség úgy sincs az As(III) és As(V) között, és a figyelmet tartalékoljuk az alig ismert összetételű és toxicitású arzénmódosulatok irányába, amelyek többnyire a szokatlanul rossz kinyerési hatásfokkal jellemzett mintákban fordulnak elő. Ez a gondolatmenet vezette PARKS et al. [2003] csoportját, amikor a korábban mások által [ACKLEY 1999] kromatográfiás csúcstelődést kiváltó tulajdonsága miatt elvetett erősen lúgos vegyülettel, TMAH-val kifejezetten ilyen tengeri mintákat vettek célba. Háromlépéses, először TMAH-t, majd az azt közömbösítő ecetsavat, végül  $80^\circ\text{C}$  hőkezelést alkalmazó módszerükkel a gyakran domináns AsB koncentrációt jóval meghaladó mértékű arzenocukor mennyiségre bukkantak a vizsgált kagylókban. Bár extrakciós hatásfokuk olykor csak 50% körül mozgott, az általában nehezen kinyerhető módosulatokra, az arzenocukrokra [GALLAGHER 2001] bevethető műveletsoruk tökéletes és könnyen kivitelezhető, a hagyományos módszereket kiegészítő eljárásként találhatja meg helyét az arzén módosulatanalitika fegyvertárában.

## 2.4. AZ ANALITIKAI MÉRÉSEK MINŐSÉGBIZTOSÍTÁSI FOLYAMATÁNAK ELENEDHETETLEN KELLÉKEINEK, A REFERENCIAANYAGOKNAK BEMUTATÁSA: TÍPUSOK, ELŐÁLLÍTÁSI MÓD ÉS FELHASZNÁLÁS

### 2.4.1. Történelmi előzmények

Az analitikai mérések és műszerezettség fejlődése együtt járt azzal a felismeréssel, hogy az elsődleges módszerek kivételével szinte minden eljárás és mérés technika a valódi minta által okozott, jelentős mátrixhatással terhelt: a meghatározandó komponens vagy tulajdonság mérését a kísérő komponensek, makro- és mikroösszetevők, ill. a minta fiziko-kémiai tulajdonságai olykor rendkívül nehezítik, például a műszerek kalibrálásra alkalmazott standard vegyületek meghatározásához képest. Lassan érezhetővé vált az az űr, amely a különböző laboratóriumok által szolgáltatott eredmények „közös nevezőjének” hiánya váltott ki: bár a kalibrálás szintjén a mérések még visszavezethetőek voltak a nemzetközi standardokhoz, a konkrét alkalmazások területén semmi sem garantálta az eredmények összehasonlíthatóságát, minőségi vizsgálatát. Az utóbbi szempontból különösen kritikus volt a helyzet, hiszen nem állt rendelkezésre olyan anyag, amely segítségével az egyre összetettebbé váló mintaelőkészítési-mérési eljárások módszeres hibáját és rövid ill. hosszú távú stabilitását meg lehetett volna állapítani.

Végül 1920-ban, Dániában megtört a jég: KNUDSEN [1925] tengervízből 2130 üveg, általa “normál víz”-nek nevezett, mai szemmel az LRM-ek (lásd később) ősének tekinthető, nemzetközileg is sikeres referenciaanyagot készített, melyet az oceanográfiai laboratóriumok kívánalmi szerinti kiszerezésben hozott forgalomba. Az igény valódiságát mi sem jelzi annál jobban, hogy 5 év alatt a készlet közel  $\frac{3}{4}$ -e fogyott el és jutott el Dél-Afrikától egészen Japánig. Ezt követően néhány analitikai területen, így pl. az acélipari minőségellenőrzésben hamar megjelentek az első szilárd, hitelesítési célt szolgáló RM-ek; ugyanakkor az első, széles körben ismertté vált, biológiai eredetű hiteles anyagmintára még közel fél évszázadot kellett várni: BOWEN [1966] 1965-ben kelkáposztalevelekből állította elő abból a célból, hogy növényi minták nyomelemvizsgálataihoz minőségbiztosítási háttérrel szolgáljon. Példáján felbuzdulva végre nagy léptékben megindult az ún. környezeti referenciaanyagok (talaj, üledék, élelmiszer, táp, mikroba-, növényi-, állati-, emberi szövet eredetű) gyártása is, amelynek fontosságát felismerve az Európai Közösség 1972-ben életre hívta a részben referenciaanyagok előállítására szakosodott JRC-t (Joint Research Centre).

#### **2.4.2. A referenciaanyagok főbb típusai és előállításuk általános folyamata**

A referenciaanyagok alapvetően két fő csoportba sorolhatóak [ISO/IEC 1992]:

1. RM (gyakran LRM): referenciaanyag, laboratóriumi (vagy házilagos, nem tanúsított) anyagminta; olyan anyag vagy vegyület, amelynek egy vagy több tulajdonsága kielégítően megállapításra került azzal a céllal, hogy azt egy készülék kalibrációjára, egy mérési módszer értékelésére vagy anyagok meghatározására lehessen felhasználni.

Az LRM legfőbb szerepe az, hogy referenciapontként szolgáljon a laboratóriumi mérések minőségbiztosításának területén, például kontrollkártyás rendszer alapját képezve. Mivel az LRM mátrixa ideális esetben közel áll a vizsgálandó minta mátrixához, módszerfejlesztési céllal, legtöbbször mintaelőkészítési művelet sorok optimalálásánál, a kinyerési hatások megállapításán keresztül fontos szerepet játszhat.

2. CRM (Egyesült Államokban SRM): hiteles (vagy bizonylatolt, tanúsított) anyagminta; olyan referenciaanyag, amelynek egy vagy több tulajdonságát egy műszakilag érvényes eljárás segítségével határozták meg, és amely mellé közvetlenül vagy követhető módon egy hitelesítő bizottság által kiadott tanúsítványt vagy egyéb dokumentumot mellékelnek. A CRM hitelesített értékein túl azok bizonytalanságát is közlik, meghatározott megbízhatósági szint mellett.

Ez utóbbi típusukkal, a CRM-ekkel lehet biztosítani a kémiai mérések alapvető visszavezethetőségét és bizonyítani a mérési eredmények helyességét. A CRM használata képessé teszi a laboratóriumot arra, hogy műszereket kalibráljon, így alkalmazásukra lehetőség szerint törekedni kell. A megfelelően kiválasztott CRM kiemelt szerepet tölt be a módszervalidálás területén is, különösen akkor, amikor mátrixhatással kell számolni.

A hangsúly az utóbbi esetben a „megfelelően kiválasztott” szakaszra helyeződik, ugyanis nem minden módszert lehet egyazon hiteles anyagmintával validálni. Elvileg minden lényegesen különböző mintamátrixhoz, és a meghatározandó komponens (vagy tulajdonság) lényegesen eltérő koncentrációtartományához (mértékéhez) más és más referenciaanyagot célszerű használni

[ABOU-SHAKRA 1997]. Ez a gyakorlatban számos okból is kivitelezhetetlen. A rendelkezésre álló, különféle CRM-ek száma nemzetközi szinten jelenleg az 1-2 ezer fajta körül járhat, melyek létszáma csak lassan nő a kifogyó vagy visszavont készletek ill. az egyre szigorodó előírások (és a technika fejlődésével együtt járó nagyobb műszerezettség-minőségbiztosítási követelmények) miatt egyre hosszabb ideig készülő új CRM-ek bevezetéséből kifolyólag. A 6. Melléklet ábrája szemléletesen mutatja, hogy legalább 3-4 év telik el a hiteles anyagminta gyártásának első fázisától a piacra kerülésig. Fontos kiemelni, hogy a CRM-ek és LRM-ek közti árkülönbség nem minőségi eltéréstől fakad: a legfőbb eltérés a stabilitás vizsgálati időtartamában és a hitelesítési folyamat meglétében keresendő. Az LRM-ek gyakorlati élettartama 1-2, míg a CRM-eké 10 évre tehető, így természetesen az utóbbiakat hosszabb ideig kell tesztelni. Másrészt az LRM-ek nem hitelesítési célra készülnek, így nincs szükség a CRM-gyártás legköltségesebb szakaszának, a gyakran nemzetközi összefogással végrehajtott hitelesítési folyamatnak véghezvitelére.

Eltekintve tehát a hitelesítéstől, a referenciaanyagok készítése azonos ütem és kívánalmak szerint zajlik (6. Melléklet ábrája):

1., *Igények felmérése, tervezés*: bár valóban tízezer számra lehetne RM-jelölteket állítani, a legnagyobb cégek sem képesek évente 3-4 hiteles anyagmintánál többet piacra dobni; az európai csúcsintézmény, a Bureau Communautaire de Référence (BCR) 1974 és 1999 között „mindössze” 79 CRM-et/LRM-et és 145 körelemzésre alkalmas anyagot jegyzett [MUNTAU 2001]. Csak a nemzetközi szinten, általánosságban fontosnak tartott területekhez készül CRM; ebből kifolyólag ennek a kevés anyagnak a lehető legalkalmasabbnak kell lennie, és aprólékos tervezés szükséges a gyártás minden munkafázisához.

2., *Nyersanyag begyűjtése*: fontos kiemelni, hogy a nemzetközi igények kielégítésére készülő RM-ek esetében a kiindulási anyag tömege akár 2-3 tonna is lehet. Két ok áll a hatalmasnak tűnő mennyiség mögött: egyrészt a készítés során óhatatlanul lemorzsolódik az anyag egy része, akár 90%-os veszteséget eredményezve; másrészt az alapanyag már indulásnál a lehető leghomogénebbnek kell lennie, így a nagy indulási tömeg részben ellensúlyozhatja az anyagon belüli esetleges egyenetlen komponens / tulajdonság megoszlásokat.

3., *Vízeltávolítás*: Alapvető fontosságú lépés szilárd halmazállapotú RM-ek gyártásánál. Több célt is szolgál: a vízkivétel csökkentésén keresztül hozzájárul a mikrobiológiai stabilitásához, csökkenti a nyersanyag tömegét, koncentráltabbá teszi a komponenseket, a vizes közegben könnyen lejátszódó reakciókat (pl. oxidáció) gátolja ill. lassítja, és megkönnyíti / lehetővé teszi a soron következő, szemcseméret-csökkentést célzó műveleti lépéseket. Ugyanakkor a minta jellegét általában irreverzibilisen változtatja meg, így az RM viselkedése – főleg a mintaelőkészítés során – csak részben tükrözi az eredeti anyag tulajdonságait.

4., *Szemcseméret-csökkentés, szitálás*: Egyértelműen az inhomogenitás csökkentését szolgáló műveletsor. Már az alapanyag is gyakran tartalmaz kisebb-nagyobb konglomerátumokat, összetapadt szemcséket, melyek a főtömeghez képest teljesen eltérő összetételű, zárványszerű részekből is származhatnak. Ha korábbról nem, a vízeltávolítás során biztosan képződnek csomók és rögök, melyek mérete jóval meghaladhatja a kiindulási átlagos szemcseméretet is. Az őrlés-darálás során ügyelni kell arra, hogy az RM-et lehetőleg ne érje

szennyeződés a berendezésekből és az esetleges segédanyagokból. A szitálás során elérendő szemcseméret függ a minta jellegétől: biológiai eredet esetén – főleg az átlagosnál nagyobb lipidtartalomnál – nagy nehézséggel járhat a 90 µm-es tartomány elérése, így a 125 µm-es szitatónyéron áteső frakciót már elegendően kis méretűnek fogadja el a szakirodalom. Szervetlen és / vagy könnyen porítható alapanyagoknál (közet, üledék, tejpor) kisebb, 63 µm-es tartomány elérése a cél. Ugyanakkor ügyelni kell arra, hogy biológiai eredetű referenciaanyagok esetén ne kerüljön túlsúlyba az 50 µm-nél kisebb frakció, mert az ebbe a tartományba eső szemcsék elektrosztatikusan feltöltődve egyrészt nehezzé tehetik a bemérést, másrészt esetleges higroszkópos viselkedésük összetapadást és szegregációt idézhet elő. Fontos megemlíteni, hogy a szitálás részben kiváltható az RM ún. minimális bemérendő tömegértékének megállapításával; ekkor a gyártó a csatolt bizonylatban közli, hogy mekkora az a tömeg, amelynek elemzése esetén a hiteles értékeknek 95%-os megbízhatósági szinten teljesülniük kell.

5., *Homogenizálás és ellenőrzése*: A referenciaanyag célparaméterének megbízhatóságát növelő eljárás. Az anyag tömegétől függően, rendszerint forgódobos berendezéssel végzik, és meghatározott időközönként mintavétellel és elemzéssel határozzák meg az aktuális homogenitási értéket. A folyamat akár egy hétig is eltarthat. Kritikus műveletről van szó, mivel a nem kielégítő mértékben homogén eloszlás gyakorlatilag használhatatlanná teheti az eredetileg tökéletes alapanyagból készülő RM-et.

6., *Előzetes analitikai vizsgálat*: részben a homogenitásvizsgálat részeként azt hivatott eldönteni, hogy a célparaméter aktuális értéke a végrehajtott műveleti lépések után az eredetileg kitzűzött tartományban található-e, ill. a gyártási folyamatot abba kell-e hagyni a tartománytól való túlzott távolság miatt.

7., *Tárolási egységek, azonosítási jelek kialakítása*: célszerűség és gyakorlati megfontolások által vezérelt gyártási lépések. Az egy egységen belüli RM tömeget általában úgy állítják be, hogy 40-50 alkalomnál többször ne kelljen kinyitni a tároló edényzetet, más szóval: ennyi idő alatt fogyjon el az egység RM tartalma.

8., *γ-besugárzás*: a leggyakrabban használt <sup>60</sup>Co ágyú 25 kGy dózisa sterilizálja és stabilizálja a mintát, annak számottevő felmelegedése nélkül; megbízható és gyors eljárás, azonban érdemes besugárzási kontrollt is készenlétben tartani, mivel ez a nagy dózis biológiai minták esetében bizonyos paraméterekben mérhető – bár a referenciaanyag használata szempontjából nem feltétlenül káros – változást okozhat.

9., *Kijelölt értékek megállapítása*: lehetőség szerint tapasztalt laboratórium által, elsődleges módszerrel végzett eljárás keretében kerül sor azoknak a referenciaértékeknek a meghatározására, melyek a stabilitásvizsgálat és CRM-ek esetén a hitelesítési folyamat viszonyítási alapját képezik.

10., *Tárolási – stabilitási vizsgálatok*: LRM-eknél rendszerint 6-18, CRM-eknél 24-36 hónap, különböző hőmérsékleteken (-18°C és +40°C között) végrehajtott tárolás segítségével megfelelő bizonyosságot lehet szerezni a célparaméter(ek) idő függvényében mutatott változásáról, értékének alakulásáról. A vizsgálatnak az anyag szállításával együtt járó



behatásokat is modellezni kell, pl. közvetlen napfénynek történő rövid idejű kitettség ill. az ajánlott tárolási hőmérséklet fölé való emelkedés körülményeinek kialakításán keresztül.

*11., Hiteles érték megállapítása, kiértékelés, döntés:* A CRM-ek készítése során egyszerűbb eljárási rend esetén ugyanazon laboratórium végzi el, különböző független módszerek alkalmazásával az adott paraméter meghatározását; nemzeti vagy nemzetközi együttműködés esetén a független laboratóriumok részben vagy egészben rögzített módszerrel határozzák meg a hiteles értéket, melyet ezt követően értékelő bizottság összehívásával fogadnak el vagy módosítanak. A teljes gyakorlati műveletsor legdrágább részfolyamatáról van szó; egymagában akár 80%-ban járulhat hozzá az összes költségekhez. Ez okozza, hogy (L)RM-ből jóval több készül a CRM-ekhez képest; ökölszabályként azt mondhatjuk, hogy csupán minden 20., stabil és homogén referenciaanyagból készül hiteles anyagminta (6. Melléklet ábrája).

Egy CRM piacra kerülése akár 4-5 évet, vagy akár még hosszabb időt is igénybe vehet; így érthetővé válik az általában 50-80 Euro / egység körüli árfekvés, amely azonban nem számít kiemelkedően drága eszköznek ahhoz képest, hogy szerencsés megfelelés esetében a CRM mind a mérés helyességének megállapításában, mind pedig a módszerfejlesztésben és -validálásban is pótolhatatlan szerepet játszhat.

#### **2.4.3. A módosulatanalitikai mérések minőségbiztosításának jellegzetességei a rendelkezésre álló referenciaanyagok tükrében**

A módosulatanalitikai mérések – bár több mint fél évszázada jelen vannak az analitikai mérések egyik válfajaként – még egyetlen szabványügyi testület által sem kerültek szabványosításra. Ebből következik, hogy a vizsgálólaboratóriumoknak kivétel nélkül validálni kell a különböző módosulatanalitikai módszereket, mint minden más, szabványban vagy gyógyszerkönyvben nem rögzített ill. szakmai szervezetek/hatóságok által (még) nem elfogadott módszert [MSZ 2001, NAR 2002]. A validálás során meg kell határozni az alkalmazandó analitikai rendszer és módszer alkalmasságát, mely folyamatnak részét képezi többek közt az analitikai módszer(ek) teljesítményjellemzőinek – például a pontosságnak és a mérési bizonytalanságnak – megállapítása, valamint igazolni kell az elvégzett mérések visszavezethetőségét. Általánosságban, nem módosulatanalitikai mérések esetén az utóbbi jellemzők megállapításánál fontos szerephez jutnak a CRM-ek (hiteles /más néven bizonylatolt vagy tanúsított/ anyagminták). Amennyiben a laboratórium rendelkezik az általa vizsgált mintához hasonló jellegű és a meghatározandó komponenst közelítőleg azonos koncentrációban tartalmazó CRM-mel, úgy viszonylag egyszerűen meghatározhatja az általa használt módszer pontosságát (tehát az eltérést a valódi és a mért érték között), a módszer teljes bizonytalanságát (amely magában foglalja az összes lépést, kezdve a mintaelőkészítési folyamatoktól egészen a végső detektálásig) és biztosíthatja a mérés visszavezethetőségét a nemzeti vagy nemzetközi standardokhoz.

A CRM hiánya nem teszi lehetetlenné a mérés validálását, azonban meglehetősen bonyolult műveleti ágra kényszerítheti a laboratóriumot. Ebben az esetben ugyanis a következő eljárások közül választhat [EURACHEM 2000, MSZ 2001, NAR 2002]:

1., A mérőberendezést visszavezethető, ismert összetételű, pontosan meghatározott koncentrációjú (+bizonytalanságú) standard vegyülettel kalibrálja és emellett a módszer megelőző lépéseinek (pl. extrakciós műveletek) visszavezethetőségét egyéb módszerekkel, pl. adalékolással igazolja.

2., Ún. elsődleges módszerrel is elvégzi a mérést, és az eredményeket összehasonlítja az általa alkalmazott módszerrel – amennyiben elsődleges módszer egyáltalán rendelkezésre áll és alkalmazható az adott mérési feladathoz.

3., A laboratórium a választott módszer segítségével mérést hajt végre egy olyan mintán, amely részben (adalékolás ill. standard addíció révén) vagy teljesen a mérendő vegyületet tisztán tartalmazó referenciaanyagból áll – amennyiben az elérhető.

4., A laboratórium olyan módszerrel végzi el a mérést, amelynek az összes meghatározható műveleti paramétere pontosan megállapításra került és e paraméterek mindegyike visszavezethető.

Sajnos a módosulatanalitika bizonyos ágai – különösképpen pedig a szelén és arzén módosulatanalitika – több szempontból is hátrányt szenved. Egyrészt a napjainkig megismert módosulatok jelentős része, kb. 80%-a nem található meg a vegyszergyártók kínálatában; így például arzén esetében a teljes arzenocukor-sorozat, az AsB-2, az AsC és a TETRA csak kutatólaboratóriumokból ill. egyéni módszerekkel, pl. CRM-ekből történő izolálással szerezhető be [KIRBY 2002], míg a szelénél például olyan fontos – éppen a legerőteljesebb rákellenes hatással rendelkező – módosulatok hiányoznak, mint a Se-allil-szelenocisztein és a  $\gamma$ -glutamil-Se-metilszelenocisztein (2003. májusi állapot). Másrészt óriási hiány tapasztalható a módosulatanalitikai CRM-ek területén is. Arzén esetében valódi (mátrix) CRM-ből mindössze egyetlen, a BCR-CRM 627 rendelhető, és az is csupán összes As, AsB és DMA(V) módosulatokra hitelesített; szelén módosulatanalitikai CRM pedig ez idáig egyszerűen nem készült.

A kialakult helyzet megértéséhez összefüggéseiben kell vizsgálni az elméleti és gyakorlati hátteret. Az arzénnel kapcsolatos élettani és módosulatanalitikai kutatások és az egyre erősödő, élelmiszer-biztonsággal kapcsolatos lakossági nyomás a 80-as évek végére tette nyilvánvalóvá, hogy mindenképpen lépni kell az első CRM kialakítása felé. Ekkor alig egy tucat európai laboratórium rendelkezett egyáltalán valamiféle As-módosulatanalitikai tapasztalattal, és még a mainál is kevésbé jutottak hozzá As-standard vegyületekhez. Végül az Európai Közösség tagállamaiban tevékenykedő laboratóriumok harmonizációs törekvéseit keretbe foglaló, 1973-ban létrehozott BCR kezébe vette az irányítást, és egy korábban kialakított, lépésről-lépésre történő módszertani megközelítéssel indította el a CRM 627 kialakítását [LAGARDE 1999, MUNTAU 2001]. A folyamat 8 évig tartott; a következő, remélhetőleg hamarosan piacra kerülő, többelemes módosulatanalitikai hiteles anyagminta, a CRM 710 sem sokkal kevesebb idő alatt készül(t) el. Szelén esetében eddig egyetlen próbálkozást jegyez a szakirodalom: a BCR szervetlen Se(IV) és Se(VI) vegyületekkel mesterséges vízmintát állított elő, azonban a két módosulat stabilitása nem bizonyult megfelelőnek és a CRM sosem készült el [QUEVAUVILLER 1998]. Mindezekből látszik, hogy a CRM-mel való ellátottság még hosszú

ideig problematikus részét képezi majd a módosulatanalitikai vizsgálatoknak. Hiába várható ugyanis a CRM-ek számának lassú bővülése, minden mátrixot, minden módosulatot és minden koncentrációtartományt valószínűleg sohasem fednek majd le teljesen.

A laboratóriumoknak más minőségbiztosítási lehetőségek után kell nézniük, amelyekkel a lehetőségekhez képest át tudják hidalni a hiányosságokat [LARSEN 1998a, MICHALKE 1999]:

- az összes Se- vagy As-anyagmérleg megállapítása alapvető és elengedhetetlen részét kell, hogy képezze a módosulatanalitikai vizsgálatoknak, hiszen csak így tartható kézben az olykor műveletileg több részre osztott mintából számolható kinyerési hatások;
- a módosulatanalitikai folyamat minden lépését lehetőség szerint egyenként vizsgálat alá kell vonni, hogy meg lehessen ismerni az egyes folyamatok során fellépő veszteségeket, műveleti hatásokokat, szennyezési forrásokat, bizonytalansági tényezők mértékét és okait, és végül, de nem utolsósorban meg kell bizonyosodni afelől, hogy módosulátalakulás egyáltalán ne, vagy pedig dokumentált (jól ismert, minőségileg és mennyiségileg /egyedi hatások szempontjából/ kézben tartott) körülmények között történhessen meg;
- a mintaelőkészítés és az esetleges hosszabb idejű tárolás megváltoztathatja a módosulatok hozzáférhetőségét ill. magukat a módosulatokat is; ezt ellenőrizendő, célszerű standard vegyületekkel végrehajtani a teljes vizsgálati folyamatot a mintaelőkészítéstől kezdve a tárolási lépéseken át a végső, pl. hígítással vagy pH-állítással járó műveletekig – ugyanakkor figyelembe kell venni, hogy a standard vegyületek nem feltétlenül viselkednek ugyanúgy, mint a valódi mintából extrahált komponensek;
- standard addíció és belső standard használatával célszerű figyelemmel kísérni a vegyületek valódi minta mérésénél gyakran tapasztalt retenciós idő változását és a rendszer felbontóképességének alakulását mind GC, mind LC elválasztások esetén – különösen akkor, ha nem áll rendelkezésre molekuláris szintű azonosítást lehetővé tevő berendezés, pl. ESI-MS vagy MALDI-TOFMS;
- körelemzésekben való részvétellel, ill. az azokból megmaradó – rendszerint RM minőségű – minták és házi készítésű LRM-ek használatával felvett kontrollkártyák útján a laboratórium meggyőződhet személyzetének felkészültségéről, módszereinek alkalmasságáról és méréseinek-eredményeinek minőségéről;
- ugyanazon minta különböző módszerekkel és/vagy különböző laboratóriumokban történő vizsgálata hozzájárulhat a tapasztalatlanságból fakadó vagy az alkalmazott, gyakran rendkívül összetett mintaelőkészítési / mérés technikai műveletekben rejlő módszeres hibák felderítéséhez; jellegzetes példaként a kromatográfias rendszerek nem kielégítő felbontóképességéből adódó csúcstisztasági gondok azonosítása szolgálhat. Az arzén tekintetében pl. a DORM-2 CRM-et kutatócsoportok tucatjai elemezték már és számos közlemény látott napvilágot a különböző módszerrel elért kinyerési hatások, azonosított módosulatok és műveleti paraméterek vizsgálatairól.

Külön érdemes beszélni az adalékolás lehetőségéről. Elvileg a folyadék-szilárd extrakciós műveletek esetén a mintához ismert mennyiségben adalékolt standard vegyületek visszanyerése képet adhat a valódi mintából történő extrakciós műveletek hatásfokáról. Valójában azonban ez

csupán elméleti lehetőség: a gyakorlat azt mutatja, hogy rendkívül nehéz ugyanolyan jellegű, erősségű és stabilitású kötéseket létrehozni a minta és a hozzáadott standard között, mint amelyek akár évtizedek alatt jöttek létre a minta és a benne eredetileg megtalálható módosulat között. A helyzetet tovább bonyolítja, hogy gyakran még a legfőbb, leginkább vizsgált módosulatokról (pl. AsB) sem tudjuk még, milyen és hány kötési mechanizmus révén ill. milyen eloszlásban „raktározza” pl. az adott tengeri élőlény – ha egyáltalán előfordul benne [ACKLEY 1999]. A szelено-aminosavak esetében pedig badarság lenne azt feltételezni, hogy a vizes oldatban mintához adalékolt módosulatok ugyanúgy viselkednek majd a mintaelőkészítés alatt, mint a fehérjékben kovalensen kötött társaik. Az adalékolás – minden ezzel ellentétes várakozás ellenére – csupán egyetlen célra alkalmas: esetleg segíthet eldönteni, zajlik-e valamilyen mértékű módosulatátalakulás a mintaelőkészítés részét képező folyamatok során.

Fontos kiemelni, hogy a CRM megléte sem oldja meg egy csapásra az összes felmerülő problémát. Gyakori feladatként adódik például a kinyerési hatásfok becslése, amelyre elvileg a CRM vizsgálata során kapott értékek vonatkozhatnak. Azonban a CRM – jellegéből adódóan – mindig homogénebb, kisebb víztartalmú, és kisebb szemcseméretű, mint a valódi minta, így annál általában könnyebben, néha viszont nehezebben kezelhető [QUEVAUVILLER 1996].

A jövőt illetően megállapítható, hogy még legalább 20 évig okoz majd gondot a megfelelő CRM hiánya [QUEVAUVILLER 1999]. Részben ennek köszönhető, hogy egyre jobban terjednek a minőségbiztosítási célok bizonyos területein jól használható LRM-ek, akár több laboratórium összefogásával, akár egyetlen laboratórium által készítve [GOESSLER 1997], ill. megjelent az a tendencia is, hogy a nagy mennyiségben elérhető, összes As- vagy Se-tartalomra hitelesített CRM-eket utólagos vagy járulékos hitelesítéssel próbálják alkalmassá tenni módosulatanalitikai célokra [LARSEN 1997, WOLF 2001, ZHENG 2003]. Ez utóbbi eljárásnak az a jelenség szabhat gátat, hogy az összes As- vagy Se-tartalomra vonatkozó homogenitás nem jelent egyben homogén módosulateloszlást is, különösen, ha az adott mintában több, jelentős mennyiségben jelen lévő, eltérő oldhatósági jellemzőkkel rendelkező módosulat található meg.

Az As- és Se-módosulatanalitikai mérések minőségbiztosítási jellemzőit összefoglalva elmondhatjuk, hogy a CRM-ek és standardok területén bemutatott hiányosságok jelentősen szűkítik a módosulatanalitikai vizsgálatok során elérhető minőségi és mennyiségi meghatározások lehetőségeit és nem elhanyagolható mértékben járulnak hozzá a mérések teljes bizonytalanságának növekedéséhez.

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

Ebben a fejezetben azokat a módszereket, vegyszereket és standardokat ismertetem, melyeket főbb változtatások nélkül, minden kutatási területemen egyaránt alkalmaztam. Az esetenkénti eltéréseket az „Eredmények” megfelelő alfejezetei tartalmazzák, az adott mintához kapcsolódó kiegészítésekkel együtt. Mivel értekezésem központjában a mintaelőkészítés állt, fontos kiemelni, hogy a módosulatanalitikai (HPLC-) mérések bemutatását és azok módszerfejlesztési lépéseit – többek között – IPOLYI [2001a,b] közleményei és STEFÁNKA [2003a] PhD értekezése tartalmazza.

#### 3.1. ÖSSZES AS- ÉS SE-TARTALOM MEGHATÁROZÁSA SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK, VEGYSZEREK ÉS BERENDEZÉSEK ISMERTETÉSE

Minden mintánál a savas roncsoláson alapuló feltárást használtuk. Ennek során a mintából – szárazanyagra számítva – legfeljebb 0,5 grammot mértünk be analitikai mérleg ( $\pm 0,1$  mg) pontossággal az előzetesen tisztára mosott és ioncserélt vízzel kiöblített, menetes fedővel zárható, laboratóriumunkban készített teflon bombákba. A kívánt végtérfogattól függően először 2-3 ml cc. salétromsavat, majd 1-3 óra múlva 2-3 ml 30 m/m %-os  $H_2O_2$ -oldatot (mindkettő Merck gyártmány; Darmstadt, Németország) pipettáztunk a mintára. Ezekkel párhuzamosan mintát nem tartalmazó vakot és bizonyos esetekben CRM bemérésével kontroll mintát is készítettünk. A bombákat lefedtük és legalább 8-10 órán keresztül állni hagytuk, hogy az oxidáció során keletkező gázok jelentős része eltávozhasson. Ezután a teflonbombákat bezártuk és laboratóriumi nyomástartó edényben 25 percig  $110^\circ C$  hőmérsékleten tartottuk őket. Kihűlés után a bombák tartalmát maradék nélkül, ioncserélt vízzel 5,0 vagy 10,0 ml-es mérőlombikba mostuk át és jelre töltöttük őket. A kész minták As- és Se-tartalmát ICP-OES készülék segítségével (ICAP-61 vagy IRIS; Thermo Jarrel Ash Corp., Franklin, MA, USA) határoztuk meg. A készülékek kimutatási határa mindkét elemre  $40 \mu g l^{-1}$ -nak adódik; a mérés során  $1000 mg l^{-1}$ -es As és Se törzsolatok (Merck) hígításával, külső kalibráció segítségével történt a mennyiségi meghatározás. Bizonyos esetekben a roncsolmányokat a jelre töltés után redős szűrőpapíron (Macherey-Nagel 619 G1/4; Düren, Németország) át kellett szűrni, hogy a lebegő, rendszerint nagy cellulóztartalmú mintából megmaradó komponensek eltávolításával megakadályozzuk az ICP-porlasztó kapillárisának eltömődését. Ilyenkor természetesen a vak mintákat is ugyanennek a kezelésnek tettük ki.

Ioncserélt vízként minden esetben Elgacan Ultra-Pure patronnal (Elga Ltd., High Wycombe Bucks, Anglia)  $R > 10 M\Omega$  ellenállásig tisztított vizet használtunk.

#### 3.2. A MÓDOSULATANALITIKAI MINTAELOKÉSZÍTÉSEK SORÁN FELHASZNÁLT VEGYSZEREK, STANDARDOK ÉS ÁLTALÁNOSAN ALKALMAZOTT BERENDEZÉSEK ISMERTETÉSE

Vizsgálataink során analitikai tisztaságú vegyszerekkel dolgoztunk. A különböző pufferek készítéséhez alkalmazott TRIS,  $K_2HPO_4$  és  $KH_2PO_4$  sókat, citromsavat, a pH-állítására szolgáló NaOH-t és sósavat a Reanal cégtől (Budapest) szereztük be. A részben mintaelőkészítési,

részben kromatográfiai célokra használt, HPLC-tisztaságú metanol és etanol Carlo Erba (Milánó, Olaszország) gyártmány volt. Az enzimek közül a sejtfalbontó drizelázt (*Basidiomyces ssp.*; 0,81 U mg<sup>-1</sup> készítmény) és tripszint (sertés hasnyálmirigyből; 1645 U mg<sup>-1</sup> készítmény) a Fluka (Buchs, Svájc), a pepszint (sertésgyomorból; 452 U mg<sup>-1</sup> készítmény), a VII-es típusú lipázt (*Candida rugosa*; 875 U mg<sup>-1</sup> készítmény), a XIV-es típusú proteázt (*Streptomyces griseus*; 4,8 U mg<sup>-1</sup> készítmény) és a „lysing” enzimet (*Trichoderma harzianum*; aktivitás-megjelölés nélkül) a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), míg a pronázt (*Streptomyces griseus*; 11400-11417 U mg<sup>-1</sup> készítmény) a Merck cég szállította. A proteáz inhibitorok közül a PMSF-et a Fluka, míg a folyékony inhibitor koktélt a Sigma-Aldrich cégtől szereztük be. Az emulgeálási ill. zsírtalanítási célra szolgáló Na-taurokolátot és ciklohexánt a Reanaltól, míg a gumiarábikumot a Sigma-Aldrich cégtől rendeltük. Az NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> puffer készítéséhez Riedel-de Haën (Seelze, Németország) terméket használtunk. Az alkalmazott enzimek, pufferek és egyéb reagensek As-ill. Se-tartalma az ICP-OES készülék kimutatási határa alattinak (bemérésre számítva: < 0,4 µg g<sup>-1</sup> készítmény) adódott.

A D,L-szelenometionint (SeMet), D,L-szelenoetionint (SeEt), D,L-szelenocisztint (SeCys<sub>2</sub>) és nátrium-szelenátot (Se(VI)) a Sigma-Aldrich cég szállította, 97-99%-os tisztaságban. Se(IV) módosulatként a Merck által forgalmazott, szelénre nézve 1000 mg l<sup>-1</sup> koncentrációjú SeO<sub>2</sub>-törzsoldatot használtuk.

A centrifugálási feladatokat a Hettich Zentrifugen cég (Tuttlingen, Németország) „Micro 22R” jelű, hűthető és cserélhető rotorral felszerelt centrifugájával hajtottuk végre. A HPLC mérésekre szánt oldatokat cserélhető membránlappal ellátott, 0,45 µm pórusátmérőjű, cellulóz-nitrát fecskendőszűrővel (Whatman; Maidstone, Anglia) tisztítottuk meg a lebegő, centrifugálással nem eltávolítható komponensektől. Bizonyos mintáknál Ultrafree-4 típusjelű, 10 kDa vágási értékű ultraszűrőmembránnal ellátott centrifugacső-szűrőket (Millipore; Bedford, MA, USA) használtuk az oldatok szűrését követő további, méret szerinti frakcionálására.

### 3.3. STATISZTIKAI ELJÁRÁSOK

A kísérletek kiértékelése során részben a Microsoft Excel 97 táblázatkezelő program (Microsoft Corporation; Redmond, WA, USA) statisztikai függvényeit (varianciaanalízis, 2-mintás t-próba nem azonos szórásnégyzeteknél /Welch-próba/), részben pedig az STATISTICA 5.0 statisztikai programcsomagjának (StatSoft Inc.; Tulsa, OK, USA) bizonyos alkalmazásait (RSM /felület-válasz módszer/) használtam fel. Minden esetben 95%-os megbízhatósági szintet vettem figyelembe.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. AZ ENZIMES MINTAELOKESZITES KRITIKAI VIZSGALATA AZ ARZEN MODOSULATANALITIKA TERULETEN

Mint ahogy a 2.3.2.4. számú irodalmi fejezetben bemutatásra került, az enzimes mintaelőkészítés csupán a 90-es évek közepén jelent meg az arzén módosulatanalitika területén, és alkalmazhatóságának megítélése meglehetősen nehéz, mivel viszonylag kis számú kísérletről számol be a szakirodalom. A meglévő eredmények alapján úgy tűnik, hogy a növényi eredetű minták (rizs, alma) mátrixának bontásánál, s így az arzénmódosulatok kinyerésének elősegítésénél a keményítóbontó enzimek hasznos szerepet tölthetnek be, míg állati eredetű mintáknál egyértelmű előnyről nem lehet beszélni. Annyi bizonyos, hogy az első As-módosulatanalitikai CRM, a BCR-627 hitelesítő nemzetközi körelemzésénél az egyik résztvevő tripszines bontással megfelelő, a hiteles értékek megállapításánál is figyelembe vett eredményeket ért el az általában metanolos extrakció használatához forduló, többi laboratóriummal együtt [LAGARDE 1999]. Ennél a példánál maradva úgy gondolnánk, hogy a tripszines módszer választását nem feltétlenül a módszer egyéb eljárásokhoz képest megismert, nagyobb kinyerési hatásokban vagy megbízhatóbb eredményekben tükröződő előnye, hanem esetleg egyéb indokok, mint pl. a rendelkezésre álló mérőrendszer és más adottságok / hiányosságok indokolták; ilyen lehet például a szerves oldószer eltávolításának nehézsége vagy rossz tapasztalatok az emulzióképzésre hajlamos, nagy zsírtartalmú tengeri mintáknál.

Közvetett módon ugyanakkor gyakran előkerül egy olyan mintacsoport, melynek esetében az enzimes mintaelőkészítés talán fontosabb, alapvető szerepet tölthetne be: a tengeri eredetű, alacsonyabb rendű növényekről, algákról-hínárokról-moszatféléről van szó. Ezen minták az utóbbi években az As-módosulatanalitika talán legkedveltebb céltárgyai voltak, mivel (a) egyrészt a reformtáplálkozás és a távol-keleti étkezési szokások megismerése révén egyre több ételkészítés készül velük/belőlük Nyugat-Európában is, (b) összes arzéntartalmuk elérheti a  $100 \mu\text{g g}^{-1}$  értéket, amely komoly ételkészítés-biztonsági aggályokat vet föl ill. (c) azonosított As-módosulataik jelentős részét a tudományterület napjaink talán leginkább tanulmányozott vegyületsorozatja, az arzenocukrok alkotják. Ezen típusú mintáknál a metanol-víz eleggyel végzett extrakció szinte egyeduralkodónak számít annak ellenére, hogy nem ritka a csupán 26% körüli kinyerési hatások [GALLAGHER 2001]. Hasonlóan kis hatásfokot tapasztaltak KOTREBAI et al. [1999b] zöldalga Se-módosulatanalitikai vizsgálatánál is, a legtöbb – más jellegű – mintánál kielégítő eredményre vezető pronáz enzimes extrakció ellenére. Ez a megfigyelés vezetett arra, hogy az ebbe a csoportba tartozó minták módosulatanalitikai vizsgálatához a mintára legjellemzőbb mátrixkomponens, a sejtfal bontására használható enzimes kezelést dolgozzák ki. Ez a korábban ilyen célra még nem alkalmazott eljárás kijelölheti azt a területet, ahol az arzén módosulatanalitika valóban igénybe veheti az enzimes mintaelőkészítés eszköztárát.

Mindemellett célszerűnek tűnt objektív, statisztikai módszerekkel megvizsgálni és igazolni, hogy vajon a számos alkalommal is idézett, tripszin használatára épülő mintaelőkészítés valóban „csak” esetleges módszertani okok miatt került-e felhasználásra tengeri (hal)minták esetén,

avagy valódi extrakciónövelő tényezőként kell vele számolni és ajánlani a szerves oldószerrel végrehajtott extrakciós technikák helyett. A vizsgálat szükségessége annak a megfigyelésnek az okán merült fel, amelyre hitelesítési célból elemzett kagylóminta során jutottunk; végül a következtetések általánosságát egy másik nemzetközi körelemzés során kapott LRM-jelölt halmintán próbáltam ki.

Ez a két kísérletsorozat alkalmasnak tűnt az enzimes mintaelőkészítésnek az As-módosulatanalitika kiterjesztett, nem csupán keményítőalapú mátrixokkal jellemzett területén elfogadott létjogosultságának eldöntésére és esetleges új alkalmazási példák bemutatására.

#### **4.1.1. Arzénnel dúsított zöldalga As-módosulatanalitikai előkészítése és vizsgálata**

##### **4.1.1.1. A minta bemutatása és a választott mintaelőkészítési megközelítés ismertetése**

A „BIOMA-6” jelöléssel ellátott, As-módosulatanalitikai referenciaanyag célzattal előállított mintát a Cseh Köztársaságból, a prágai „ANALYTIKA spol. s.r.o.” cégtől kaptuk. A minden bizonnyal *Chlorella* fajhoz tartozó algából arzéntartalmú tápközegben végzett fermentáció segítségével állították elő azt a biomasszát, amelyből centrifugálással és fagyasztva szárítással alakították ki a végső, por alakú készítményt. Ennek a sötétzöld színű algapornak  $31,0 \mu\text{g g}^{-1}$ -ot (RSD: 3,2%) tett ki az összes As-tartalma, amely nagyságrendileg egyezik a tengeri eredetű, alacsonyabb rendű növényekben kimutatott mennyiséggel. A mintaelőkészítési eljárások tervezésénél figyelembe vettem az As-módosulatanalitikában általánosan javasolt, metanol-víz oldószerkelet használatára építő módszereket is, és ezeket egészítettem ki enzimes eljárásokkal. A HPLC-HG-AFS kromatográfias elválasztás jellemzőit IPOLYI et al. [2001a] közleménye tartalmazza.

##### **4.1.1.2. A felhasznált vegyszerek és alkalmazott mintaelőkészítési eljárások bemutatása**

Az arzénnel dúsított algaminta módosulatanalitikai előkészítése során metanol-víz különböző arányú elegyeivel, valamint drizeláz és pronáz enzimekkel hajtottam végre kezeléseket, melyek jellemzőit a 3.2. fejezet hordozza, a pufferek készítéséhez használt TRIS,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sókkal együtt. A mintaelőkészítéseket 15 ml-es fiolákban végeztem, amelyekbe egyenként 160-170 mg As-dúsított algaport mértem ki, majd a következőekben (A-D) ismertetett extrakciók kerültek sorra, 200 perc<sup>-1</sup> fordulatszámú rázógéppel. Az egyenként 3 párhuzamossal végrehajtott mintaelőkészítő lépések után centrifugálással (3700 g, 15 perc, 20°C) választottam szét az oldhatatlan részt az extrahált komponensektől; a „D” betűvel jelölt módszer esetén a létrejövő üledéket használtam fel a soron következő lépéshez.

**A.**, 3,6 ml ioncserélt víz (pH=5,7), 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten;

**B.**, 3,6 ml, 1:9 V/V arányú metanol:víz elegy, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten;

**C.**, 3,6 ml, 1:1 V/V arányú metanol:víz elegy, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten;

**D.**, 1. lépés: 3,6 ml ioncserélt víz (pH=5,7), 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten; 2. lépés: 3,6 ml,  $0,05 \text{ mol l}^{-1}$  TRIS-HCl pufferben (pH=7,0) pufferben oldott 1 m/v %-os drizeláz oldat,



4 órán keresztül, 37°C hőmérsékleten; 3. lépés: 3,6 ml, 0,05 mol l<sup>-1</sup> foszfátpufferben (pH=7,4) oldott 0,5 m/v %-os pronáz oldat, 21 órán keresztül, 37°C hőmérsékleten.

A műveletek befejezése után a centrifugálással létrejövő felülúszókat 0,45 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrőn keresztül juttattam 5,0 ml-es mérőlombikokba és ioncserélt vízzel töltöttem jelre. Az így kapott oldatok kerültek HPLC (As-módosulatanalitikai) vizsgálatokra. Az üledéket és a hozzájuk tartozó membránszűrőlapokat savas roncsolással (3.1. fejezet) tártam fel a maradék arzéntartalom megállapítása végett.

#### 4.1.1.3. A különböző mintaelőkészítési módszerek és az elért extrakciós hatások bemutatása – az eredmények értékelése

Mint ahogyan az irodalmi szakaszban bemutattam, az arzén módosulatanalitikai mintaelőkészítés egyik fő módszerének a metanol-víz oldószerkeleggyel történő kezelés számít (2.3.2.3. szakasz). Ugyanakkor ezen eljárás – a széles tartományban (0-100%) végbevihető oldószer-elegyítési lehetőség ellenére – nem nyújt minden mintára tökéletesen alkalmazható megoldást, hiszen nem számít ritkaságnak a még 50%-os kinyerési hatásfokot sem elérő extrakciós eredmény (5. Melléklet táblázata). Kifejezetten módosulatanalitikai referenciaanyag céljából készített, mesterséges As-tartalmú tápközegben fermentált algamintával GOESSLER et al. [1997] végeztek módosulatanalitikai méréseket, melynek előkészítése során a 4:6 V/V arányú metanol:víz oldószerkeleggyel 100% körüli extrakciót értek el. Az általuk vizsgált alga azonban valószínűleg eltérő fermentációs eljárással készülhetett, mivel több mint két nagyságrenddel nagyobb, és 99%-ban As(V)-ből álló arzéntartalom jellemezte – amelyről pedig ismert, hogy kinyerése általában nem ütközik akadályokba a másik szerves As-módosulathoz, az As(III)-hoz képest (lásd 2.3.2.6. fejezet).

Ennél az algamintánál az „A”, „B” és „C” mintaelőkészítési eljárások képezték a különböző arányú metanol-víz eleggyel végzett kezeléseket, és sorban 77%, 78% és 80% kinyerési hatásfokra vezettek az összes kinyert As-tartalmat illetően. A három módszer végeredményei között a páronként elvégzett statisztikai vizsgálat (Welch-próba) nem tárt fel szignifikáns különbséget. Ezt követően az üledékben maradt, kb. 20%-ot kitevő As kinyerésére az előző módszerektől teljesen eltérő mechanizmusú, enzimes mintaelőkészítést használtam fel, mely két, egymást követő lépésből állt: először sejtfalbontó enzimmel (drizeláz) kezeltem a maradékot, majd fehérjebontási szakasz következett, pronáz enzimmel. A drizeláz a növényi alapú protoplasztképzés gyakran használt enzimkeveréke, és várható volt, hogy alkalmazásával számottevő növekedést lehetne elérni a kinyerési hatásfok területén. A fehérjebontási szakasz szükségességének elméleti hátterét pedig az szolgálta, hogy az algafélék fehérjetartalma a vízelvonást követően, szárazanyagra vetítve jóval 10 m/m % fölé kerülhet [PIORRECK 1984], ezáltal mátrixalkotó szerepük jelentőssé válhat, akadályozva pl. az As(III)-módosulat kinyerését. Az így háromlépcsősé alakult, „D” jelű kezelés első lépésének a metanol nélküli, kizárólag ioncserélt vízzel végrehajtott extrakciót választottam, mivel így elkerülhetővé vált a centrifugálással esetleg nem teljesen eltávolított metanol által kiváltott enzimaktivitás-csökkenés, másrészt a statisztikai elemzés nem igazolta a metanol használatának fontosságát.

Az algaminta már módosulatanalitikai információval is kiegészített, háromlépéses mintaelőkészítés segítségével kapott mérési eredményeit az 1. táblázat hordozza. A  $31,0 \mu\text{g g}^{-1}$  összes As-tartalmú algából a háromlépéses extrakció után fennmaradó üledékben az ICP-OES kimutatási határa alatti arzén maradt (K.H. =  $40 \mu\text{g l}^{-1}$  oldatban, amely a bemérés és összes As-tartalom alapján abszolút értékben  $1,2 \mu\text{g g}^{-1}$ -ot jelent), tehát a kinyerési hatások biztosan meghaladta a 96%-ot. A HPLC-HG-AFS rendszer segítségével azonosított As-módosulatok (arzén egyenértékben számítva)  $27,3 \mu\text{g g}^{-1}$ -ot tettek ki, tehát az összes mennyiségre vetítve az azonosítási arány 88%-nak adódik. A két érték közötti különbség valószínűleg a nem hidridképző – pl. arzenocukor jellegű – As-módosulatok jelenlétéből fakad, melyek a szakirodalom alapján minden alacsonyabb rendű növényi szervezetből kimutathatóak és azonosíthatóak – amennyiben a szükséges standardok és műszerek, tehát molekulaszintű azonosításra alkalmas MS, pl. ESI-MS rendelkezésre állnak.

**1. Táblázat. Az arzénnel dúsított algaminta háromlépéses mintaelőkészítése révén kinyert As-módosulatok megoszlásának és az elért kinyerési hatásoknak bemutatása. K.H. = kimutatási határ**

Mérőrendszer	HPLC-HG-AFS eredmények, $\mu\text{g As g}^{-1}$ minta				ICP-OES eredmények, $\mu\text{g As g}^{-1}$ minta		
	Vizes extrakció	Sejtfal- bontás	Fehérje- bontás	Összesítve	Nem kinyerhető As-tartalom	Minta összes As-tartalma	Kinyerési hatások
As(III)	5,38	0,49	0,33	6,20	<1,2	31,0	>96%
MMA(V)	9,45	0,41	<K.H.	9,86			
DMA(V)	0,82	0,49	0,82	2,13			
As(V)	8,48	0,65	<K.H.	9,13			
<b>Összesítve</b>	24,13	2,04	1,15	27,32			
Az azonosított As- módosulatok megoszlása az összes As-tartalom %-ában	78	7	3	88			

Az 1. táblázat adatai alapján egyértelmű, hogy az ioncserélt vízzel végzett extrakciónak tulajdonítható a mintából felszabadított As-módosulatok döntő többsége, 78%-a. A sejtfalbontással még további 7% nyerhető ki, és valószínűleg így válik teljessé az MMA(V) és As(V) extrakciója is, hiszen a további kezelések során nem szabadultak fel kimutatható mértékben. A DMA(V) és As(III) tekintetében a 3., fehérjebontási lépés még mérhető mennyiségben vitt oldatba e két módosulattól; ugyanakkor nem igazolódott be az As(III) kapcsán felmerült kétely, miszerint fehérjebontás nélkül jelentős kinyerési veszteség következne be, hiszen a pronáz által felszabadított  $0,33 \mu\text{g g}^{-1}$  mennyiség csak mintegy 5%-át tette ki a teljes,  $6,20 \mu\text{g g}^{-1}$ -nak. A DMA(V) ennél a mintánál megismert, fehérjebontást is igénylő extrakciós viselkedésére nem találni példát a szakirodalomban: a 3. lépés nélkül  $0,82 \mu\text{g g}^{-1}$ -mal (38%-kal) kevesebbet mutattunk volna ki ebből a módosulattól. Ezidáig csupán egyetlen forrást találtam, mely a DMA(V) olykor nem tökéletes extrakciójára utal: csirkemell izomszövetből metanolos kezelés nélkül, kizárólag ioncserélt vízzel nem lehetett tökéletes kinyerést elérni [SEAS 2002]. Nem kizárt, hogy az enzimes kezeléssel létrejövő fehérjebontás és a metanol által okozott

fehérjedenaturálás ennél a mintánál hasonló eredményekre vezetne az ugyanarra a mátrixalkotóra kifejtett hatás révén, azonban ehhez további vizsgálatokra lenne szükség.

Mindezekkel együtt a fehérjebontásnak tulajdonítható 3%-os extrakciónövekedés statisztikai vizsgálatok alapján már nem számít szignifikánsnak az első két lépés eredményeihez képest. Ezzel ellentétben a sejtfalbontás által eredményezett 7% többlet szignifikánsnak bizonyult, tehát ez a lépés valóban hasznos és szükséges volt – nem csupán az összes As-kinyerés, hanem az egyenkénti módosulatok szemszögéből is, hiszen mindegyik extrakciójához hozzá tudott járulni.

#### **4.1.2. Referenciaanyag célzattal készített sima lepényhal (*Pleuroctes platessa*) As-módosulatanalitikai előkészítése az enzimes módszerek használhatóságának tükrében**

##### 4.1.2.1. Tapasztalati előzmények tengeri kagylómintákon végzett kísérletek alapján

A 2.3.2.4. alfejezetben ismertettem az As-módosulatanalitika enzimes mintaelőkészítésének elméleti háttérét, kiemelve azt a jellegzetességet, amely a legfőbb különbséget okozza a szelén-ill. arzéntartalmú minták kezelése között: míg szelén esetében a felhasznált enzimek közvetlenül bizonyos Se-módosulatokra (pl. a szeleno-aminosavakra) hatnak, addig a másik elemnél ez a hatás csak közvetett, mivel az enzimek a mintamátrix bontásán keresztül járulnak hozzá az As-módosulatok felszabadulásához. Ebből következik, hogy míg szelénél az enzimes mintaelőkészítés a „kötelezően” választandó módszerek egyike, addig arzénél inkább csak kiegészítő jellegű, nem feltétlenül alkalmazandó eljárásról van szó.

Az előző alfejezetben sikerült bizonyítani, hogy – legalábbis alacsonyabb rendű növényi szervezetek kezelésénél – a sejtfalbontás szignifikáns mértékben javított az extrakciós hatásokon. Állati eredetű mintáknál természetesen ilyen enzimre nincs szükség, és a fehérjebontó kezelés szerepelhet a járulékos mintaelőkészítések között. 1998 és 2002 között tanszékünk folyamatosan szerepet vállalt az első, akár több elem együttes módosulatanalitikai mérésének hitelesítésére szánt CRM-jelölt, a T34, T36, T37 és T38 jelek alatt futó osztrigakészítmény nemzetközi körelemzésében („Mulspot project”), a 9. számú laboratórium megjelölés alatt [MULSPOT 1998, MCSHEEHY 2003a]. A többéves munka folyamán a lehető legegyszerűbb mintaelőkészítésre való törekvés és ösztönzés miatt ill. a rendelkezésre álló mérőrendszer kívánalmaihoz igazodva egylépéses, emelt hőmérsékleten (70-80°C) végrehajtott, ioncserélt vízzel történő extrakció használata mellett döntöttünk. Ez a mindössze egyetlen órás eljárás 86-90%-os As-kinyerési hatások elérését tette lehetővé, amely – mint később, a hitelesítési összejövetelek során bizonyosságot nyert – a metanol használatára építő módszerekkel teljesen egyező és nemzetközi szinten helytálló eredményre vezetett. Tripszin vagy egyéb enzim alkalmazására a részt vevő tíz laboratórium mintaelőkészítési eljárásai között nem akadt példa. Korábban, az első As-módosulatanalitikai hiteles anyagminta, a CRM-627 előállításánál szerepelt egy enzimes módszer (4.1. fejezet ill. LAGARDE [1999]), mely abban az esetben megfelelő és felhasználható mintaelőkészítésnek adódott. A kérdés tehát adott: jár-e egyértelmű előnnyel, bír-e különösebb okkal az enzimes technika felhasználása a tengeri állatokból származó mintatípus módosulatanalitikai mintaelőkészítésénél. A válasz megadására a következő nemzetközi körelemzésben való szerepvállalás során került sor.

#### 4.1.2.2. A halminta bemutatása és a választott mintaelőkészítési megközelítés ismertetése

A „SEAS Project” keretében [SEAS 2002] sima lepényhalból készült, As-módosulatanalitikai minta előkészítését és elemzését hajtottuk végre. A minta LRM-jelöltként, tehát referenciaanyag minőségben érkezett hozzánk: por alakú, 125 µm-nél kisebb szemcseméretű, fagyasztva szárítással víztelenített, kellő mértékben stabil és homogén készítményen hajtottuk végre a vizsgálatokat. Az utóbbi két méréssorozat, tehát a stabilitás- és homogenitásvizsgálat teljesítése során a méréseket végző laboratórium (mely azonos a BRANCH [1994] közlemény háttérintézményével) minden esetben enzimes mintaelőkészítést hajtott végre, melynek paramétereit a körelemzésben szerepet vállaló laboratóriumok részére is hozzáférhetővé tették. A korábbi „Mulspot” mintákhoz képest itt tehát adott volt egy mintaelőkészítési módszer, mely ennél a halmintánál kétséget kizáróan alkalmasnak bizonyult az As-módosulatanalitikai célokra; ebből kifolyólag nem volt célszerű a körelemzési célzatú méréseinket eltérő eljárással kezelni. Ugyanakkor a rendelkezésre álló minta mennyisége lehetővé tette, hogy módszeres, előre tervezett megközelítés révén megállapíthassuk, szükséges-e enzimet felhasználni a lepényhal As-módosulatanalitikai mintaelőkészítése során.

A vizsgálatok HPLC-UV-HG-AFS elválasztástechnikai oldalát SZABÓ [2003] diplomadolgozata tartalmazza; értekezésemben csak a mintaelőkészítés optimalálására vonatkozó szakaszokra helyezem a hangsúlyt.

#### 4.1.2.3. A felhasznált vegyszerek és alkalmazott mintaelőkészítési eljárások bemutatása

A vizsgálatok során felhasznált  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  és tripszin jellemzőit a 3.2. fejezetben mutattam be. A körelemzési feladatokhoz a SEAS program keretében ismertetett paramétersereget használtam fel, mely a következő módon alakította ki a mintaelőkészítés menetét: 0,5 g mintát 15 ml-es fiolában 6,5 ml, 0,1 mol l<sup>-1</sup> koncentrációjú  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pufferben (pH=8,0) oldottam fel; ezt a folyamatot ultrahangos berendezés segítségével gyorsítottam. Ezt követően az előzővel azonos puffer 1 ml-ével 75 mg tripszin enzimet juttattam az elegyhez, és összekeverés után termosztált rázófürdőben 37°C hőmérsékleten, 14 órán át 200 perc<sup>-1</sup> fordulatszámon rázattam. A 3 párhuzamossal végrehajtott enzimes kezelés után centrifugálással (4100 g, 25 perc, 20°C) választottam szét az oldhatatlan részt az extrahált komponensektől, majd a létrejövő üledéket vortex berendezés segítségével még kétszer, egyenként 1-1 ml pufferoldattal öblítettem át, és újra elvégeztem a korábban ismertetett centrifugálási lépéseket. A műveletek befejezése után a centrifugálással kapott, összetartozó felülúszókat 0,45 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrőn keresztül juttattam 10,0 ml-es mérőlombikokba, amelyeket ioncserélt vízzel töltöttem jelre. Az így kapott oldatok kerültek a HPLC (As-módosulatanalitikai) és párhuzamos ICP-OES (összes As-tartalom) vizsgálatokra.

Az üledékeket és a hozzájuk tartozó membránszűrőlapokat savas roncsolással (3.1. fejezet) tártam fel a maradék arzéntartalom megállapítása végett, és a halminta összes As-tartalmát ugyanilyen eljárással határoztam meg.

#### 4.1.2.4. Az enzimes mintaelőkészítés főbb paramétereinek járulékos optimalizálása

Az előzőekben ismertetett enzimes módszer két olyan paraméterrel rendelkezik, melyek módosítása jelentős mértékben befolyásolhatja a kinyerési hatásfok alakulását: a minta / enzim arány változtatásáról és a kezelés időtartamáról van szó. Elvileg a kezelési hőmérséklet és a rázási fordulatszám is bemeneti változóként kezelhető, azonban ezek kevésbé számítanak rugalmas tényezőnek. Az előzőt ugyanis a tripszin optimális hőmérsékletének ismeretében (37°C) adott, ismert tényezőnek vehetjük; kisebb hőfokon a folyamat egyértelműen lassul az enzim alkalmazásától függő és attól független extrakciós folyamatok lassulása miatt, amely maga után vonja a hosszabb előkészítésben rejtőző, mikrobiológiai tevékenység miatt kialakuló módosulátalakulás veszélyét. A hőmérséklet emelése csökkentheti a mikrobiológiai behatás lehetőségét, de felvetheti a szerves As-módosulatok redox átmenete által kiváltott As(III)-As(V) átalakulási folyamat problémáját. A keverési fordulatszám tekintetében a rendelkezésre álló berendezésben a 160 perc<sup>-1</sup> már lassúnak számít és ülepedéshez vezethet, míg a 220 perc<sup>-1</sup> a fiolák oldalára történő mintakirakódást eredményez.

Két változó maradt tehát, melyek egymástól a jelen esetben nem feltétlenül függetlenek. Az enzimek *in vitro* körülmények között, az *in vivo* aktivitásuk és inaktiválódási időtartamuk tekintetében kedvezőtlenebb jellemvonásokkal bírhatnak, amely az idő függvényében csökkenő aktivitásban ölt testet. Adott hőmérsékleten az inaktiválódási görbe ismert lehet és meg lehet határozni, mennyi idő múlva esik le már nem jelentős szintre az adott enzim aktivitása. Ugyanakkor ennél a mintaelőkészítésnél maga a kevertetési folyamat – enzimek használata nélkül – is biztosan hozzájárul az As-módosulatok kinyeréséhez. Ezáltal a kezelés időtartama során állandóan változó körülmények jönnek létre: az enzimes reakció indításánál a mintamátrix még ép, amelyre a kevertetés még csak kisebb hatást tud kifejteni, viszont az enzim teljes aktivitásával működhet. A kezelés során az enzim aktivitása valószínűleg csökken, de a már részben bontott mátrixból a kevertetés könnyebben szabadítja fel az As-módosulatókat. Így egyértelmű, hogy a kezelési időtartam minden bizonnyal fontos – és egyúttal optimalizálható bemeneti változónak tekinthető. A másik változó természetesen a minta / enzim arány (m/m %-ban kifejezve); ezt az értéket növelni érdemes, hogy csökkentjük a mintaelőkészítés költségeit és a rendszerhez juttatott, részben mátrixként jelentkező enzim mennyiségét. Természetesen kevesebb enzim lassabban tárja fel a mintát, így hatással lesz az optimális kezelési időtartamra is.

Amennyiben nem lehet egyértelműen kizárni két változó függetlenségét a függő változó (jelen esetben a kinyerési hatásfok) tekintetében, úgy nem is célszerű egymástól független optimalizációs folyamatot vezetni. A statisztika fegyvertárának egyik, erre az esetre kiválóan alkalmazható eljárása a felület-válasz módszer (RSM): a két bemeneti, független változó ( $x_1$  = kezelési időtartam;  $x_2$  = enzimkoncentráció) tervezett lépésekben végrehajtott módosításával és a függő változó ( $y$  = kinyerési hatásfok) értékeinek mérésével lehetőség nyílik arra, hogy pl. a legkisebb négyzetek elvét követve polinom függvényekkel közelítsük az  $y \rightarrow (x_1, x_2)$  összefüggést. Amennyiben a függvény megoldásait  $x_1$ - $x_2$  tengelyű koordináta-rendszerben ábrázoljuk, az optimális bemeneti paraméterekre utaló  $y$ -értékek azonos felületen helyezkednek majd el; innen ered a „felület-válasz” elnevezés. Amíg különböző mérőrendszerek paramétereinek

optimálásánál az RSM és más, többváltozós statisztikai módszerek használata egyértelműen elterjedtnek tekinthető, addig a módosulatanalitikai mintaelőkészítés területén alig találunk rá példát; ismereteim szerint KIRBY és MAHER [2002] arzén-, ill. MASSUMI et al. [2002] króm-módosulatanalitikai alkalmazásai számítanak ritka kivételnek.

A (kinyerési hatások) vs. (kezelési időtartam; minta/enzim arány) összefüggés megállapításához szükséges bemeneti változók vizsgált értékeit és az alkalmazásuk segítségével elért kinyerési hatásfokokat a 7. Melléklet táblázata hordozza.

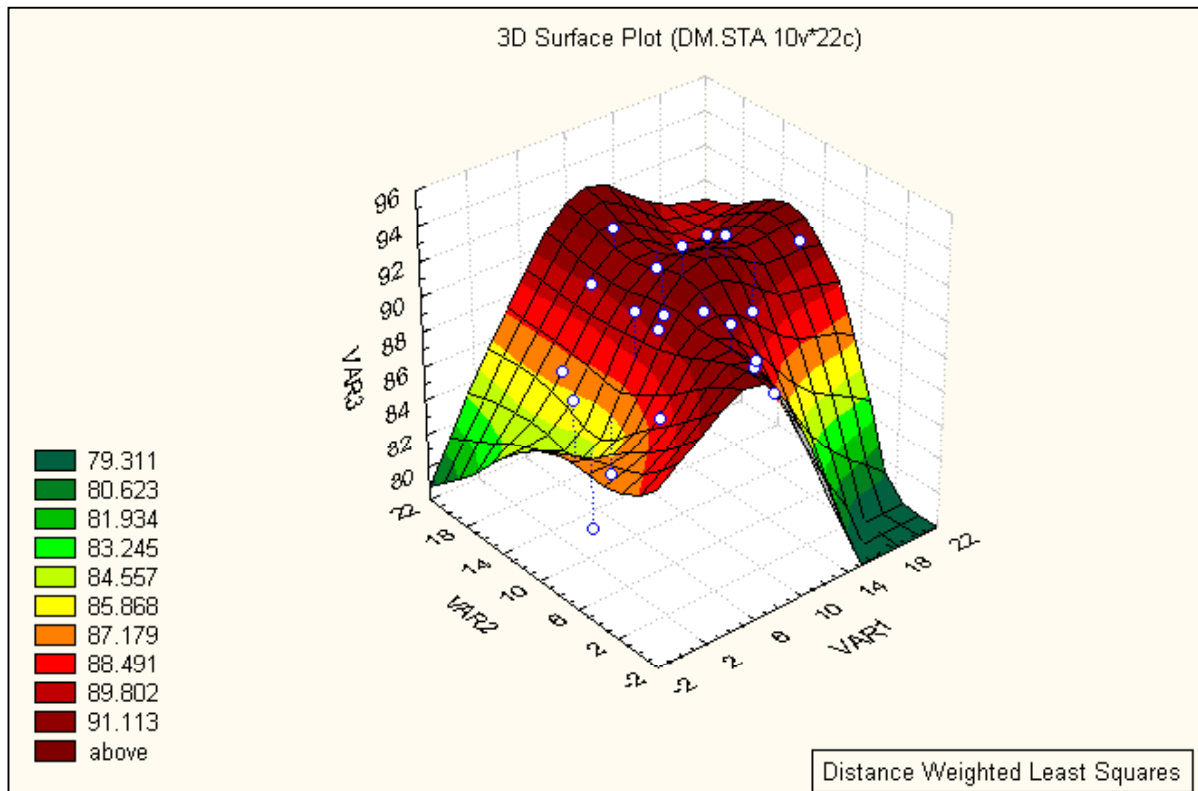
#### 4.1.2.5. A halminta módosulatanalitikai elemzése és a mintaelőkészítés optimálása során kapott eredmények értékelése

A lepényhal As-tartalmának megoszlását és összes ill. módosulatokra vonatkozó értékeit a 2. táblázat ismerteti. A halmintát szolgáltató laboratórium által használt enzimes módszerrel 99,5%-os kinyerési hatásfokot lehetett elérni, amely gyakorlatilag teljes extrakciót jelent. Egyetlen módosulatot, az AsB-t lehetett mennyiségileg és minőségileg is meghatározni, mely az extrahált As-tartalom 84,4%-át tette ki. A kinyert és azonosított érték különbsége egyrészt olyan módosulatok jelenlétéből fakadhat, melyek az alkalmazott UV-besugárzás után sem képeznek hidridet, így mintegy „elvesznek” az AFS detektor számára, másrészt a módosulatanalitikai mérések bizonytalansága sokszorosa az ICP-OES meghatározásoknak, tehát nem zárható ki a ténylegesen nagyobb azonosítási arány megléte. Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy az általunk szolgáltatott, táblázatban bemutatott mérési eredmények a SEAS nemzetközi körelemzésben megegyeztek a párhuzamosan dolgozó külföldi laboratóriumok eredményeivel, tehát a teljes mérésre vonatkozóan (beleértve a mintaelőkészítést is) nem áll fenn módszeres hiba jelente és a rendszer valódi minták mérésére alkalmasnak tekinthető. Egy ilyen, ténylegesen gyakorlati élelmiszermintá (mélyfagyasztott tengeri rák) As-módosulatanalitikai mintaelőkészítését és mérését SZABÓ [2003] diplomadolgozata részletezi.

**2. Táblázat. A "SEAS" jelű halmintából savas roncsolással ill. enzimes mintaelőkészítés segítségével kinyert összes As- és AsB-tartalom.**

<i>Mérőrendszer / As-megoszlás</i>	<i>ICP-OES</i>	<i>HPLC-UV-HG-AFS</i>
Összes As, $\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{RSD}$	43,7 $\pm$ 1,1	—
Enzimes extrakcióval kinyert As, $\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{RSD}$	43,5 $\pm$ 2,1	—
AsB-tartalom, $\mu\text{g As g}^{-1} \pm \text{RSD}$	—	36,7 $\pm$ 7,8
Kinyerési hatások az összes As-tartalom %-ában	99,5	—
Azonosítási hatások a kinyert As-tartalom %-ában	84,4	—

Az eredeti mintaelőkészítési módszer alkalmazásának szükségességét ill. az adott paramétereknek az elméleti optimális értéktől való távolságát az előző alfejezetben leírtak alapján, statisztikai elveken nyugvó megközelítéssel vizsgáltuk meg. A STATISTICA statisztikai programcsomag segítségével a 7. Mellékletben szereplő adatok alapján közelített polinom függvény megoldásai a 3. ábra láthatóak; sajnos a program magyar nyelvű változata nem volt hozzáférhető, így a feliratok angol nyelvűek és magyarázatukat az ábrafelirat tartalmazza.



3. Ábra. A 7. Mellékletben bemutatott független változó párosítások által eredményezett As-kinyerési hatások értékei alapján, a legkisebb négyzetek elvét követve („Distance Weighted Least Squares”) illesztett polinom függvény megoldásait bemutató 3 dimenziós kép („3 D Surface Plot”). VAR1=extrakció időtartama órában; VAR2=tripszin koncentráció m/m %-ban; VAR3=As-kinyerési hatások, %-ban. A fehér pontok a mellékletben ismertetett párosításokhoz tartozó mérési eredményeket mutatják. A zöld területek kisebb, míg a vörös részek a nagyobb kinyerési hatásokra utalnak; „above” jelentése: felett.

Az ábra alapján elsősorban az tűnik szembe, hogy a két változó közül az extrakciós idő (VAR1) jóval fontosabb tényező az enzimkoncentrációnál. Bár a független változó párosítások nem fedik le teljesen az összes lehetséges variációt, egyértelműen kiderül, hogy amennyiben a rázatás legalább 5-6 órát tesz ki, úgy enzim használatára egyáltalán nincs szükség a nagy (90%-ot meghaladó) extrakciós hatások eléréséhez. Rövidebb extrakciós idő esetében pedig még a 10 m/m %-ot meghaladó enzim adagolásával sem lehet 85-87%-os hatások fölé kerülni. Összefoglalásként azt lehet kijelenteni, hogy az  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  puffer – és nagy valószínűség szerint már az ioncserélt víz is – az alkalmazott hőmérsékleten enzim használata nélkül, viszonylag rövid idő (5-6 óra) alatt is mennyiségileg azonos kinyerésre vezetett az eredetileg használt tripszines mintaelőkészítéssel. Ezáltal egyszerűbb, kisebb költségigényű és a mintamatrixot enzimfehérjékkel tovább nem terhelő mintaelőkészítési módszert lehet választani.

Természetesen ezen optimalizációs folyamat eredménye nem vihető át teljes mértékben más tengeri eredetű (hal, rák, kagyló) minta mérésére; bár eddig nem talákoztunk sem olyan közleménnyel, mely az ilyen jellegű minták enzimes mintaelőkészítés egyértelmű előnyeire utalt volna, és – mint ahogy az osztrigaminta esetén is bizonyossá vált – laboratóriumunk sem igazolta a tripszin használatának szükségességét. Nagyon valószínű, hogy a tengeri (és állati eredetű) minták zsírtartalma sokkal fontosabb és döntőbb jellegű paraméterként kell, hogy szerepeljen

egy ismeretlen minta As-módosulatanalitikai mintaelőkészítésének tervezésénél, mint a fehérjebontó enzimes kezelés felhasználásának kérdése.

#### **4.1.3. A vizsgált arzéntartalmú minták enzimes mintaelőkészítésének kritikai vizsgálata során elért új tudományos eredmények**

Arzénnel dúsított algaminta vizsgálatával igazoltam, hogy sejtfalbontó (drizeláz) enzimes kezeléssel szignifikáns mértékben növelni lehet mind az összes arzén, mind pedig az As-módosulatok kinyerését.

Többváltozós statisztikai módszer (RSM) segítségével igazoltam, hogy természetes (nem dúsított) As-tartalmú halminta módosulatanalitikai mintaelőkészítése során fehérjebontó enzimmel (tripszinnel) végzett kezeléssel nem lehetett szignifikánsan nagyobb As-kinyerési hatásfokot elérni az enzimet nem alkalmazó módszerek használatához képest.

#### **4.2. SZELENNEL DÚSÍTOTT ÉLESZTŐMINTÁK MÓDOSULATANALITIKAI MINTAELEKÉSZÍTÉSÉNEK KIDOLGOZÁSA**

A szelén módosulatanalitika kétségtelenül leggyakrabban vizsgált mintája a Se-dúsított pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*; ld. 2.3.1.5.3. alfejezet). Különösen a CLARK-féle tanulmány [1996] közlése óta jelentek meg egyre nagyobb számban az ezzel a viszonylag könnyen előállítható, túlnyomórészt SeMet-t tartalmazó és elvileg a legtöbb, szelénpótlási céllal forgalomba hozott étrendi kiegészítő alapjául szolgáló, egysejtű élőlényrel foglalkozó cikkek. Mivel a Se-módosulatanalitika a mai napig nem rendelkezik egyetlen referenciaanyaggal sem, a szelén élesztő alkalmasnak tűnt arra is, hogy ezt az űrt betöltve nemzetközi körelemzések alapját képezze, s így járuljon hozzá a tudományterület fejlődéséhez. Ugyanakkor hamar világossá vált, hogy az élesztők fajtól és fermentációs paramétereiktől függően eltérő összetételű biomasszát képeznek, amely megnyilvánulhat egyrészt a SeMet és a többi, kisebb mennyiségben előforduló, köztes Se-anyagcsere vegyület (pl. Se-adenozil-származékok) különböző mennyiségi arányaiban, másrészt az élesztő fehérjéken kívüli sejtalkotóinak, például a lipidek és a sejtfal összetételének / relatív mennyiségének változásában. Hasonló módon, a fermentáció során felhasználható szerves szelénmódosulatok (Se(VI), Se(IV)) típusa, valamint az adagolás – és így a fermentáció vezetésének (rátáplálásos /”fed-batch”/ vagy folytonos) – jellege is nagymértékben befolyásolhatja mind az elérhető dúsítás mértékét, mind pedig a beépülés fokát. Az utóbbi jellemvonás különösen fontos, hiszen rosszul vezetett fermentáció esetén jelentős mennyiségű szerves szelén maradhat az élesztőkészítményben, amely az így egyszerre jelen lévő, különböző Se-módosulatok eltérő biológiai hozzáférhetőségén, felvehetőségén és hasznosulásán keresztül nehezíti a felhasználási mód és a napi fogyasztható mennyiség megadását. Már az első védett szabadalom is, melyet Se-dúsított élesztő előállítására nyújtottak be [NAGODAWITHANA 1985], kiemelten foglalkozott a szerves szelén jelenlétének közvetett módon, módosulatanalitikai mérések nélkül (metilénké-redukciós teszt révén) történő kizárásával, amelyet mások is átvettek [DEMIRCI 1999a,b].



Az összetételben tapasztalt eltérések azt eredményezték, hogy egy ideig egymásnak részben ellentmondó közlemények jelentek meg a pékélesztő által hordozott Se-módosulatokról és az egyébként hasonló mintaelőkészítési eljárások által elérhető kinyerési hatások értékeiről. Majd 1999-ben a Se-módosulatanalitikai vizsgálatokkal foglalkozó laboratóriumok számára, így tanszékünknek is, elérhetővé vált a „Se-21” jelű élesztőminta, mely kimondottan a mintaelőkészítési módszerek és módosulatanalitikai mérőrendszerek összevetését célozta meg. Ennek a mintának a segítségével több eljárást dolgoztam ki és hasonlítottam össze, s ezáltal kialakítottam egy általános, a Se-módosulatanalitikai minták előkészítésére használható megközelítést, egyfajta metodikát, melyet más szelén élesztőkön és a későbbiekben bemutatásra kerülő kalapos gomba ill. brazil dió mintáknál is felhasználtam.

Ez az alfejezet a szelénel dúsított élesztőkön végzett, módosulatanalitikai mintaelőkészítés fejlesztését célzó kísérleteimet mutatja be. A HPLC-mérőrendszerek kialakítását, fejlesztési lépéseit és működtetési körülményeit a HPLC-HHPN-AFS összeállítás esetében IPOLYI et al. közleménye [2001a] és ZUBOR [2000] diplomadolgozata ismerteti, míg a HPLC-UV-HG-AFS csatolt rendszert IPOLYI et al. közleménye [2001b] és CSABAI [2003] diplomadolgozata tartalmazza.

#### **4.2.1. A „Se-21” jelű, szelénel dúsított élesztő módosulatanalitikai mintaelőkészítésének kidolgozása**

##### **4.2.1.1. A minta bemutatása és a választott mintaelőkészítési megközelítés ismertetése**

A „Se-21” jelű élesztőminta előállításáról nem rendelkezünk adatokkal; előzetesen csupán a készítmény körülbelüli összes Se-tartalma ( $1-2 \text{ mg g}^{-1}$  nagyságrendben) és LRM szintű előkezelése volt ismert – ez utóbbi minősítés szerint homogenitása és stabilitása alkalmassá tette nemzetközi körelemzéseken való vizsgálatokra. A mintaelőkészítéssel kapcsolatban előírások nem szűkítették mozgásteremet; ebből kifolyólag olyan eljárások alkalmazását tűztem ki célul, melyek segítségével a lehető legtöbb információt lehetett kinyerni a módosulatanalitikai vizsgálatok során. Így mindenképpen célszerűnek tűnt a következő módszerek alkalmazása: (i) az ioncserélt vízzel történő extrakció, mivel várhatóan az ezzel a lépéssel extrahált szerves Se-módosulat áruklodhat majd a fermentációs folyamatban felhasznált dúsító vegyületről; (ii) sejtfalbontó enzimmel végrehajtott kezelés, amely egyrészt felszabadíthatja a sejtfalhoz kötődő, Se-tartalmú komponenseket, és segítheti a fehérjebontó enzimek hozzáférését az intracelluláris fehérjékhez, másrészt a kinyerési hatásokban megmutatkozó hasznossága/felesleges volta az élesztő biomassza fermentációt követő kezelési eljárásaira, pontosabban azok erőteljes/gyengéd behatásaira utaló jelként értelmezhető; (iii) fehérjebontó enzimmel végzett kezelés, amely elengedhetetlen a szerves eredetű, Se-tartalmú minták vizsgálatánál a feltételezhetően fehérjékbe (is) épült ill. fehérjealkotó Se-módosulatok miatt; (iv) lipidbontó enzim alkalmazása, amely az extrakciót és az azt követő elválasztástechnikai lépést teheti eredményesebbé és könnyebbé az esetleg zavaró mértékben jelen lévő, mátrixalkotó lipidek bontása által. A kezeléseket mind egyenként, mind pedig – ahol az egymásra építéssel szinergens hatás kialakulására lehetett számítani – szekvenciális kialakítással is végrehajtottam. Természetesen nem fordultam olyan

módszerek egyedi használatához, melyek szükségességét sem szakmailag, sem pedig irodalmi adatokkal nem lehetett alátámasztani – így pl. csak lipidbontó vagy csak sejtfalbontó enzimre építő extrakcióra nem került sor.

#### 4.2.1.2. A felhasznált vegyszerek és alkalmazott mintaelőkészítési eljárások bemutatása

Az enzimes mintaelőkészítés során drizeláz, lipáz és pronáz enzimekkel hajtottam végre kezeléseket, melyek jellemzőit a 3.2. fejezet tartalmazza, a pufferek készítéséhez használt  $K_2HPO_4$  és  $KH_2PO_4$  sókkal együtt. A mintaelőkészítéseket 15 ml-es fiolákban végeztem, amelyekbe egyenként 170-180 mg Se-dúsított élesztőport mértem ki, majd a következőekben (A-D) ismertetett extrakciók kerültek sorra, 180 perc<sup>-1</sup> fordulatszámú, termosztált rázógép segítségével. Az egyenként 3 párhuzamossal végrehajtott mintaelőkészítő lépések után centrifugálással (3700 g, 20 perc, 20°C) választottam szét az oldhatatlan részt az extrahált komponensektől; többlépéses módszer esetén a centrifugálással létrejövő üledéket használtam fel a soron következő lépéshez. A „B”, „C” és „D” eljárásokat az említett, teljes műveletre vonatkozó párhuzamos méréseken kívül még annyi kiegészítő párhuzamossal végeztem el, hogy meg lehessen határozni a lépésenkénti kinyerési határfok értékeit: ezekben az esetekben ugyanis az adott mintaelőkészítési műveletet követően a centrifugálással leválasztott üledék a soron következő extrakciós lépés helyett savas roncsolásra került, tehát további (pl. enzimes) kezelésére már nem nyílt lehetőség.

**A.**, 3,6 ml, 0,05 mol l<sup>-1</sup> foszfátpufferben (pH=7,4) oldott 20 mg pronáz enzimmel végrehajtott kezelés, 21 órán keresztül, 37°C hőmérsékleten;

**B.**, 1. lépés: 3,6 ml ioncserélt víz (pH=5,7), 1 órán keresztül, 60°C hőmérsékleten; 2. lépés: 3,6 ml, 0,05 mol l<sup>-1</sup> foszfátpufferben (pH=7,4) oldott 20 mg pronázt tartalmazó oldat, 21 órán keresztül, 37°C hőmérsékleten;

**C.**, 1. lépés: 3,6 ml ioncserélt víz (pH=5,7), 1 órán keresztül, 60°C hőmérsékleten; 2. lépés: 3,0 ml, 0,1 mol l<sup>-1</sup> foszfátpufferben (pH=7,4) oldott 10 mg lipázt tartalmazó oldat, 37°C hőmérsékleten, 1 órán keresztül, amelyet 0,6 ml pufferben oldva 20 mg pronáz hozzáadása követ, további 20 órás kezeléssel, tartva a 37°C fokos hőmérsékletet;

**D.**, 1. lépés: 3,6 ml ioncserélt víz (pH=5,7), 1 órán keresztül, 60°C hőmérsékleten; 2. lépés: 3,6 ml ioncserélt vízzel készített (pH=5,7) 1 m/v %-os drizeláz oldat, 4 órán keresztül, 37°C hőmérsékleten; 3. lépés: 3,0 ml, 0,1 mol l<sup>-1</sup> foszfátpufferben (pH=7,4) oldott 10 mg lipázt tartalmazó oldat, 37°C hőmérsékleten, 1 órán keresztül, amelyet 0,6 ml pufferben oldva 20 mg pronáz hozzáadása követ, további 20 órás kezeléssel, tartva a 37°C fokos hőmérsékletet.

A műveletek befejezése után a centrifugálással kapott felülúszókat 0,45 µm porúsátmérőjű fecskendőszűrőn keresztül juttattam 5,0 ml-es mérőlombikokba, amelyeket végül ioncserélt vízzel töltöttem jelre. Az így kapott oldatok a mintaelőkészítéstől függően kerültek HPLC (Se-módosulatanalitikai) és/vagy párhuzamos ICP-OES (összes Se-tartalom) vizsgálatokra. Az üledéket és a hozzájuk tartozó membránszűrőlapokat savas roncsolással (3.1. fejezet) tártam fel a maradék szeléntartalom megállapítása végett; a kezeletlen élesztő összes Se-tartalmát ugyanilyen eljárással határoztam meg.

#### 4.2.1.3. A különböző mintaelőkészítési módszerek és az elért extrakciós hatásfokok bemutatása – az eredmények értékelése

A négy mintaelőkészítési eljárás (A-D) nem csupán végrehajtásukat illetően különbözött egymástól: azokat az eltérő megközelítési módokat is tükrözik, ahogyan a csak részben ismert, szerves eredetű, Se-módosulatanalitikai vizsgálatra szánt mintákhoz fordulni érdemes. Közös bennük az, hogy enzimes fehérjehidrolízisre építék alkalmazásuk során; ugyanakkor a kísérő enzimek és többlépéses eljárások felhasználása olyan többletinformációt biztosíthat, amellyel a módosulatanalitikai eredményeken túlmutató ismeretanyagra is szert lehet tenni, gyakran akár nem sokkal idő- vagy költségigényesebb módszerek árán. Egyértelműen az egylépéses, széles szubsztrátspektrumú fehérjebontó enzim alkalmazására építő eljárás („A”) számít a legegyszerűbbnek; azonban figyelembe kell venni, hogy amennyiben az ezzel a módszerrel végrehajtott mintaelőkészítés után szervesen Se-módosulatok jelenlétét tudjuk kimutatni, úgy nincs lehetőség annak eldöntésére, hogy ez a Se-frakció eredetileg is jelen volt-e a mintában, vagy pedig a mintaelőkészítés során jöttek létre más Se-módosulatból történő átalakulással. Ennek eldöntésének céljából fordultam az ioncserélt vízzel történő extrakcióhoz a többi három módszer első lépéseként beillesztve, 60°C fokon, amely még bizonyosan nem vált ki módosulátátalakulást, de nagy valószínűséggel oldatba tudja vinni a rendszerint könnyen extrahálható szervesen Se-módosulatokat – feltéve, hogy jelen vannak a mintában (ld. 2.3.1.2. fejezet). A „B” módszer tehát a vizes extrakció és az „A” módszer egymás mögé építésével jött létre. A „C” eljárás különálló jellegét a párhuzamos enzimes lipid hidrolízis alkalmazása jelenti, amely az esetleg nagyobb mértékben jelen lévő és homogén oldat kialakulását nehezítő lipid vegyületek bontásával járulhat hozzá az extrakciós hatásfok növeléséhez. Mivel ebben az esetben a fehérjebontó enzim valószínűleg a lipázt is szubsztrátként kezeli, 1 órán keresztül csak a lipáz működését tettem lehetővé, és csupán ezt követően adagoltam – az egyébként nagy feleslegben felhasznált – pronáz enzimet. Gyakorlati tapasztalatok alapján a lipidbontással együtt járó pH-csökkenés ellensúlyozására a 0,05 mol l<sup>-1</sup> foszfátpuffer koncentrációját 0,1 mol l<sup>-1</sup>-re emeltem. A „D” módszer abban különbözött az összes többitől, hogy sejtfalbontási lépéssel egészítette ki a szeléntartalmú élesztő kezelését; ettől a második lépéstől azt lehetett várni, hogy az élesztősejtfal alkotóinak bontásán keresztül teheti könnyebbé a harmadik lépésben következő fehérjebontás menetét.

A kezeletlen eredeti élesztőminta savas roncsolás után ICP-OES technikával meghatározott összes Se-tartalma 1352 µg g<sup>-1</sup>-ot tett ki (RSD: 1,1%); ezt az értéket vettem alapul akkor, amikor a 3. táblázatban bemutattam a négy mintaelőkészítési eljárással elérhető kinyerési hatásfok relatív értékeit, melyeket a centrifugálási lépések után létrejövő üledékek (ugyancsak) savas roncsolása révén lehetett meghatározni.

**3. Táblázat. A „Se-21” élesztőmintán alkalmazott mintaelőkészítési módszerek segítségével elért relatív kinyerési hatások értékei, az élesztő összes Se-tartalmának (1352 µg g<sup>-1</sup>) százalékában.**

Mintaelőkészítési módszer jele	Egyes mintaelőkészítési szakaszok				Összesítve
	Vizes extrakció	Sejtfalbontás	Együttes lipid- és fehérjebontás	Fehérjebontás	
A	—	—	—	88,6%	88,6%
B	12,4%	—	—	77,7%	90,1%
C	11,7%	—	79,1%	—	90,8%
D	11,9%	8,1%	70,1%	—	90,1%

Mint várható volt, nem lehetett szignifikáns különbséget kimutatni azon mintaelőkészítési eljárások első lépéseinek extrakciós értékeiben, melyek ugyanazon (ioncserélt vízzel végrehajtott) kezelést tartalmazták (ld. második oszlop). Ugyanakkor a táblázat utolsó oszlopában feltüntetésre került, összesített hatások között sem tapasztaltam mérhető eltérést: sem a páronként elvégzett Welch-próbák, sem pedig az egytényezős varianciaanalízis nem talált szignifikáns különbséget a négy módszer között. A „C” és „D” eljárásokban a lipidbontó enzim párhuzamos alkalmazása nem vezetett nagyobb kinyerési hatásokhoz a csupán pronázt tartalmazó extraháló elegyekhez képest. A sejtfalbontó enzim működése – külön, független lépésként illetve a „D” műveleti sorba –, bár mérhető szelénfelszabadulással járt együtt, összességében nem tekinthető elengedhetetlen szereplőnek a mintaelőkészítés folyamatában.

Ezen eredmények alapján több következtetést is le lehet szűrni: (a) a mind a négy módszerben felhasznált pronázos kezelés döntő fontosságúnak bizonyult, hiszen a kísérő kezelések meglététől függetlenül is, a kombinált kezelésekkel statisztikailag azonos (90% körüli) kinyerési hatások elérését tette lehetővé; (b) a sejtfalbontó enzim – az összes Se-tartalomra vetítve – statisztikailag szükségtelen alkalmazása arra utalhat, hogy a „Se-21” élesztő előállítása során sem a fermentáció vezetése, sem pedig az azt követő – valószínűleg porlasztva szárítással végrehajtott – víztartalom-csökkentés nem a sejtek épségének megőrzése jegyében zajlott, az élesztősejtek nagymértékben károsodhattak, így a fehérjehidrolízis az intracelluláris sejtalkotókat is elérhette; (c) a minta lipidtartalma nem számottevő, nem akadályozza az enzimes mintaelőkészítés folyamatát, így lipidbontó enzim használatára – az összes Se-tartalomra vetített kinyerési hatások szempontjából – nincs szükség.

A másodikként említett (b) következtetés összhangot mutat azokkal az eredményekkel, melyekre ZUBOR [2000] a laboratóriumunkban előállított [PRUNK 2000], szelénrel dúsított friss pékélesztő módosulatanalitikai vizsgálata során jutott: az ő esetében még a kombinált enzimes mintaelőkészítés révén sem sikerült 64% fölé emelni a mintából kinyerhető szelén mennyiségét, tehát a sejtfal épsége valószínűleg fontos összetevőnek tekinthető az extrakciós műveletek hatásfokának alakulásában.

Bár az összes Se-tartalomra vonatkoztatott extrakciós hatásfokokat tekintve nem tapasztaltam szignifikáns különbséget, a módosulatanalitikai vizsgálatokra célszerű volt azt a mintaelőkészítési módszert választani, amely a legtöbb járulékos információval szolgálhat mind a mintáról, mind pedig magáról a mintaelőkészítési műveletek egyenkénti hatásáról. Ebből kifolyólag a „D” jelű módszert választottam, és mindhárom kezelési szakaszát követően a

centrifugálás segítségével elválasztott és mikroszűrővel tovább tisztított, extrahált komponenseket tartalmazó oldatot HPLC-HHPN-AFS mérőrendszer segítségével elemeztük a Se-módosulatok minőségi és mennyiségi meghatározása végett.

#### 4.2.1.4. A módosulatanalitikai vizsgálatok eredményeinek ismertetése és értékelése

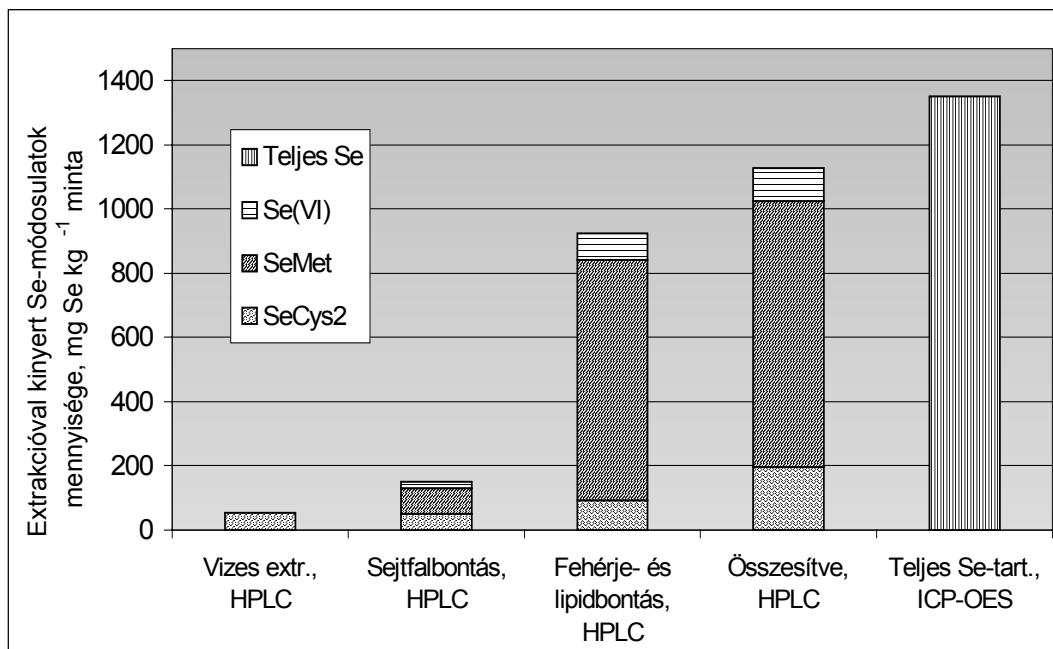
A „D” jelű, háromlépéses mintaelőkészítési módszerrel elért módosulatanalitikai és hatásfokokra ill. megoszlásokra vonatkozó eredményeket a 4. táblázat és a 4. ábra tartalmazza. Az összesített kinyerési hatásfok kissé meghaladta a 90%-ot, és a 4. táblázat legalsó sorában feltüntetett megoszlási adatok szerint hasonló képet mutatott a korábbi, még módosulatanalitikai mérések nélküli kísérlet eredményével. Három Se-módosulatot, a két szeleno-aminosavat (SeCys<sub>2</sub> és SeMet) és a szerves Se(VI)-ot mutattunk ki az egyes mintaelőkészítési lépések során kapott mintaoldatokból; e három vegyület eloszlása jellegzetes képet ad a „D” módszer egyes lépéseinek mintára kifejtett hatásairól – és természetesen magáról a mintáról is.

**4. Táblázat. „Se-21” szelénrel dúsított élesztőminta háromlépéses enzimes mintaelőkészítés révén kinyert Se-módosulatainak megoszlásának és az elért kinyerési hatásfoknak bemutatása. K.H. = kimutatási határ**

Mérőrendszer	HPLC-HHPN-AFS eredmények, µg Se g <sup>-1</sup> minta				ICP-OES eredmények, µg Se g <sup>-1</sup> minta		
	Vizes extrakció	Sejtfal- bontás	Fehérje-és lipidbontás	Összesítve (zárójelben %- os értéként)	Nem kinyerhető Se-tartalom	Minta összes Se-tartalma	Kinyerési hatásfok
SeCys <sub>2</sub>	54	51	92	197 (17)	131	1352	90,3%
SeMet	<K.H.	80	749	829 (74)			
Se(VI)	<K.H.	21	82	103 (9)			
<b>Összesítve</b>	54	152	923	1129 (100)			
Extrakciós lépésenként kinyert szelén megoszlása							
Az azonosított Se- módosulatok megoszlása az összes Se-tartalom %-ában	4%	11%	68%	83%			
Lépésenként felszabadított Se megoszlása az összes Se-tartalom %-ában	11,5%	8,0%	70,8%	90,3%			

Az első, csupán ioncserélt vízzel végrehajtott extrakció során szerves Se-módosulatot nem azonosítottunk a felülúszóban, amely ekkor még arra engedett következtetni, hogy az élesztő fermentációs folyamata során minden bizonnyal nem követte el technikai hibát és a dúsításhoz használt szelénsó teljes mértékben felvételre és az anyagcsere-folyamatokon keresztül beépítésre került. A retenciós idő alapján végrehajtott módosulatazonosítás SeCys<sub>2</sub> jelenlétét igazolta ebben a frakcióban; nagyon valószínű, hogy ez a komponens a szelénrel dúsított élesztő legnagyobb mennyiségben szintetizált Se-módosulatának, a SeMet-nak oxidált formája, a szeleno-oxo-metionin (SeOMet; ld. 2.3.1.8. szakirodalmi alfejezet). Ha ez a feltevés igaz, akkor részben – a különböző Se-módosulatok eltérő meredekségű kalibrációs egyenesei miatt – magyarázatul szolgálhat a táblázat utolsó két sorának ioncserélt vízzel végrehajtott kezelésre vonatkozó, megoszlási arányokban tapasztalt eltérésnek: lehetséges, hogy a SeCys<sub>2</sub>-ként

azonosított és mennyiségileg meghatározott komponens valójában SeOMet és ez a módosulat adja a kinyert 11,5%-nyi szelén jelentős részét. Természetesen más, ugyanezen retenciós idő környékén eluálódó módosulat jelenléte is okozhatta az előbb említett különbséget.



4. Ábra. „Se-21” szelénrel dúsított élesztőminta háromlépéses enzimes minta-előkészítés révén kinyert Se-módosulatainak megoszlásának bemutatása.

A sejtfalbontási lépés során további két módosulat, a SeMet és a Se(VI) jelent meg az extraktumban, 8%-kal járulva hozzá – a frakció összes Se-tartalmát tekintve – az összesített kinyerési hatásokhoz. A tény, hogy SeMet fordul elő a sejtfalbontó enzimkeverékkel végzett feltárásnak köszönhetően, arra utal, hogy a drizeláz számottevő fehérjebontó aktivitással is rendelkezik – ez a lehetőség ill. aktivitás a gyártó cég (Fluka) katalógusában is említésre került. Ebből az következik, hogy amennyiben szét szeretnénk választani a különböző kezelések során előforduló enzimaktivitásokat, és a fehérjebontást a tisztán fehérjebontási céllal adagolt enzim alkalmazási lépésénél szeretnénk teljessé tenni, úgy célszerű szelektíven gátolni a keverék ilyen irányú aktivitását. A Se(VI) megjelenése nem várt fejleménynek tekinthető: a szelénés élesztőt gyártó cégek többnyire a kisebb költséggel beszerezhető Na-szelenit (Se(IV)) sókat használják fel a Se(VI) vegyületek helyett, és így rosszul vezetett fermentáció vagy „hamisítás” (=fermentáció leállítását követően Se(IV)-tartalmú sóoldat élesztő biomasszához történő keverése) esetén ennek a módosulatnak a kimutatása szolgál általában figyelmeztető jelként, enzimes extrakció nélküli, pl. ioncserélt vízzel vagy pufferrel végrehajtott extrakció útján [B'HYMER 2000]. Ráadásul a Se(VI) szerepel a harmadik extrakciós lépés, a fehérjebontás során nyert felülúszóban is, és Se(IV) jelenléte egyik alkalommal sem kíséri. Mivel az élesztő az anyagcseréjébe bekerülő szelenátokat szelenitté redukálja a szulfát-szulfid anyagcseréhez hasonlóan [ONO 1996; DEMIRCI 1999a,b], a Se(VI) valószínűleg az élesztő által fel nem vett, ennél a mintánál dúsításra használt szelenátból származhat. Úgy tűnik, hogy ez a módosulat a Se(IV)-nél erősebben kötődik a mintamátrixhoz, és felszabadításához a mátrix (itt enzimes úton történő)

bontása és/vagy az alkalmazott foszfátpuffer ioncserélő hatása (foszfátok $\leftrightarrow$ szenátok) is szükségesnek bizonyult. Fontos rögzíteni, hogy az itt alkalmazott mintaelőkészítési lépések bizonyítottan nem alakítják át a kinyerhető Se-módosulatokat [ZUBOR 2000], tehát pl. a Se(VI) nem egy esetleges, mintaelőkészítés közben végbemenő Se(IV) oxidáció eredménye.

Az első lépés megoszlási paraméterekben tapasztalt eltéréseihez képest a második lépésnél kinyert összes Se-tartalommal (8%) kapcsolatban javuló tendencia figyelhető meg az azonosított Se-módosulatokhoz (11%) történő viszonyítás terén: az itt is SeCys<sub>2</sub>-ként kezelt módosulat aránya csökkent a két másik, nagyobb biztonsággal azonosított módosulatokhoz (SeMet és Se(VI)) képest, így a két, százalékban kifejezett érték közeledett egymáshoz. Ugyanígy a harmadik, pronázzal végzett fehérjehidrolízisnél a két megoszlási paraméter szinte teljesen megegyezik (68% és 70,8%), amely arra utal, hogy arányaiban még tovább nőtt a „biztos” módosulatok mennyisége. A pronázos kezelés révén a fehérjék bontásával nagy mennyiségben szabadult fel SeMet, és az előbb említett okokból kifolyólag a kezelés további Se(VI) kioldódásához is vezetett.

Összességében az élesztőmintából kinyert és azonosított Se-módosulatok közül a SeMet domináns jellege nyilvánvalóvá vált, és kisebb mennyiségben még szervesetlen módosulat (Se(VI)) is meghatározásra került, a bizonytalan azonosítású SeCys<sub>2</sub>-nel együtt. Ugyanakkor érdemes megemlíteni, hogy a korábban jelzett (2.3.1.8. alfejezet), az utóbbi módosulat élesztőben gyanított hiányára utaló cikk óta még mindig jelennek meg olyan közlemények, melyek továbbra is SeCys<sub>2</sub> azonosításáról számolnak be élesztőminták vizsgálatánál [ZHENG 2003]; ebből következik, hogy ezen a területen is további vizsgálatokra van szükség. A pronázos extrakció utolsó (harmadik) kezelési lépésben mutatott sikeres volta közvetett bizonyítékul szolgál arra, hogy a megelőző lépések során alkalmazott eljárások ellenére az élesztő fehérjei továbbra is centrifugálással ülepíthetőek maradtak, tehát rendelkezésre álltak a soron következő mintaelőkészítési lépések számára. A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy az élesztő esetében – amennyiben nem feltétlenül szükséges – nem kell ragaszkodni az egylépéses mintaelőkészítési eljárásokhoz, és szekvenciális módszerek fejlesztésével valóban lehetőség nyílt járulékos ismeretek szerzésére; ennél a mintánál minderre jó példaként szolgálhat a sejtfalbontó enzimkeverék hatásának (SeMet extrakció) és Se(VI) viselkedésének (Se(IV)-hez képest megfigyelt, valószínűleg erősebb mátrix-kötődés) megfigyelése.

## **4.2.2. LRM céljából készített Se-dúsított élesztő módosulatanalitikai vizsgálata**

### **4.2.2.1. A minta bemutatása és a választott mintaelőkészítési megközelítés ismertetése**

A 4.1.2.2. fejezetben említésre került a SEAS program, melynek keretében As- és Se-módosulatanalitikai célokhoz készített LRM-jelölt minták elemzését hajtottuk végre [SEAS 2002]. A természetes As-tartalmú sima lepényhal mellett Se-dúsított élesztő vizsgálatával is foglalkoztunk. Ez utóbbi minta nem eseti gyártmányként, hanem több év óta futó termelésből származó készítményként került a jelöltek közé: a „Pharma Nord” dán gyógyszeripari és biotechnológiai cég „Bioselenium” néven forgalomba hozott, szelénpótló ételmi kiegészítőjének alapját képezi a hagyományos pékélesztő fermentációjának módosításával előállított,

szeléntartalmú biomassza. A valódi üzemi méretben (100 m<sup>3</sup>-es fermentorban), teljes mértékben szabályozott paraméterek mellett, pontosan meghatározott, a szénforrás kivételével kizárólag szervesetlen alapanyagokkal (köztük Na-szelenittel) gyártott élesztő érhetően könnyen teljesítette az olyan alapvető, LRM-ekkel szemben támasztott követelményeket, mint pl. a homogenitás. A módosulatanalitikai célokra szánt készítmény csupán abban különbözött a gyártósorról lekerült termékektől, hogy a szelénrel dúsított, pasztórizált és porlasztva szárított élesztőből közvetlenül, a tablettagyártáshoz szükséges kiegészítő műveletek nélkül képeztek csomagolási egységet, kb. 20 grammos kiszereléseket hozva létre a közelítőleg 96 m/m % szárazanyag-tartalmú biomasszából.

Feladatom a lepényhal esetéhez hasonlóan abból állt, hogy kidolgozzam a minta módosulatanalitikai mintaelőkészítését, így téve lehetővé az élesztő által hordozott Se-módosulatok minőségi és mennyiségi meghatározását. A mintaelőkészítési módszer korábbi tapasztalatokon („Se-21”) alapuló kiválasztását nagyban segítette a gyártó cég azon – az általános előállítási módszer bemutatása mellett tudomásunkra hozott – vizsgálati eredménye, hogy a dúsítási célból adagolt szervesetlen szelénsót (Se(IV)) nem tudták kimutatni a rendelkezésre bocsátott élesztőmintából. Ebből nyilvánvalóvá vált, hogy nincs szükség külön elvégzett ioncserélt vizes (vagy pufferezt közegű) extrakcióra, mivel ez a lépés várhatóan nem vezetett volna érdemi Se-kinyeréshez. Másrészt a könnyen végrehajtható, viszonylag egyszerű eljárásra való törekvés és a „Se-21”-nél leszűrt következtetések maguk után vonták, hogy a „természetesen” enzimes fehérjebontásra építő mintaelőkészítési eljárásban nem került sor sem sejtfalbontó, sem pedig lipidbontó enzimek alkalmazására; egylépéses, pronázzal végrehajtott kezelést választottam.

Ahogy a halmintánál is, úgy a szelénés élesztő – pontosabban: annak egy korábbi gyártási ciklusból származó mintája – is átesett egy előzetes módosulatanalitikai vizsgálaton, amelyet a gyártó cégtől független laboratórium végzett el, és a kapott mérési eredményekhez is hozzájuthattunk [SEAS 2002]. Ezekből arra derült fény, hogy a mintaelőkészítés során a leginkább kritikus pontnak a SeOMet képződése számít, amelyet többek között a sejtfalbontó kezelés elkerülésével lehet elkerülni – így tehát egy következő érv is az egylépéses fehérjebontó módszer mellett szólt. Vizsgálataik során a szóban forgó laboratórium a Sigma cég által gyártott XIV-es típusú proteázt használta. Mivel ez az enzim nagyságrendekkel kisebb aktivitású a Merck cég pronáz (más megnevezésben ugyancsak XIV-es típusú proteáz) készítményével szemben, jó alkalom adódott arra is, hogy a nemzetközi körelemzésben rejlő előnyöket kihasználva mindkét enzimmel elvégezzem a feltárást, így próbálva megválaszolni a két gyártmány hasznossága/alkalmazhatósága közt fennálló kérdéseket.

#### 4.2.2.2. A felhasznált vegyszerek és az alkalmazott mintaelőkészítés bemutatása

Az enzimes mintaelőkészítés során XIV-es típusú proteáz (Sigma) és pronáz (Merck) enzimekkel hajtottam végre kezeléseket, melyek jellemzőit a 3.2. fejezet tartalmazza, a pufferek készítéséhez használt K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> és KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sókkal együtt. A mintaelőkészítés menetét a következőképpen alakítottam ki: 0,15 g mintát 15 ml-es fiolában 6,5 ml, 0,04 mol l<sup>-1</sup>



koncentrációjú foszfátpufferben (pH=7,4) oldottam fel; ezt a folyamatot ultrahangos berendezés segítségével gyorsítottam. Ezt követően az előzővel azonos puffer 1 ml-ével 15 mg pronáz vagy XIV-es típusú proteáz enzimet juttattam az elegyhez, és összekeverés után termosztált rázófürdőben 37°C hőmérsékleten, 24 órán át 180 perc<sup>-1</sup> fordulatszámon rázattam. A 6-6 párhuzamossal végrehajtott enzimes kezelések után centrifugálással (4100 g, 25 perc, 20°C) választottam szét az oldhatatlan részt az extrahált komponensektől, majd a létrejövő üledéket vortex berendezés segítségével még kétszer, egyenként 1-1 ml pufferoldattal öblítettem át, és újra elvégeztem a korábban ismertetett centrifugálási lépéseket. A műveletek befejezése után a centrifugálással kapott, összetartozó felülúszókat 0,45 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrőn keresztül juttattam 10,0 ml-es mérőlombikokba, amelyeket ioncserélt vízzel töltöttem jelre. Az így kapott oldatok kerültek a HPLC (Se-módosulatanalitikai) és párhuzamos ICP-OES (összes Se-tartalom) vizsgálatokra.

Az üledéket és a hozzájuk tartozó membránszűrőlapokat savas roncsolással (3.1. fejezet) tártam fel a maradék szeléntartalom megállapítása végett, és az élesztő összes Se-tartalmát ugyanilyen eljárással határoztam meg.

#### 4.2.2.3. A két *Streptomyces griseus* fehérjebontó enzimkeverékkel elért kinyerési hatásfokok és a módosulatanalitikai vizsgálatok eredményeinek ismertetése és értékelése

A módosulatanalitikai szakirodalomban – vélhetőleg a GILON et al. közlemény [1995] hatására – a Sigma cég által forgalmazott XIV-es proteáz domináns jellege megkérdőjelezhetetlen, annak ellenére, hogy a Merck-féle készítmény mind a fajlagos aktivitás / költség arányt tekintve, mind pedig a kísérőanyagok területén (lásd Ca<sup>2+</sup>-csapadék kialakulásának veszélye, 2.3.1.5.3. fejezet) kedvezőbb mutatókkal bír. Ezen háttér szolgált alapul ahhoz, hogy – kihasználva a nemzetközi körelemzés által biztosított ellenőrzési lehetőséget – a SEAS élesztőminta módosulatanalitikai vizsgálatához kapcsolódóan elvégezzem a két enzim összehasonlítását is.

Az 5. táblázat tartalmazza mind az összes Se-tartalom meghatározás, mind pedig az enzimes mintaelőkészítés eredményeit. Bár az 1374 µg g<sup>-1</sup>-ot kitevő szelén mennyiségének közel azonos, 83-85%-át szabadította fel a két enzim, a statisztikai elemzéssel azt lehetett megállapítani, hogy a Merck-féle készítmény használata szignifikánsan nagyobb kinyerési hatásfokot eredményezett. Ugyanakkor a két érték közelsége azt is jelzi, hogy a fajlagos aktivitásban fennálló, több mint három nagyságrendnyi különbség (4,8 ill. 11470 U mg<sup>-1</sup> készítmény) alig jelentkezik a gyakorlati felhasználás során; ennek háttérében az állhat, hogy ez a Se-dúsított élesztőpor nem tartozik a komplex, nehezen feltárható minták közé, hiszen mind szemcseméretét, mind homogenitását, mind pedig a kísérő mátrixkomponenseket illetően nem teszi nehezzé a mintaelőkészítés oroszlánrészét végrehajtó enzimes fehérjehidrolízis folyamatát. Erre utalt a korábbi, „Se-21” minta vizsgálata is, jelezve, hogy sem a lipidek, sem a sejtfaleredetű makromolekulák párhuzamos vagy előzetes bontása nem szükséges a megfelelő extrakciós hatásfok eléréséhez. A pronáz által biztosított 85,9%-os kinyerés élesztőminták esetében megfelelőnek számít (lásd 4. Melléklet táblázatát).

**5. Táblázat. A „SEAS” Se-dúsított élesztőminta savas roncsolása és a különböző enzimes módosulatanalitikai vizsgálatai során kinyert összes Se- ill. SeMet-tartalma.**

Mérőrendszer / Mintaelőkészítés		ICP-OES eredmények		HPLC-UV-HG-AFS eredmények $\mu\text{g Se g}^{-1}$ minta	Azonosítási arány a kinyert szelén mennyiségének függvényében, %
		Kinyert szelén $\mu\text{g Se g}^{-1}$ minta $\pm$ RSD	Kinyerési hatásfok % $\pm$ RSD		
Savas roncsolás	Összes Se- tartalom	1374 $\pm$ 0,7	---		
Enzimes extrakció	XIV-es típusú proteáz (Sigma)	1062 $\pm$ 5,4	83,2 $\pm$ 1,2		
	Pronáz (Merck) <b>SeMet-tartalom</b>	1198 $\pm$ 3,0	85,9 $\pm$ 1,2	<b>934 <math>\pm</math> 4,3</b>	78,0

A módosulatanalitikai vizsgálatokhoz a Merck enzimet használtam fel. A HPLC-UV-HG-AFS csatolt rendszer segítségével három Se-módosulatot, SeMet-t, SeCys<sub>2</sub>-t és Se(IV)-et minőségileg tudtunk azonosítani. Az utóbbi két módosulat közül a szelenocisztin jelenlétét meg kellett kérdőjeleznünk a korábban már említett, SeOMet lehetséges kialakulásából fakadó bizonytalanság miatt, míg a Se(IV) mérések kis megbízhatósága nem tette lehetővé ez utóbbi módosulat mennyiségi meghatározását, melyet végül csak a SeMet-ra végeztünk el. Az enzimes mintaelőkészítés során kinyert szelén 78%-át alkotta ez az aminosav, amely az összes Se-tartalomra vetítve 68%-ot jelent. Bár a 4. Melléklet táblázatának adataihoz képest ez az érték inkább csak elfogadhatónak számítana, figyelembe kell venni, hogy a 100%-hoz közeli azonosítási értékre utaló közlemények jó része még akkor látott napvilágot, amikor egyrészt a SeCys<sub>2</sub> élesztőre vonatkoztatott hiányáról még nem rendelkezünk ismeretekkel, másrészt egy sor, azóta már élesztőben is azonosított – bár standard vegyületként forgalomba még nem hozott – Se-módosulat vizsgálatára még nem kerülhetett sor. Az általunk meghatározott 68%-os SeMet-tartalom tökéletes összhangban van mind a SEAS nemzetközi körelemzésben részt vevő külföldi intézetek ugyanezen a mintán végzett méréseivel [SEAS 2003], mind pedig egyes vezető európai laboratóriumok újabban közölt, azonos forrásból (Pharma Nord) származó mintákra vonatkozó eredményeivel [LARSEN 2003].

**4.2.3. A szelénrel dúsított élesztőminták vizsgálata során elért új tudományos eredmények**

Megállapítottam, hogy az üzemi fermentációval előállított, többek között szárítással stabilizált és a szemcseméretet tekintve az általános LRM követelményeknek megfelelő Se-dúsított élesztő nem szubsztrátspecifikus fehérjebontó enzimmel végrehajtott módosulatanalitikai mintaelőkészítésénél a sejtfal- ill. lipidbontó enzimek használata szignifikánsan nem növelte a Se-kinyerési hatásfokot.

Se-dúsított élesztőn végzett, egylépéses enzimes módosulatanalitikai mintaelőkészítés segítségével összehasonlítottam a szakirodalomban legtöbbször jegyzett fehérjebontó enzimkeveréket (XIV-es típusú proteáz; Sigma) az ugyanazon fonalas baktérium által előállított, eltérő tulajdonságokkal bíró pronáz enzimmel (Merck). Az elvégzett statisztikai elemzés alapján

megállapítottam, hogy a két enzimmel elérhető kinyerési hatások szignifikáns mértékben különböznek: a Merck-féle enzim használatával nagyobb mennyiségű szelén extrahálható.

#### 4.3. SZELÉNNEL DÚSÍTOTT GOMBA MÓDOSULATANALITIKAI MINTAELŐKÉSZÍTÉSÉNEK KIDOLGOZÁSA

Az ehető gombák táplálkozás-élettani szempontból meglehetősen ellentmondásos, vagy legalábbis nem egyértelmű megítélés alá esnek. Egyrészt kiemelkedő élelmi fehérje-, ásványi anyag és nyomelemtartalommal bírnak, amelyhez csak kis mennyiségű szénhidrát társul, így elvileg megfelelnek a modern táplálkozás által támasztott követelményeknek. Ugyanakkor a leggyakrabban fogyasztott gombák, így az *Agaricus* nemzetség is a környezetében (erdei talaj ill. komposzt) megtalálható fémionokat akár 100-szoros dúsítási faktorial veszi fel [RÁCZ 2000b], s így a szennyezett területekről szedett gomba toxikus fém tartalma élelmiszer-biztonsági aggályokat vet fel. Az 1986-os csernobili katasztrófa következményeként a légkörbe, majd kimosódással talajba került, radioaktív <sup>137</sup>Cs izotóp olyan mértékben jelent meg a kelet-európai gombaexportban, hogy az EU külön jogszabállyal rendelkezett az ellenőrzés módjáról és a sugárzási határértékekről [RÁCZ 2000a]. A helyzet összetettségét jelzi, hogy a nyugat-európai eredet sem feltétlenül garantálja a kis toxikus fém tartalmat, hiszen több országban (ld. Németország) nincs előírás a komposzt minősítésére, emiatt az azon termesztett gomba – vélhetően nem radioaktív, de – mérgező fémionokat ugyancsak tartalmazhat.

Ha eltekintünk a fém tartalomtól, egyetlen táplálkozás-élettani kérdés marad nyitva: a gomba összetevőinek, beltartalmi értékeinek biológiai hozzáférhetősége. Az emberi szervezet csak áttételesen, a bélflóra bizonyos baktériumai által képes emészteni a részben kitinből és (hemi)cellulózából álló gombasejtfalat, így eleve gátolt a többi komponens, pl. a fehérjék emésztése. Részben ez a jelenség állhat azon megfigyelés mögött is, hogy a szelén gombából szívódik fel legkevesbé (< 5% mértékben), hiszen – ha feltételezzük a szelén fehérjékben való kötöttségét – a fehérjékhez történő hozzáférés gátlása közvetve akadályozhatja a szelénfelvételt is [CHANSLER 1986]. Azonban – ahogy a szelén és a módosulatanalitika kapcsolatát bemutató 2.1.1. alfejezetben már jeleztem – a szelénrel dúsított gomba patkánykísérletekben tumorszuppresszív hatást mutatott, amelynek mértéke összevethető volt a párhuzamos vizsgálatok során szerves szelén (Se(IV)) által elért hatáshoz [SPOLAR 1999].

Az utóbbi eredmények rávilágítanak arra a problémára, amely a szelén módosulatanalitika gyakorlati felhasználásában ölt(ött) testet: hiányos ismeretekkel rendelkezünk számos élelmiszer – így pl. a gombák – szelénmódosulatairól. A korábban említett, a gombák céziumfelvételével kapcsolatos vizsgálatok szerencsére hozzájárultak ahhoz, hogy meginduljanak az általános, több elemre is kiterjedő akkumulációs vizsgálatok, és sor került a szelénre is. VAN ELTEREN et al. [1998] radioaktív szelén- és céziumsók segítségével tanulmányozták e két elem felszívódását csiperkegombában (*Agaricus bisporus*), és pufferelt közegű extrakcióval előkészített méretkizárásos kromatográfiai eljárással igazolták, hogy a szelén felvételét annak metabolizmusa, tehát molekulákba történő beépülése követi. A tönkből 4, míg a kalapból 5, különböző molekulatömegű, szeléntartalmú sejtalkotót mutattak ki, és felhívták a figyelmet a

további módosulatanalitikai vizsgálatok fontosságára. Hazánkban VETTER [1990, 1993] és RÁCZ et al. [2000a,b] mikológiai-analitikai kutatásai érdemelnek figyelmet: míg VETTER a vadon termő gombafajták mikroelem-tartalmát – köztük a szelént is – határozta meg és hasonlította össze, addig RÁCZ et al. kifejezetten a komposztalapú termesztéssel készült csiperke toxikus fémion- és szelénfelvételi mechanizmusát tanulmányozták. Ez utóbbi csoportot nem is titkoltan az a cél vezérli, hogy funkcionális élelmiszerként számításba jövő terméket állítson elő; mivel mind a magyarországi csiperkegomba termesztés (a világ termesztésének 1%-a), mind pedig a fogyasztás a régióban kiemelkedőnek számít, valós esélye lehet egy szelénrel dúsított gomba piaci bevezetésének. Mindehhez csak a mesterséges, szelénrel kiegészített komposzton termesztett csiperke lehet alkalmas, mivel az *Agaricaceae* család vadon termő egyedei a szelénben szegény magyarországi erdőtalajokon csupán 4,6-7,6  $\mu\text{g g}^{-1}$  szárazanyag mennyiségben tartalmazzák ezt a mikroelemet [VETTER 1990, 1993].

Kutatócsoportunk ebben a helyzetben vette fel velük a kapcsolatot, és mintákat kértünk a kísérleti stádiumban lévő termesztésből. Két fajta csiperkegombát vizsgáltunk: az első típus termesztésénél a szelénrel történő dúsítás céljából a komposztba szervesen szelénsót (Se(IV)) keverték, míg a másik esetben szelénrel dúsított élesztőport. Feladatunk úttörő jellegűnek számított: Se-módosulatanalitikai mintaelőkészítés és mérés technika kidolgozása szelénrel dúsított csiperkegomba vizsgálatához; szakirodalmi előzményeket nem találtunk, így teljesen az alapoktól kellett indulni.

Értekezésemben a hangsúlyt a mintaelőkészítési eljárásokra és a hozzájuk kapcsolódó, adalékolással végrehajtott minőségbiztosítási módszerre helyeztem; a mérés- és elválasztástechnika kialakítását és fejlesztését STEFÁNKA et al. közleménye [2001] és PhD értekezése [2003a] tartalmazza.

#### **4.3.1. A szelénsóval kiegészített komposzton termesztett, Se-dúsított gomba módosulatanalitikai mintaelőkészítésének kidolgozása**

##### 4.3.1.1. A minta bemutatása és a választott mintaelőkészítési megközelítés ismertetése

Két fajta, szelénrel dúsított ill. hagyományos komposzton termesztett (kontroll) gombát használtuk fel kísérleteink során; a szeléntartalmú mintával hajtottuk végre a módosulatanalitikai méréseket, míg a kontroll gombaminta a mintaelőkészítési lépések és a kromatográfiai vizsgálatok minőségbiztosításánál játszott szerepet. A gombaminták nem frissen, hanem előkezelés után érkeztek, amely a következő lépésekből állt: (a) a frissen szüretelt gombákat kalapra és tönkre választották szét, további kezelésre és vizsgálatra csak az előbbieket kerültek; (b) a kalapokat 105°C fokon súlyállandóságig szárították, majd kalapácsos malomban megőrölték és szitászűrő segítségével szemcseméret szerint frakcionálták; (c) a 90  $\mu\text{m}$ -nél kisebb frakciót kaptuk meg és használhattuk fel vizsgálatainkhoz, melynek az összes szeléntartalma a dúsított mintánál 110,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ -nak, míg a kontrollnál 4,3  $\mu\text{g g}^{-1}$ -nak adódott. A vizsgálatok folyamán a biológiai hozzáférhetőség szerinti megközelítés alapján jártam el, így kiindulási-összehasonlítási céllal az erre az elvre jellemző (ld. 2.3.1.5.2. fejezet), gyakran alkalmazott pepszines kezelés képezte az egyik mintaelőkészítési módszert. Természetesen figyelembe vettem a terület fejlődési irányát

is, így mind a szekvenciális enzimes eljárásokra, mind pedig az egy lépéses módszerekre is építettem.

#### 4.3.1.2. A felhasznált vegyszerek és alkalmazott mintaelőkészítési eljárások bemutatása

Az enzimes mintaelőkészítés során pepszin, tripszin és pronáz enzimekkel hajtottam végre kezeléseket, melyek jellemzőit a 3.2. fejezet tartalmazza, a pufferek készítéséhez használt TRIS,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$  sókkal, valamint a sósavval és NaOH-val együtt. A mintaelőkészítéseket 15 ml-es fiolákban végeztem, amelyekbe egyenként 200 mg Se-dúsított gombaport mértem ki, majd a következőkben (A-E) ismertetett extrakciók kerültek sorra, 200 perc<sup>-1</sup> fordulatszámú termosztált rázógép segítségével. Az egyenként 3 párhuzamossal végrehajtott mintaelőkészítő lépések után centrifugálással (3700 g, 15 perc, 20°C) választottam szét az oldhatatlan részt az extrahált komponensektől; többlépéses módszer esetén a létrejövő üledéket használtam fel a soron következő lépéshez. Az extrakciós eljárások (A-E) folyamatábrába rendezett, egyszerűsített leírását a 8. Melléklet tartalmazza.

**A.,** 3,6 ml ioncserélt víz (pH=5,7), 1 órán keresztül;

**B.,** 3,6 ml, 0,05 mol l<sup>-1</sup> foszfátpufferben (pH=7,4) oldott 16 mg pronáz enzimes kezelés, 20 órán keresztül;

**C.,** 1. lépés: 3,6 ml, 0,05 mol l<sup>-1</sup> TRIS-HCl puffer (pH=2,1) 3 órán keresztül; 2. lépés: az előző lépésben használttal egyező típusú pufferben oldott 45 mg pepszin enzimes kezelés, 20 órán keresztül;

**D.,** 1. lépés: 3,6 ml, 0,05 mol l<sup>-1</sup> foszfátpufferrel (pH=7,6), 3 órán keresztül; 2. lépés: az előző lépésben használttal egyező típusú pufferben oldott 45 mg tripszin enzimes kezelés, 20 órán keresztül;

**E.,** 1. lépés: 3,6 ml ioncserélt víz (pH=5,7), 3 órán keresztül; 2. lépés: 3,6 ml, 0,05 mol l<sup>-1</sup> TRIS-HCl pufferben (pH=2,1) pufferben oldott 45 mg pepszin enzimes kezelés, 20 órán keresztül; 3. lépés: 3,6 ml, 0,05 mol l<sup>-1</sup> foszfátpufferben (pH=7,6) oldott 45 mg tripszin enzimes kezelés, 20 órán keresztül.

A műveletek befejezése után a centrifugálással kapott felülúszókat 0,45 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrőn keresztül juttattam 5,0 ml-es mérőlombikokba, majd a pH-t 5,5-re állítottam 1 mol l<sup>-1</sup> NaOH ill. HCl oldatokkal; a mérőlombikokat végül ioncserélt vízzel töltöttem jelre. Az így kapott oldatok kerültek a HPLC (Se-módosulatanalitikai) és párhuzamos ICP-OES (összes Se-tartalom) vizsgálatokra. Az üledéket és a hozzájuk tartozó membránszűrőlapokat savas roncsolással (3.1. fejezet) tártam fel a maradék szeléntartalom megállapítása végett.

#### 4.3.1.3. Adalékolás a mintaelőkészítés minőségbiztosításának céljából

Az adalékolás műveletét a „Mulspot” nemzetközi körelemzés [MULSPOT 1998] ajánlásainak módosításával hajtottam végre. 1 g Se-dúsított gombaport mértem ki 50 ml-es csiszolt dugós Erlenmeyer-lombikba, majd 3 ml ioncserélt vízzel előnedvesítettem, és 30 percig, 25°C hőmérsékleten, 180 perc<sup>-1</sup> fordulatszámra rázattam. Ezt követően a kevertetett mintához cseppenként, összesen 3 ml adalékoló folyadékot juttattam, amelyben a vizsgált négy Se-módosulat (Se(VI), Se(IV), SeCys<sub>2</sub> és SeEt) szelénre számítva 75-75 µg mennyiségben volt jelen, ioncserélt vízben oldva. A lombikot lezártam, és még 20 óráig folytattam a rázatást a várható egyensúly eléréséig. A kezelést mindkét (Se-dúsított és kontroll) gombára elvégeztem.

A művelet végén a mintákat kéméletes szárításnak tettem ki: a csiszolt dugókat gázmosó feltételekre cseréltem, és 100 ml perc<sup>-1</sup> Ar-áram segítségével, 50°C hőmérsékleten, a fordulatszámot változatlanul hagyva 30 órás folyamattal távolítottam el az előnedvesítés és az adalékolás során hozzájuttatott vízmennyiséget. Ezután a beszáradt mintát eltávolítottam a lombikokból, folyékony nitrogénben lefagyasztottam, porcelán dörzsmozsárban porrá őröltem és szitasorral méret szerint fracionáltam. További kísérletekhez a 125 µm alatti tartományt használtam fel. A gombaminták nedvességtartalmát az adalékolás folyamata előtt és után is meghatároztam, hogy korrekciós faktort képezhessenek a módosulatanalitikai ill. összes Se-tartalom mennyiségi meghatározásához.

#### 4.3.1.4. A különböző mintaelőkészítési módszerek és az elért extrakciós hatások bemutatása – az eredmények értékelése

Az alkalmazott mintaelőkészítési módszerek három olyan irányvonalat ölelnek fel, melyekre célszerű építeni ismeretlen minta módosulatanalitikai elemzésénél ill. amelyek a korábban említett (2.3.1.5. alfejezet), különböző generációba tartozó megközelítéseket jellemzik: a leginkább kéméletes, pufferelt közeggel (és ioncserélt vízzel) elvégzett extrakciót, a biológiai hozzáférhetőség megállapítását célzó pepszines kezelést és az egy lépéses, nem szubsztrátspecifikus fehérjebontó enzimes hidrolízist. Mindezek kiegészítésre kerültek a tripszines kezeléssel is, amely hozzájárult a másodikként említett irányvonal bővítéséhez, mind magában, mind pedig szekvenciális eljárás keretében. Ez utóbbi korábban még nem került említésre a szakirodalomban; az emberi emésztésben is egymás után következő két enzim, a pepszin és a tripszin kapcsolt használata a mi munkánkban képezte először részét Se-módosulatanalitikai mintaelőkészítésnek.

A 6. táblázat tartalmazza az öt módszerrel elérhető kinyerési hatások értékeit. Az „A” ill. a „C”, „D” és „E” első lépései jelentik a pufferelt közeggel ill. ioncserélt vízzel, még enzimes hidrolízis nélküli kezeléseket. A sorban 36-34-40-37%-nak adódó kinyerési értékek a szakirodalmi utalások alapján viszonylag nagy szerves Se-módosulatarányra utalnak, amelynek legfőbb oka az lehet, hogy a felvett szelént a gomba nem teljes mértékben vonta be anyagcsere-folyamataiba. Mindez azt is jelenti, hogy a „B” jelű, tehát a pronáz enzim használatán alapuló előkészítés által felmutatott 64%-os extrakciós hatások mögött minden bizonnyal nem fehérjehidrolízis játszotta a fő szerepet; bár a pronáz nagyobb mennyiségű szelént

szabadított fel, mint egymagában a pepszin (55%) vagy a tripszin (60%), az elért hatásfok távol áll attól, amelyet pl. Se-dúsított élesztőmintánál tapasztalhatunk. A teljes kinyerési hatásfokot tekintve a 3 lépéses, ioncserélt vízzel + pepszines bontással + legvégül tripszines kezeléssel zárt módszerrel sikerült elérni a legnagyobb értéket, 75%-ot.

**6. Táblázat. Se-dúsított gombamintán végrehajtott mintaelőkészítési módszerek összehasonlítása az extrakciós módszerek által felszabadított és ICP-OES segítségével meghatározott összes szeléntartalom alapján. K.H.= kimutatási határ = 0,25 µg Se ml<sup>-1</sup> oldat.**

Mintaelőkészítési módszer	Kinyert Se-tartalom	RSD	Membránszűrőn maradt Se-tartalom	RSD	Üledék Se-tartalma	RSD	Kinyert Se-tartalom
<b>A</b>	<b>36%</b>	<b>7%</b>	< K.H.	-	<b>65%</b>	<b>1%</b>	<b>101%</b>
<b>B</b>	<b>64%</b>	<b>1%</b>	<b>1%</b>	<b>2%</b>	<b>35%</b>	<b>2%</b>	<b>100%</b>
C - 1. lépés	34%	4%	< K.H.	-			
C - 2. lépés	21%	8%	< K.H.	-			
<b>C - Teljes folyamat</b>	<b>55%</b>	<b>6%</b>			<b>47%</b>	<b>3%</b>	<b>102%</b>
D - 1. lépés	40%	10%	< K.H.	-			
D - 2. lépés	20%	7%	< K.H.	-			
<b>D - Teljes folyamat</b>	<b>60%</b>	<b>2%</b>			<b>37%</b>	<b>1%</b>	<b>97%</b>
E - 1. lépés	37%	7%	<b>1%</b>	<b>1%</b>			
E - 2. lépés	24%	11%	< K.H.	-			
E - 3. lépés	14%	4%	< K.H.	-			
<b>E - Teljes folyamat</b>	<b>75%</b>	<b>3%</b>			<b>26%</b>	<b>1%</b>	<b>102%</b>

Ha figyelembe vesszük a szakirodalmi adatok alapján ismert, gombákra vonatkoztatott, 5% körüli szelén biológiai hozzáférhetőséget [CHANSLER 1986], akkor kijelenthetjük, hogy nagy valószínűséggel túlzott mértékben általánosított eredményről lehet szó: ennél a természetett gombamintánál már a legrövidebb, mindössze ioncserélt vizet alkalmazó kezelés is jóval ennél nagyobb értéket jelzett, nem is beszélve a hagyományos elvek alapján elvégzett, biológiai hozzáférhetőséget megállapító, többlépéses módszerekről. Természetesen a mesterséges Se-dúsítással együtt járó, eddigi eredmények alapján valószínűsíthetően tökéletlen Se-metabolizmus és a minta szárításban + őrlésben megnyilvánuló előkezelése nagymértékben hozzájárulhatott az 5% túlszárnyalásában; azonban figyelembe kell venni, hogy az élelmiszeripar nem csak frissen, hanem szárított gombaporként is felhasználja ezt az alapanyagot, tehát az esetleg Se-dúsított gombából készült por, mint funkcionális élelmiszer-kiegészítő minden bizonnyal nagyobb mennyiségű szelén felvételét teszi majd lehetővé.

Természetesen az előbbi megállapításokat módosulatanalitikai mérésekkel kell alátámasztani, így – a leghatékonyabbnak bizonyult, háromlépéses mintaelőkészítést követve – végrehajtottuk a kinyerhető Se-módosulatok minőségi és mennyiségi meghatározását is.

#### 4.3.1.5. A módosulatanalitikai vizsgálatok és az adalékolás eredményeinek ismertetése és értékelése

A 7. táblázatban található meg a HPLC-HHPN-AFS rendszer segítségével azonosított és mennyiségileg meghatározott Se-módosulatok bemutatását, amely részben nem várt eredményekre vezetett. Szelénnel dúsított biológiai minták esetében a SeMet mindig a

legnagyobb mennyiségben kimutatott szelénmódosulatnak számított, néhány, SeMet szintézisére bizonyítottan képtelen baktérium kivételével [MÜLLER 1997]. Mi több, általában már a pufferezt közeggel végzett extrakciók is felszabadították a SeMet egy részét, mintegy megelőlegezve a fehérjebontó enzimmel végzett, valóban SeMet-túlsúlyt igazoló méréseket [KOTREBAI 1999a,b]. Ennél a gombamintánál azonban a korábban említett, tökéletlen Se-beépülésre utaló, az összes extrahált szelén mintegy 2/3-át kitevő Se(IV) mellett csak SeCys<sub>2</sub>-t (ill. esetleg vele együtt eluálódó, általunk nem azonosítható komponenst) mutattunk ki, SeMet-t még nyomokban sem. Mindez arra utal, hogy a csiperkegombák Se-anyagcseréje bizonyosan eltér az eddig megismert módozatoktól, és nem feltétlenül követi analóg módon a kénanyagcsere útjait. A teljes határfokot tekintve 75%-os kinyerést hozó mintaelőkészítés leghatásosabb lépésének az első bizonyult, mivel mind a HPLC, mind pedig a párhuzamos ICP-OES mérések alapján az extrahált szelén közel felét juttatta oldatba, melynek 45%-át a szerves, valószínűleg a komposztból átalakítás nélkül dúsított Se(IV) tette ki. A két, szekvenciális fehérjebontó lépés szerepének fontossága is bizonyítást nyert, mivel a Se(IV) extrakciójának teljessé tételén túl a kinyert szelén 29%-át kitevő SeCys<sub>2</sub>-t szabadítottak fel, amely az összes SeCys<sub>2</sub> több mint 3/4-ét jelenti.

Az egyes mintaelőkészítési lépések során kapott oldatokból HPLC mérésekkel mennyiségileg is azonosított ill. ICP-OES révén megállapított összes Se-tartalom kb. 10%-os eltérést mutat az utóbbi javára. E jelenség mögött számos jelenség állhat. Az oldatok tartalmazhatnak olyan Se-módosulatokat vagy hidrolizálatlan molekulákat, melyek erősen kötődtek az (előtét)oszlophoz és elúciójuk késleltetett vagy akár lehetetlen, pl. irreverzibilis kötődés miatt; másrésztől nem lehet kizárni az együttes elúció jelenségét, főleg a holtterefogat közelében eluálódó SeCys<sub>2</sub> esetében, amely a HPLC mérések bizonytalanságát növeli meg. Ezen okok miatt a kinyerési határfokot nem a HPLC eredmények, hanem az ICP mérések által szolgáltatott eredmények alapján számoltuk ki.

**7. Táblázat. A 110,2 µg g<sup>-1</sup> szeléntartalmú Se-dúsított gomba „E” jelű, háromlépéses módszerrel végrehajtott mintaelőkészítése során felszabaduló összes Se és Se-módosulatok mennyisége. K.H.= kimutatási határ = 0,25 µg Se ml<sup>-1</sup> oldat. (a)=az összesített párhuzamos ICP-OES eredmények és a minta összes Se-tartalmának hányadosa alapján.**

Mintaelőkészítési lépés	Módosulatanalitikai mérés HPLC-HHPN-AFS rendszerrel; µg Se g <sup>-1</sup> (zárójelben %-os értéként)			ICP-OES mérések		
	SeCys <sub>2</sub>	Se(IV)	Összesen	Párhuzamos mérések; µg Se g <sup>-1</sup>	Összes Se µg Se g <sup>-1</sup>	Kinyerési határfok <sup>a</sup>
1. lépés	6,3 (9)	33,9 (45)	40,2 (54)	42,5	<b>110,2</b>	<b>75%</b>
2. lépés	6,7 (9)	12,5 (17)	19,2 (26)	25,5		
3. lépés	14,7 (20)	<K.H.	14,7 (20)	15,0		
Összesen	27,7 (38)	46,4 (62)	74,1 (100)	<b>83,0</b>		

Külön figyelmet érdemel a 25%-ban üledékben maradó szelénfrakció. Korábban még nem tanulmányozott mintatípusról lévén szó, így alapvetően két tényező indokolhatja a nem tökéletes extrakciót. Nem kizárt, hogy eddig ismeretlen, például sejtfalhoz kapcsolódó Se-módosulat maradt feltáratlanul, hiszen a fehérjebontás valószínűleg nem hidrolizálta ezen sejtalkotót.



Ugyanakkor lehetséges, hogy a részben már kinyert módosulatok alkotják a fennmaradó részt is, és csupán hosszabb vagy erőteljesebb extrakcióra lett volna szükség kinyerésükhöz. Az előbbi lehetőséget nehezebb igazolni vagy elvetni, mivel ha sikerülne is pl. sejtfalbontó enzimmel kinyerni az említett jellegű komponenseket, az általunk is tanulmányozott, a kísérletek idején kereskedelmi forgalomban elérhető Se-módosulatokon (Se(IV), Se(VI), SeMet, SeEt, SeCys<sub>2</sub>) kívül nem állt rendelkezésünkre egyéb standard, így – bár a HHPN-AFS kapcsolás nem zárja ki pl. a nem hidridképző módosulatok detektálását – semmi sem garantálná, hogy nem történik együttes elúció ill. nem tudtuk volna sem minőségileg, sem pedig mennyiségileg azonosítani az ismeretlen módosulatot.

Ami a második lehetőséget – tehát az azonosítható módosulatok nem tökéletes extrakcióját – illeti, az adalékolás művelete lehetőséget ad, hogy képet kaphassunk a vélekedés valódiságáról. Nagyon fontos kiemelni és kihangsúlyozni, hogy – különösen Se-módosulatanalitika esetén – az adalékolás távol áll attól, hogy bizonyító erejűnek tekinthessük, és bármilyen, a kinyerést illetően kielégítőnek mutatkozó eredményt azonnal átvezethessünk a valódi, nem adalékolt minta előkészítésének értékelésére. A szelén módosulatanalitikában az adalékolás egyetlen következtetést enged meg levonni: amennyiben a művelet során hozzáadott módosulatokat nem tudjuk visszanyerni, úgy nagy valószínűséggel a valódi minta extrakciója sem lesz tökéletes, tehát célszerű más eljárás alapjánuló mintaelőkészítés után nézni. Fordított esetben (kielégítő mértékben visszanyert módosulatoknál) csak azt lehet kijelenteni, hogy amennyiben a valódi minta módosulatai az adalékolás során létrejövő módosulat-mintamátrix egyensúlyi viszonyhoz hasonló módon találhatók a mintában, akkor lehet, hogy ugyanúgy fognak viselkedni. A mintából eredetileg kimutatott Se(IV) és SeCys<sub>2</sub> mellett egy-egy, jellegükben hozzájuk hasonló módosulattal (Se(VI) és SeEt) is adalékoltuk a mintát, hogy eldönthessük, fennáll-e általánosítási lehetőség külön a szervetlen és a szerves Se-módosulatokra.

Az adalékolás műveletét a korábbiakban leírtaknak megfelelően mind a Se-dúsított, mind pedig a kontroll gombamintára is elvégeztem és ezt követően a háromlépéses mintaelőkészítés segítségével tártam fel őket; az eredményeket a 8. táblázat hordozza. A Se-dúsított gombánál az első extrakciós lépés az összes kinyert szelénmennyiség 72%-át vitte oldatba, mely természetesen tartalmazta az adalékolás folyamata során hozzájuttatott és az eredetileg is jelen lévő módosulatok egy részét is. A második lépés további 19%-ot, míg az utolsó a maradék 9% extrakcióját eredményezte. Az összesített extrakciós hatások (az ICP-OES adataira támaszkodva) 91%-nak adódik, amely azt jelzi, hogy a hozzájuttatott módosulatok 97%-a visszanyerésre került. Ehhez azt kell feltételeznünk, hogy az eredeti módosulatok a korábbi, adalékolás nélküli mintaelőkészítés során tanúsított viselkedésüket követik – lásd a „nem adalékolt” oszlop eredményeit, amelyből kiindulva a  $372,6 \mu\text{g g}^{-1}$ -ből 83,0 származhat az eredeti módosulatokból, míg  $372,6 - 83,0 = 289,6 \mu\text{g g}^{-1}$  pedig az adalékolásból, amely 97%-a az adalékolt  $300 \mu\text{g g}^{-1}$ -nak. Ezen feltételezés nem minden alap nélküli, hiszen a Se(IV) szinte a korábbihoz teljesen hasonló megoszlással extrahálódik a mintából; ugyanakkor a SeCys<sub>2</sub> kioldódása-hidrolízise más mintázatot mutat: azt várnánk, hogy az ioncserélt vízben oldott és adalékolt része azonnal eltávozik az első lépés során, de nem így történt. Valószínűleg ez az oxidációra

meglehetősen érzékeny módosulat nem egységes módon kötődött a mintaszemcsékhez, és kioldódása emiatt tolódott a későbbi, fehérjehidrolízissel együtt járó mintaelőkészítési szakaszra.

A mintában eredetileg nem található módosulatokat sem jellemzi egységes extrakciós viselkedés: míg a Se(VI) szinte alig kötődött meg és már az ioncserélt víz is 90%-ban (64,7 a 69,9  $\mu\text{g g}^{-1}$ -ból) kioldotta, addig a SeEt 2/3 – 1/3-os megoszlással (43,3 és 27,7  $\mu\text{g g}^{-1}$  részletekben) távozott az adalékolt gombaporból.

A Se-módosulatok anyagmérlege két csoportra, az eredetileg is jelen lévő ill. a csak adalékolás során bekerült típusra osztotta a vizsgált vegyületeket. Figyelembe véve a módosulatonkénti, szelénre számított 75  $\mu\text{g}$ -os adalékolást, a SeEt és Se(VI) kb. 91-93%-ban kerültek visszanyerésre, míg a kettős forrással rendelkező SeCys<sub>2</sub> és Se(IV) 113-124%-ban oldódtak ki, amely értékek a 75  $\mu\text{g}$ -os adalékolásból és a korábbi, nem adalékolt mintánál tapasztalt kinyerési értékek figyelembevételével alakulnak ki. Az utóbbi jelenség nem feltétlenül utal kalibrálási vagy egyéb mérési hibára; figyelembe kell venni, hogy az adalékolás – különösen a 20 órás rázás ioncserélt vízben – hozzáférhetőbbé tehetette ezen módosulatokat az adalékoláson át nem esett mintához képest, s ez a különbség ölthet testet az eredeti minta adataiból számított nagyobb, 100% feletti kinyerésben.

A kontroll gombamintával végzett adalékolás jellegében hasonló eredményre vezetett (8. táblázat). Az első két mintaelőkészítési lépés során a két szervesetlen módosulat és a SeEt gyakorlatilag teljes mértékben extrahálódott a mintából, míg a SeCys<sub>2</sub> kinyerése csak a harmadik lépéssel fejeződött be úgy, hogy a hozzáadott módosulat mennyiségének közel 85%-a a két fehérjebontó lépés hatására (33,6 és 32,6  $\mu\text{g g}^{-1}$  a 78,3  $\mu\text{g g}^{-1}$ -ből) szabadult fel.

Mindez annak a tükrében számít érdekes, további vizsgálatokat igénylő adatnak, hogy az enzimek valószínűleg a mátrix bontásán keresztül járultak hozzá a teljes kinyeréshez – hasonló jelenséggel lehet találkozni az arzén módosulatanalitikai mintaelőkészítések enzimes módszereinél is (2.3.2.4. fejezet). A 96%-os összesített kinyerési hatásfok kielégítőnek mondható; ugyanakkor nem zárható ki annak a lehetősége, hogy a hiányzó 4% főleg a gomba eredeti szeléntartalmát jelenti, amely viszont a szelén gombákból kimutatott kis biológiai hozzáférhetőségére utalhat vissza.

Összességében az adalékolás művelete azt igazolta, hogy a háromlépéses mintaelőkészítési módszer megfelelő mértékben tette lehetővé a mesterségesen mintához adalékolt Se-módosulatok extrakcióját, ill. a gombamintában eredetileg megtalálható szervesetlen szelénsók (Se(VI), Se(IV)) valószínűleg teljesen kinyerésre kerültek, így a Se(IV) mennyisége (46,4  $\mu\text{g g}^{-1}$  minta) minden bizonnyal valódi értéket takar. A SeCys<sub>2</sub>-re vonatkozó eredmény megbízhatósága kérdéses, mivel nem zárható ki az együttes elúció lehetősége, és az adalékolás csak az esetleg szabad (=nem fehérjében kötött) aminosav viselkedését modellezi. Mivel a gombapor több olyan kezelésen (pl. szárítás) is átesett, amely irreverzibilis fehérjecsapadék-leválást okozhatott, nem lehet megállapítani, hogy még a nem szubsztrátspecifikus fehérjebontó enzim által sem kinyert szelénfrakció fehérjékben vagy más fajta sejtalkotóban rögzült.

#### 4.3.1.6. Új tudományos eredmények a szelénsóval kiegészített komposzton termesztett, Se-dúsított gomba módosulatanalitikai vizsgálatához kapcsolódóan

Elsőként alakítottam ki egy olyan szekvenciális enzimes módosulatanalitikai mintaelőkészítési eljárást, amelynek segítségével a szelénsóval kiegészített komposzton termesztett gomba szeléntartalma 75%-ban kinyerhetővé vált.

Adalékolással és az azt követő szekvenciális enzimes módosulatanalitikai mintaelőkészítéssel igazoltam, hogy a Se-módosulatok egy része nem az elméletileg várható módon (jelen esetben vizes extrakcióval) nyerhető vissza a mintából: a fehérjemátrix bontása szükséges az adalékolt mennyiség oldatba viteléhez. Adalékolási eljárás segítségével közvetett módon bizonyítottam, hogy a módosulatanalitikai mérések során azonosított Se-módosulatok közül legalább az egyik, a Se(IV) mennyiségi meghatározása valódi értékre vezetett.

8. Táblázat. Az adalékolt Se-dúsított és adalékolt kontroll gombaminták „E” jelű, háromlépéses módszerrel végrehajtott mintaelőkészítése során felszabaduló összes Se és Se-módosulatok mennyisége. K.H.= kimutatási határ=0,25 µg Se ml<sup>-1</sup> oldat.(a)=az adalékolás során hozzáadott Se-módosulatok (4 módosulat, egyenként 75 µg Se g<sup>-1</sup> minta) és az eredeti Se-tartalom (110,2 µg g<sup>-1</sup> /Se-dúsított/ ill. 4,3 µg g<sup>-1</sup> /kontroll/) összege.

Minta jellege	Mintaelő-készítési lépés	Módosulatanalitikai mérés HPLC-HHPN-AFS rendszerrel; µg Se g <sup>-1</sup>						ICP-OES mérések		
		SeCys <sub>2</sub>	SeEt	Se(IV)	Se(VI)	Összesen	Párhuzamos ICP-OES mérések; µg Se g <sup>-1</sup> (zárójelben %-os értékben)	Összes Se µg Se g <sup>-1</sup>	Kinyerési hatásfok	
<i>Adalékolt</i>	1. lépés	59,6	43,3	115,5	64,7	283,1	269,6 (72)	410,2 <sup>a</sup>	91%	
	2. lépés	24,8	24,7	36,2	5,2	90,9	70,9 (19)			
	3. lépés	32,0	<K.H.	<K.H.	<K.H.	32,0	32,1 (9)			
	Összesen	116,5	68,0	151,7	69,9	406,0	372,6 (100)			
	<i>Nem adalékolt</i>	27,7	---	46,4	---	74,1	83,0			
<i>Adalékolt</i>	1. lépés	12,1	66,8	75,3	72,5	226,7	218,1 (75)	304,3 <sup>a</sup>	96%	
	2. lépés	33,6	12,1	3,7	6,9	56,3	58,0 (20)			
	3. lépés	32,6	<K.H.	<K.H.	<K.H.	32,6	16,1 (5)			
	Összesen	78,3	78,9	79,0	79,4	315,6	292,2 (100)			
Se-dúsított gomba										
Kontroll gomba										

### **4.3.2. A szelénnel dúsított élesztőkészítménnyel kiegészített komposzton termesztett, Se-dúsított gomba módosulatanalitikai mintaelőkészítésének kidolgozása**

#### **4.3.2.1. A minta bemutatása és a választott mintaelőkészítési megközelítés ismertetése**

Az előzőekben bemutatott, szelénsóval kiegészített komposzton termesztett Se-dúsított gomba sok fontos tanulsággal járt mind a mintaelőkészítést, mind a módosulatanalitikai mérés technikát illetően. A mátrix által kiváltott, a kiértékelést nehezítő strukturált háttér megszüntetése céljából a HHPN-AFS csatolást HG-AFS váltotta fel [IPOLYI 2001a,b; STEFÁNKA 2003a,b] ill. a biológiai hozzáférhetőség megállapítása után előtérbe helyeződött a lehető legnagyobb kinyerési hatások elérésére törekvő mintaelőkészítési megközelítés. Tapasztalatainkat a következő minta, a szelénsó helyett Se-dúsított élesztővel kiegészített komposzton termelt csiperkegomba vizsgálatában összegeztük. Ez a minta az előzőhöz hasonló előkezelés után érkezett hozzánk, és kissé nagyobb,  $160 \mu\text{g g}^{-1}$  összes szeléntartalom jellemezte. A kinyerési hatások növelése céljából két különböző sejtfalbontó enzimkeverék is használatra került, hogy meg lehessen állapítani, valóban a sejtfal gátolja-e az extrakció folyamatát ill. ki tudunk-e mutatni kifejezetten a sejtfallal kapcsolatos, ahhoz kötődő Se-módosulatot. Célul tűztem ki a szekvenciális és az egy lépéses extrakciós műveletek összehasonlítását, a korábbi kísérletek során legnagyobb kinyerési hatásfokot elért módszerek erre a mintára történő alkalmazását, valamint kísérletet tettem arra, hogy lehetőség szerint a legnagyobb mértékben elkülöníthessem egymástól a különböző kezeléseket, nem csupán centrifugálás révén, hanem biokémiai – proteáz inhibitor vegyületekre építő – módszerekkel is.

#### **4.3.2.2. A felhasznált vegyszerek és alkalmazott mintaelőkészítési eljárások bemutatása**

Az enzimes mintaelőkészítés során drizeláz, „lysing” enzim, pepszin, tripszin és pronáz enzimekkel hajtottam végre kezeléseket, melyek jellemzőit a 3.2. fejezet tartalmazza, a pufferek készítéséhez használt TRIS,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sókkal, a két proteáz inhibitorral (proteáz inhibitor koktél és PMSF) valamint a citromsavval, sósavval és NaOH-val együtt. A mintaelőkészítéseket 15 ml-es fiolákban végeztem, amelyekbe egyenként kb. 150 mg Se-dúsított gombaport mértem ki, majd a 9. táblázatban ismertetett extrakciók (A-I) kerültek sorra,  $200 \text{ perc}^{-1}$  fordulatszámú, termosztált rázó gép segítségével. Az oldatok végtérfogatát 3,6 ml-re állítottam be. Az egyenként legalább 3 párhuzamossal végrehajtott mintaelőkészítő lépések után centrifugálással (4100 g, 25 perc,  $15^\circ\text{C}$ ; 1. számú centrifugálás) választottam szét az oldhatatlan részt az extrahált komponensektől. Ezt követően a felülúszókat fecskendőszűrő ( $0,45 \mu\text{m}$ ) segítségével tisztítottam, és a szűrleteket 10 kDa vágási értékű centrifugacső-szűrőbe öntöttem. 4100 g terhelésnél  $25^\circ\text{C}$  hőmérsékleten kb. 50 perces centrifugálásra volt szükség ahhoz, hogy az oldatok térfogata kb. 250  $\mu\text{l}$ -re csökkenjen, tehát 93-95%-ban átszűrődjön a membránon. Ekkorra a minta 10 kDa feletti részét is tartalmazó frakció olyan töménnyé válik, hogy a további centrifugálás már nem hoz látható eredményt. Ezután a szűrletet ( $<10 \text{ kDa}$ ) ioncserélt vízzel 5,0 ml-es mérőlombikban jelre töltöttem; ezt az oldatot HPLC-vel végzett módosulatanalitikai meghatározásra ill. párhuzamos ICP-OES (összes Se-tartalom) mérésekre is felhasználtuk. A

10 kDa-nál nagyobb molekulákat tartalmazó oldatfrakciót pipettával eltávolítottam a fecskendőszűrő membránrekeszéből, ioncserélt vízzel 5,0 ml-es mérőlombikban jelre töltöttem és ICP-OES méréssel összes Se-tartalom meghatározást végeztünk. A teljes folyamatot olyan párhuzamos előkészítésekkel is elvégeztem, amelyek esetében a 0,45 µm-es mikroszűrést nem követte ultraszűrés; ilyenkor az 5,0 ml-re feltöltött oldatot csak ICP-OES méréseknél használtuk fel.

Az egymást követő mintaelőkészítési lépések által kinyert szelén (és szelénmódosulatok) lehető legjobb elkülönítése érdekében az 1. számú centrifugálást követően létrejövő üledéket még kétszer, egyenként 2,0 ml, az adott lépés során alkalmazott pufferben (vagy ioncserélt vízben) szuszpendáltam, és centrifugálással felülúszóra + üledékre választottam (2. és 3. centrifugálási lépés). Az így kapott, összesen 4 ml felülúszóval az előző bekezdésben ismertetett eljárásokat hajtottam végre (mikroszűrés, ultraszűrés, jelre töltés), míg a 3. centrifugálás után kialakuló üledék képezte tárgyát – szekvenciális extrakció esetén – a következő mintaelőkészítési lépésnek.

A mintaelőkészítési műveletsorok végén az utoljára maradó üledéket a hozzá tartozó membránszűrőlapokkal együtt savas roncsolással tártam fel (3.1. fejezet), az összes maradék Se-tartalom ICP-OES segítségével történő meghatározása céljából.

9. Táblázat. A Se-dúsított élesztővel kiegészített kompoziton természetett szeléntartalmú gomba módosulatanalitikai vizsgálata során alkalmazott egy- és többlépéses mintaelőkészítések (A-I) bemutatása. A „pipa” szimbólum jelzi az adott mintaelőkészítési eljárásba bevont lépéseket.

Lépések	Mintaelőkészítési eljárások	Időtartam (óra)	pH	Hőmérséklet (°C)	Mintaelőkészítés jele														
					A	B	C	D	E	F	G	H	I						
1. lépés	Ioncserélt vízzel végzett extrakció	1	5,7	55	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
2. lépés	Sejtfalbontás különböző mennyiségű drizeláz enzim adagolásával, 0,05 mol l <sup>-1</sup> TRIS-HCl pufferben	4	5,5	30															
	Sejtfalbontás különböző mennyiségű „lysing” enzim adagolásával, 0,05 mol l <sup>-1</sup> TRIS-HCl pufferben							✓											
	Sejtfalbontás az optimális mennyiségű (30 mg) drizeláz enzim adagolásával, 0,05 mol l <sup>-1</sup> TRIS-HCl pufferben, 10 mmol l <sup>-1</sup> PMSF jelenlétében												✓						
	Sejtfalbontás az optimális mennyiségű (30 mg) „lysing” enzim adagolásával, 0,05 mol l <sup>-1</sup> TRIS-HCl pufferben, 10 mmol l <sup>-1</sup> PMSF jelenlétében																		
	Sejtfalbontás az optimális mennyiségű (30 mg) drizeláz enzim adagolásával, 0,05 mol l <sup>-1</sup> TRIS-HCl pufferben, 1 V/V % proteáz inhibitor koktél jelenlétében																	✓	
	Sejtfalbontás az optimális mennyiségű (30 mg) „lysing” enzim adagolásával, 0,05 mol l <sup>-1</sup> TRIS-HCl pufferben, 1 V/V % proteáz inhibitor koktél jelenlétében																		✓
3. lépés	Fehérjebontás 30 mg pepszin adagolásával, 0,03 mol l <sup>-1</sup> Na-citrát pufferben	24	2,1	37			✓												
	Fehérjebontás 30 mg tripszin adagolásával, 0,05 mol l <sup>-1</sup> foszfátpufferben																		
	Fehérjebontás 15 mg pronáz adagolásával, 0,05 mol l <sup>-1</sup> foszfátpufferben																	✓	

#### 4.3.2.3. A sejtfalbontási lépés optimalizálását célul tűző kísérletek értékelése

A sejtfalbontásra alkalmas enzimek Se-módosulatanalitikai felhasználása egészen 1999-ig nyúlik vissza, amikor CASIOT et al. [1999] többek közt drizelázt vetettek be Se-dúsított élesztő Se-módosulatainak kinyerésére. A magában alkalmazott enzim(keverék) csupán 27%-os extrakciót eredményezett; bár a szerzők kísérletet tettek a szekvenciális elrendezés létrehozására ioncserélt víz-drizeláz-SDS összeállítással, módszerük nem járt számottevő eredménnyel. Tapasztalataikat hasznosítva a vizsgálat tárgyát képező csiperkemintánál a szekvenciális extrakciót úgy terveztem meg, hogy a sejtfalbontó lépést fehérjebontó lépés kövesse, s így kiaknázhatóak legyenek a sejtfalbontás során felszabaduló ill. hozzáférhetővé váló, fehérjékben kötött Se-módosulatok is. A drizeláz mellett a protoplasztképzés szakirodalma alapján talán leggyakrabban használt sejtfalbontó „crude” keveréket, a „lysing” enzimet illesztettem be a mintaelőkészítési lépésekbe, hogy az alapvetően eltérő karakterrel és eredettel rendelkező készítmények között fennálló különbségeket ezen az újnak mondható alkalmazási területen feltérképezhessem.

Mindehhez alapvetően két dolog vizsgálatára volt szükség. Egyrészt meg kellett határozni a felhasznált sejtfalbontó enzim optimális mennyiségét; ehhez állandó értéken tartottam a megelőző (ioncserélt vízzel végrehajtott) extrakciót és a sorban harmadikként következő, pronáz használatán alapuló fehérjebontás paramétereit. Így a végső kinyerési hatások értékekben mutatkozó eltérések – a minta esetleges inhomogenitásától eltekintve – a közbülső lépés alkalmasságát tükrözik. Másrészt figyelembe kellett vennem, hogy mindkét keverék rendelkezik fehérjebontó aktivitással is, tehát a sejtfalbontó mintaelőkészítési szakasról csupán a kinyerési hatások alapján kapott kép hamis lehet, ha nem különítem el egymástól a különböző enzimaktivitásoknak köszönhetően felszabaduló szelénmennyiséget. (Erre a jelenségre utalnak a 4.2.1.4. fejezetben bemutatott, Se-dúsított élesztővel végzett kísérleteim is.) Ebből a célból két proteáz inhibitor, a főleg szerin proteázokat gátló PMSF-et és az általános, folyadék kiszerezésű, élesztő- és gombakivonatokhoz (s ezáltal a megfelelő enzimekhez is) összeállított inhibitor koktélt használtam fel. Elvileg ezen vegyületek adagolása jó szolgálatot tehet akkor is, ha magából a mintából származó fehérjebontó enzimeket kell gátolni; a mi esetünkben azonban a 105°C fokon súlyállandóságig vezetett szárítás minden bizonnyal irreverzibilisen inaktíválta a csiperke saját enzimeit.

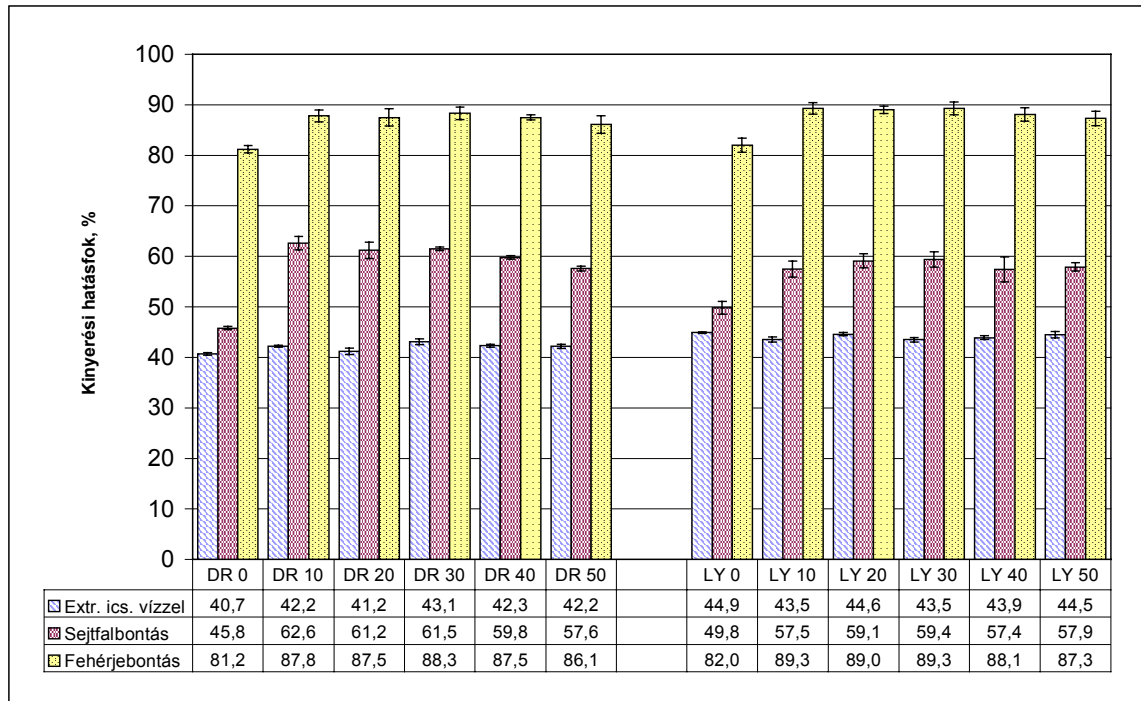
A 9. táblázat jelöléseire támaszkodva a „D” és „E” jelű mérősorozat tartalmazza a sejtfalbontó enzim optimális mennyiségének meghatározását célzó vizsgálatokat, először még inhibitor adagolás nélkül. A 6 különböző koncentráció alkalmazásával elért, lépésenként összegzett kinyerési hatások értékeit az 5. ábra ismerteti. Kontrollként – az ábrán „0” felirattal jelzett – mérések szolgáltak, ahol sejtfalbontó enzimmel nem, csupán a pufferrel kezeltem a mintákat, a többi, enzimet is tartalmazó mintával azonos ideig. Az eredmények kiértékeléséhez Welch-próbát használtam fel, mely a következő megállapításokra vezetett:

1., A sejtfalbontó enzimmel kezelt mintákból – mindkét (drizeláz és „lysing”) enzim és mindegyik (10-50 mg kezelési egység<sup>-1</sup>) koncentrációban – szignifikánsan nagyobb (teljes) kinyerési hatásokot lehetett elérni, mint a csak pufferrel extrahált párhuzamosokból.



2., Egyik sejtfalbontó enzim esetében sem tapasztaltam szignifikáns különbséget a különböző koncentrációk (10-50 mg kezelési egység<sup>-1</sup>) által eredményezett teljes kinyerési hatások között.

3., A két sejtfalbontó enzim teljes kinyerési hatásokra vetített eredményessége között nincs szignifikáns különbség, egyik alkalmazott koncentrációban sem.



**5. Ábra. A háromlépéses, sejtfalbontó enzim használatára is építő „D” és „E” jelű mintaelőkészítési eljárások sejtfalbontó (második) lépésének optimalizálása az elérhető, összes Se-tartalomra vonatkoztatott kinyerési hatások tekintetében, amelynek számításához a 160 µg g<sup>-1</sup> kiindulási értéket vettem figyelembe. A „DR” jelzés a drizeláz, a „LY” a „lysing” enzim használatára, míg a „0-50” értékek az adott enzimből felhasznált mg mennyiségre utalnak; a „0” jelzi a kontroll méréseket, ahol enzim nélkül, csak pufferrel történt extrakció a mintaelőkészítés második lépésében. A hibásávok az adott lépésig összesített kinyerési hatások értékeihez tartozó ± 1 szórást mutatják.**

Mindezekből egyértelművé vált, hogy sejtfalbontásra építő lépés hasznos és fontos eleme a szekvenciális mintaelőkészítési eljárásnak. Bár szignifikáns különbséget nem találtam a 10-50 mg koncentrációtartományban, további kísérleteinkhez a 30 mg-os mennyiséget választottam, mivel ennek használata során tapasztaltam mindkét enzimmél a legnagyobb összesített kinyerési hatásfokot és a sejtfalbontási lépéseknél mért legkisebb szórásértékeket. Ugyanakkor továbbra is vizsgálatra szorult még az a kérdés, hogy a felhasznált „crude” készítmények (ismeretlen mértékű) fehérjebontó aktivitása lényeges szerepet játszik-e a kinyerési hatások növelésében. Ezt eldöntendő, a 9. táblázatban „F”-, „G”-, „H”-, „I” betűkkel jelzett mérési sorozatot hajtottam végre, melyekben az optimális mennyiségű sejtfalbontó enzimek használatát proteáz inhibitorok jelenlétével társítottam; ez utóbbiak koncentrációját a szakirodalmi ill. a vegyszerkatalógusokban fellelhető ajánlások alapján határoztam meg.

**10. Táblázat. A sejtfalbontási lépés közben lezajló fehérjebontás gátlásának hatása a mintából kinyerhető szelén mennyiségére, a kinyerési hatások %-os értékének függvényében. A „kontroll” azokra a párhuzamos mérésekre vonatkozik, amelyekben inhibitor vegyület használatára nem került sor. A kinyerési hatások értékeinek megadásához a gombaminta 160 µg g<sup>-1</sup> összes Se-tartalmát vettem figyelembe.**

Mintaelőkészítési lépések	Sejtfalbontás drizelázzal			Sejtfalbontás „lysing” enzimmel		
	kontroll	PMSF-fel	inhibitor koktéllal	kontroll	PMSF-fel	inhibitor koktéllal
Extrakció ioncserélt vízzel	43,2	43,8	42,9	44,8	44,8	43,1
Sejtfalbontás	63,1	60,4	59,7	59,2	58,7	55,9
Proteolízis	88,4	88,1	87,4	89,2	88,2	89,2

Eredményeimet – melyek kiértékeléséhez ugyancsak a Welch-próbához fordultam – a 10. táblázat hordozza. A második, tehát a sejtfalbontásnak teret adó lépéseknél kizárólag az inhibitor koktél alkalmazása csökkentette szignifikáns mértékben az addig összesített kinyerési hatásfokot; azonban ez a csökkenés nem állandósult és a végső extrakciós értékek kiegyenlítődték a harmadik, fehérjebontással járó lépés során. Mindez azt jelenti, hogy bár valóban lejátszódott fehérjebontás a sejtfalbontó enzimek működése közben, ez az aktivitás teljes mértékben pótolható volt az előkészítés utolsó lépésében alkalmazott pronáz enzimmel. Ennek ellenére a sejtfalbontási lépés elengedhetetlen részét képezte a mintaelőkészítésnek, mivel még az inhibitor koktéllal gátolt fehérjebontással is szignifikánsan nagyobb kinyerést lehetett elérni, mint sejtfalbontó enzimek nélkül.

#### 4.3.2.4. A különböző mintaelőkészítési módszerek és az elért extrakciós hatásfokok bemutatása – az eredmények értékelése

A sejtfalbontó enzim optimális mennyiségének megállapítása után a különböző mintaelőkészítési módszerek által biztosított extrakciós hatásfokok vizsgálata és összehasonlítása került sorra: a sejtfalbontással is kiegészített háromlépéses módszer mellett az általánosan elterjedt, egylépéses eljárásokat (ioncserélt vízzel végzett vagy pronáz használatán alapuló) ill. az előző alfejezetekben tanulmányozott gombaminta esetén legnagyobb kinyerési hatásfokot eredményező, pepszint és tripszint felhasználó eljárást is végrehajtottam. Az „A”-, „B”-, „C”-, „D”-, „E” betűkkel jelölt mintaelőkészítési módszerek által elért, összesített extrakciós értékeket a 11. táblázat tartalmazza, az elméletileg várt viszonyok és sorrend gyakorlati megvalósulását tükrözve: a fehérjebontással járó kezelések a vizes extrakcióhoz képest közel kétszer annyi szelént szabadítottak fel a mintából. A statisztikai vizsgálatok alapján a sejtfalbontást is tartalmazó „D” és „E” eljárások az összes többi kezelésnél nagyobb kinyerésre vezettek, hasonló (88-89%-os) összesítéssel, maguk közt nem szignifikáns különbséggel; az ugyancsak többlépéses, két fehérjebontási művelettel jellemzett „C” eljárás az egylépéses fehérjebontáshoz (pronáz) képest kicsivel nagyobb kinyerést ért el. Ugyanakkor a százalékos értékekről még nem lehetett tudni, hogy az általuk képviselt, kinyert szelénmennyiség mekkora hányadát lehet majd módosulatanalitikai mérésekkel azonosítani és mennyiségileg meghatározni; gyakorlati

szempontból ugyanis az a mintaelőkészítési eljárást tekinthetjük hasznosabbnak, amely abszolút értékben több módosulat méréséhez járul hozzá.

**11. Táblázat. Néhány jellegzetes mintaelőkészítési eljárással (ultraszűrés nélkül) elért, összesített Se-kinyerési hatások értékek bemutatása. (a) A kinyerési hatások értékeinek megadásához a gombaminta 160 µg g<sup>-1</sup> összes Se-tartalmát vettem figyelembe.**

Mintaelőkészítési műveletek	Mintaelőkészítési lépések száma	Kinyerési hatások, % <sup>a</sup>	RSD, % (n=5)
A – Extrakció ioncserélt vízzel	1	42	1,6
B – Proteolízis pronázzal	1	78	2,6
C – Proteolízis pepszinnel és tripszinnel	3	83	2,7
D – 3-lépéses kezelés drizelázzal (30 mg)	3	88	2,0
E – 3-lépéses kezelés "lysing" enzimmal (30 mg)	3	89	2,9

#### 4.3.2.5. A módosulatanalitikai vizsgálatok eredményeinek ismertetése és értékelése

A mintaelőkészítési módszerek eddigi, teljes kinyerési hatások összehasonlításával kapott megfelelőségi ill. alkalmassági sorrendje a 12. táblázatban bemutatott módosulatanalitikai (bal oldalon) és a hozzájuk lépésenként csatlakozó összes Se-tartalom (jobb oldalon) mérési eredményekkel vált teljessé. A HPLC-HG-AFS vizsgálatok független ICP-OES meghatározásokkal történő kiegészítésére azért volt szükség, mert a módosulatanalitikai mérésekkel meghatározott szelén összesített mennyisége sosem egyezett a mintából kinyert mennyiséggel, számos okból kifolyólag: (a) HPLC mérésre csak ultraszűrésen átesett mintaoldat került, amely természetesen a szüretlen oldathoz képest kevesebb szelént tartalmazott – ezt erősíti meg a táblázat jobb oldalán a 10 kDa alatti és feletti frakciók szeléntartalmának bemutatása is; (b) a rendelkezésre álló standardok és maga a mérőrendszer sajnos közel sem tudott 100%-os módosulatanalitikai azonosítási arányt biztosítani: ezen érték a mintaelőkészítési lépéstől függően 1 és 41% között mozgott. Ez utóbbi viszonylag kis arányt az is okozhatta, hogy nem zárható ki a mintaelőkészítések során kinyert, de hidridet nem képző módosulatok jelenléte sem, melyeket csak más elven működő, a mintamátrix által lehetőleg kevésbé befolyásolt detektálási technikával, pl. csatolt ICP-MS vagy – mivel a koncentráció elvileg lehetővé teszi – ICP-OES segítségével lehetett volna kimutatni a HPLC elválasztás során. Fontos kiemelni, hogy e két utóbbi módszer nem csak a monomer vagy eredetileg is különálló Se-módosulatokat detektálná, hanem a részben hidrolizálatlan, pl. oligopeptid jellegű molekulákat is. Ennél a csiperkemintánál ez a jelenség – a csak részben hidrolizált Se-tartalmú vegyületek jelenléte – is biztosan hozzájárulhatott a viszonylag kis azonosítási arányok kialakulásához.

Ellenőrzési célból az előző gombamintánál alkalmazott HHPN-AFS detektálási rendszert is összeállítottuk, hogy megbizonyosodjunk afelől, esetleg nem a közvetlen hidridképzésre képtelen Se(VI) módosulat képezi-e a nem azonosított szelénfrakció jelentős részét. Mint kiderült, Se(VI) egyetlen mintaoldatban sem volt jelen kimutatható mennyiségben.

Az azonosított módosulatokat illetően kiemelt figyelmet érdemel a SeMet jelenléte. Előző gombamintánk vizsgálata során ugyanis ezt az egyébként nagyon gyakori Se-módosulatot nem, csak Se(IV)-et és valószínűleg SeCys<sub>2</sub>-t mutattunk ki, míg ennél a csiperkénél (melyet Se-dúsított élesztővel kiegészített komposzton termesztettek) szinte mindegyik mintaelőkészítési

lépés együtt járt SeMet- (és jóval kisebb mennyiségben Se(IV)) extrakcióval is. Mivel egyrészt nem állt rendelkezésünkre minta a komposzthoz adagolt élesztőből, másrészt a szelén élesztő legfőbb Se-módosulata a SeMet, nem lehetett eldönteni, hogy a kinyert SeMet összes mennyisége az élesztőből származott-e vagy legalább részben a gomba szintetizálta – mindehhez radioaktívan jelölt Se-izotópos vizsgálatokra lenne szükség.

A kinyerési hatások alapján a két, sejtfalbontási lépést is tartalmazó módszert tekinthetnénk a leghatékonyabb módszereknek – azonban az azonosítási arányokat figyelve mind relatív, mind abszolút értékben az egylépéses, pronáz használatára építő eljárás áll az élen. Bár a pronázos kezelés az összes Se-extrakció alapján csak az utolsó előtti helyet foglalta el, a 10 kDa alatti mérettartományban az első helyen végzett, és – eltekintve a tripszines kezelés („C”-3.) összesítve viszonylag kis extrakciós eredményétől – ennél a kezeléssel volt a legnagyobb a 10 kDa alatti / 10 kDa feletti tartomány aránya is, amely erőteljes hidrolitikus folyamatok lejátszódására utal. A pepszin-tripszin kettős alkalmazása („C” kezelés) ugyan a teljes kinyerés és az azonosítási arány területén kissé lemaradt a sejtfalbontásos „D” és „E” módszerek eredményeitől, ám a 10 kDa mérettartomány arányát tekintve mindkettőt megelőzte. Ez az összetett „helyezés” főleg a pepszin tevékenységének köszönhető, mivel a tripszin csak a kinyert szelén mennyiségét növelte meg, és alig járult hozzá azonosítható-mennyiségileg meghatározható módosulattal a kezelés hatékonyságához.

**12. Táblázat. A szelén élesztővel kiegészített komposzton termesztett, Se-dúsított gomba (160 µg g<sup>-1</sup> összes Se) módosulatanalitikai vizsgálata öt különböző mintaelőkészítési eljárás végrehajtása után. A táblázat 1 g mintára vetítve, mint „µg Se” ismerteti a kinyert összes Se- és Se-módosulatok mennyiségét. A „D” és „E” módszerek második, sejtfalbontási lépésében a korábban optimális értéként elfogadott 30 mg mennyiségű enzim került felhasználásra. K.H.=kimutatási határ. (a) A százalékos azonosítási arány számításánál a HPLC oszlopra juttatott, 10 kDa alatti mérettartományból származó szelén mennyiségét vettem alapul.**

Műveletek	HPLC-HG-AFS					ICP-OES			ultraszűrés nélkül
	ultraszűréssel					ultraszűréssel			
	SeCys <sub>2</sub>	SeMet	Se(IV)	Összesített	Azonosítási arány, % <sup>a</sup>	<10 kDa	>10 kDa	Összesített	
A	<K.H.	5,7	1,5	7,2	15	49,5	19,2	<b>68,7</b>	<b>68,8</b>
B	<K.H.	37,8	5,1	42,9	41	104,0	12,9	<b>117</b>	<b>125</b>
C – 1.lépés	<K.H.	5,3	1,3	6,6	16	41,3	17,8	<b>59,1</b>	<b>61,0</b>
C – 2.lépés	<K.H.	9,1	<K.H.	9,1	24	37,5	16,1	<b>53,6</b>	<b>55,8</b>
C – 3.lépés	<K.H.	<K.H.	0,2	0,2	1	18,6	2,1	<b>20,7</b>	<b>20,8</b>
Összesített	<K.H.	14,4	1,5	15,9	16	97,4	36,0	<b>133</b>	<b>138</b>
D– 1.lépés	<K.H.	5,4	1,7	7,1	15	47,3	19,3	<b>66,6</b>	<b>67,8</b>
D– 2.lépés	<K.H.	1,8	0,4	2,2	19	11,6	13,3	<b>24,9</b>	<b>26,4</b>
D– 3.lépés	<K.H.	5,4	0,4	5,8	30	19,3	27,2	<b>46,5</b>	<b>46,6</b>
Összesített	<K.H.	12,6	2,5	15,1	19	78,2	59,8	<b>138</b>	<b>141</b>
E– 1.lépés	<K.H.	5,3	1,4	6,7	14	46,2	18,0	<b>64,2</b>	<b>65,1</b>
E– 2.lépés	<K.H.	2,9	0,2	3,1	15	21,2	6,7	<b>27,9</b>	<b>28,9</b>
E– 3.lépés	2,6	6,9	<K.H.	9,5	33	29,3	17,1	<b>46,4</b>	<b>48,4</b>
Összesített	2,6	15,1	1,6	19,3	20	96,7	41,8	<b>139</b>	<b>142</b>

Így elérkeztünk a kísérletsorozat legfontosabb eredményéhez is: a sejtfalbontást is képviselő eljárások annak ellenére bizonyultak kevésbé hatékonyak az azonosítási arány tekintetében az egylépéses pronázos technikához képest, hogy utolsó, harmadik lépésként gyakorlatilag magukban ötvözték azt. Ezen jelenség mögött több ok húzódhat meg. Egyrészt a többlépéses módszerek során minden lépés együtt járt centrifugálási lépésekkel, melyek eltávolíthatták a reakciótérből a későbbi enzimes reakciók lehetséges szubsztrátjainak egy részét is – egyébként ezzel szinte teljesen ellentétes folyamatot figyelhettünk meg a Se-dúsított élesztőgomba esetében, ahol a centrifugálási lépések során a szelén jóval kisebb mértékben távozott el azonosítatlan mennyiségként. Másrészt az eltávolított komponensek túlnyomórészt fehérjék lehettek, hiszen ellenkező esetben a „D” és „E” utolsó lépéseiben sorra kerülő pronázos bontással sokkal hatékonyabb hidrolízist kellett volna elérni, mely jóval nagyobb 10 kDa alatti / 10 kDa feletti arányban testesült volna meg. Ez a magyarázat valószínűnek tűnik – akkor azonban mindez közvetett bizonyítékul szolgálhat arra nézve is, hogy gombaporból a szelénnek sokkal nagyobb biológiai hozzáférhetőséget kell mutatnia, ha más nem, akkor a könnyen kioldódó/extrahálható gombafehérjéken keresztül.

A sejtfalbontó enzimes kezelések mindezek ellenére nem tekinthetőek eredménytelenek, különösen ami a „lysing” enzim használatát illeti: amikor ezt az enzimet használtam a szekvenciális mintaelőkészítés során, a fehérjebontási lépés új, más mintaelőkészítési lépésekkel fel nem tárható Se-módosulat megjelenését eredményezte (12. táblázat, „E”-3.), amelyet retenciós ideje alapján SeCys<sub>2</sub>-ként azonosítottunk (bár a holtterefogat közelsége miatt más komponensek együttes elúcióját nem lehet kizárni). Mindezekhez képest a drizeláz minden összehasonlítási paraméter tekintetében gyengébbnek bizonyult, és főleg a 10 kDa alatti / 10 kDa feletti arányt tekintve maradt alul.

#### 4.3.2.6. Új tudományos eredmények a Se-tartalmú élesztővel kiegészített kompoziton termesztett, Se-dúsított gomba módosulatanalitikai vizsgálatához kapcsolódóan

Megállapítottam, hogy a többlépéses, sejtfalbontó enzimes kezelést is tartalmazó mintaelőkészítési módszerrel szignifikánsan nagyobb kinyerési hatásfokot lehet elérni a csupán fehérjebontó enzimre építő vagy pufferelt közegű extrakciókhoz képest, még abban az esetben is, amikor a sejtfalbontó enzimkeverék fehérjebontó aktivitását szelektíven gátoltam. Két különböző inhibitor vegyület alkalmazásával, statisztikai kiértékelés segítségével igazoltam, a sejtfalbontás során valóban lejátszódott fehérjebontás; mindez azt jelenti, hogy a fehérjebontás gátlásával megkülönböztethetővé tettem a sejtfalbontás szelénkinyerésre gyakorolt hatását.

A „lysing” enzim használatával más módszerekkel nem kinyerhető Se-módosulatot tettem hozzáférhetővé a fehérjebontó kezelés számára. Ez a módosulat a HPLC-vizsgálatok segítségével (retenciós idő alapján) végrehajtott azonosítás során SeCys<sub>2</sub>-nek bizonyult.

### **4.3.3. A szelénnel dúsított gombamintákkal végzett módosulatanalitikai vizsgálatainak lezárása és utószó**

Szelénnel dúsított gombákkal végzett kísérleteinkből két közlemény is született [STEFÁNKA 2001, DERNOVICS 2002]. A szekvenciális, sejtfalbontást is tartalmazó enzimes mintaelőkészítési módszer kifejlesztésével időben együtt haladtunk LARSEN et al. kutatócsoportjával, akik nem sokkal előttünk közölték élesztőn és zöldségén végrehajtott kísérleteik eredményeit [LARSEN 2001]. A szelénnel dúsított gomba az eddigi vizsgálatok kritikai értékelése és továbbfejlesztése után valószínűleg alkalmas lehet funkcionális élelmiszer készítésének céljára, főleg szárított (por) alakban, pl. instant készítmények kiegészítése révén, így garantálva a szelén kielégítő mértékű biológiai hozzáférhetőségét.

### **4.4. AZ ELSŐ LRM KIDOLGOZÁSA A SZELEN MÓDOSULATANALITIKA TÖRTÉNETÉBEN**

Az élelmiszerekben kimutatható arzénmódosulatok LD<sub>50</sub> értékei között fennálló, akár három nagyságrendnyi különbség megtámadhatatlan indokként húzódott meg a majdnem 10 éves összefogás eredményét megtestesítő, CRM-627 (és -626) arzén módosulatanalitikai hiteles anyagminták elkészítésében. Ugyanakkor a szelén esetében az elem létfontosságú volta és az egyes – gyakran előforduló – módosulatok egymáshoz közelebbi toxicitása miatt árnyaltabb és a kevésbé célratoró magatartás volt megfigyelhető mind a hiteles anyagmintákat előállító intézeteknél, mind pedig a szakmai közleményekben. Sem a „célmódosulat”, sem a „célkoncentráció”, sem az alkalmas minta kiválasztása nem számított egyszerű feladatnak. Első megközelítésben a BCR a lehető legegyszerűbben járt el: a két szerves Se-módosulattal addíciós eljárás keretében mesterséges ivóvízmintát állított elő, két különböző (összes Se-tartalmat tekintve 14 és 80 µg l<sup>-1</sup>) koncentrációban [QUEVAUVILLER 1998]. Az európai ivóvizek átlagos szeléntartalma ng l<sup>-1</sup> nagyságrendű vagy még kisebb [D'ULIVO 1997], fogyasztásuk tehát nem vált ki élelmiszer-biztonsági aggodalmat; ebből látható, hogy a választás oka nem gyakorlati szükséglet, hanem kezdeti „tapogatódzás” és a meglehetősen instabil (könnyen egymásba alakuló) módosulatok vizsgálata volt. A tervezett hiteles anyagminta végül a gyakorlati felhasználás céljaira alkalmatlannak bizonyult, mivel a tárolóedényzet első nyitását követően – valószínűleg a beoldódó oxigén hatására – szignifikáns módosulátváltozás állt be.

A mesterséges minta után a figyelem a természetes szeléntartalommal rendelkező, valóban gyakorlati minták felé fordult. Többeleemes (As, Hg, Se) módosulatanalitikai hiteles anyagminta előállításának céljából a BCR osztrigamintát készített, melyet 1,2 µg g<sup>-1</sup> körüli Se-koncentráció jellemzett. A „Mulspot” terv keretében, nemzetközi körelemzés segítségével végrehajtott hitelesítési folyamat a szelénre nézve kudarcot vallott, mivel ilyen kis koncentrációt a minta kiemelkedő vas- és zsírtartalma miatt a laborok jelentős hányada sajnos még összes Se-tartalomra sem tudott pontosan meghatározni, nem is beszélve a módosulatanalitikai mérésekről [MULSPOT 1998]. Másrésztől jogosan merülhetett fel a kétely, szükséges-e egyáltalán ebben a koncentrációtartományban szelén módosulatanalitikai méréseket végezni, hiszen – figyelembe véve az eredeti minta szárazanyag-tartalmát és a szelén tengeri eredetű élelmiszerekből mutatott, korábban már említett kis biológiai hozzáférhetőségét – a szelént illetően ismét nem a valódi

szükséglet által sugallt mintáról volt szó: 50%-os (a valódi értéket többszörösen meghaladó) szelénfelszívódás esetén is csak a legalább napi 5-6 kg osztriga fogyasztása jelentene egészségügyi kockázatot.

Nem tudni, milyen okból kifolyólag, de a talán leginkább kézenfekvő, a hétköznapiakban valóban gyakorlati jelentőséggel rendelkező, olcsón, nagy mennyiségben, szabályozható szeléntartalommal előállítható, a szakirodalmat tekintve rendkívül széles körben tanulmányozott és feltérképezett, szelénnel dúsított élesztőből sem készült hiteles anyagminta – még összes szeléntartalomra sem. Igény lenne rá, hiszen a közlemények alapján legalább 3-4 tucat, kisebb-nagyobb cég gyárt por vagy tablettázott formájú, kifejezetten szelénpótlási céllal forgalomba hozott élesztőkészítményt – hazánkban is legkevesebb 3 (ebből 2 magyar) cég gyártmányait találhatjuk meg a gyógyszertárak és a gyógyhatású termékeket forgalmazó boltok polcain. Mint ahogy B'HYMER és CARUSO [2000] megállapították, óriási különbség tapasztalható a szelén módosulatanalitikai eloszlását illetően a szinte 100% SeMet és a szinte 100% Se(IV) tartalmú, önmagukat „a szelént szerves kötésben hordozó” tulajdonsággal jellemzett különböző márkák között – határértékek, ajánlott módosulatarányok azonban még sehol sem kerültek meghatározásra.

Pedig mindenképpen nagy szükség van módosulatanalitikai referenciaanyagra, ugyanis a legegyszerűbb, mintaelőkészítést gyakorlatilag alig igénylő vízmintáktól és a fehérjeszintű módosulatanalitikai elemzésektől eltekintve jelenleg megoldatlan a szelén módosulatanalitikai mérések legtöbb szakaszának minőségbiztosítása. Már egy LRM megléte is nagymértékben javítana a helyzeten, hiszen bár CRM hiányában a mérés pontosságát csak körülményesen lehet megállapítani, de az LRM lehetővé tenné a mérés ismételhetőségének, reprodukálhatóságának és a mintaelőkészítési folyamatot jellemző kinyerési hatásfoknak meghatározását, valamint kontrollkártyás módszerrel felügyelhetővé, ellenőrizhetővé tenné a teljes vizsgálati folyamatot. A referenciaanyag szelénkoncentrációjának el kell érni azt a tartományt, amelyben a szelén módosulatanalitika élelmiszer-biztonsági szempontból indokoltá válik. A korábban említett okokból kifolyólag az adalékolás alkalmatlan LRM készítési célokra, így a mesterséges szeléndúsítás vagy valamely könnyen hozzáférhető, eredendően nagy szeléntartalmú minta használata tűnik célravezetőnek. Személyes tapasztalataim alapján az egysejtűek (élesztő, tejsavbaktérium) dúsítása kis (=laboratóriumi) léptékben a törzsszelekciós és inhomogenitási problémák miatt nehezen követhető utat képvisel; a csiperkegomba ugyan könnyen előállítható nagy tömegben, de az általa szintetizált Se-módosulatoknak jelenleg csupán kb. 40%-át tudjuk azonosítani (ld. 4.3. alfejezetek) – ez a tény pedig egyértelmű gátat jelent a csiperkegomba alapú módosulatanalitikai RM előállításánál.

A másik csoportot meglehetősen szűk kör képviseli. Az állati szervezet nem képes szelént nagy mennyiségben tárolni; szárazanyagra számítva  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  körüli értékben csupán az átlagnál nagyobb mennyiségű szelént tartalmazó tápon nevelt háziállatok belsősége (máj, vese) tartalmazza, ill. a tengeri halak, rákok izma és ikrája érheti el ritka megnyilvánulásként a  $4\text{-}5 \mu\text{g g}^{-1}$  szelénkoncentrációt [REILLY 1998]. Növények esetében többek közt néhány Észak-Amerikában honos, fitoremediációs célra is használt gyomfélé, a vadmustár (*Brassica juncea*) és

a nehéz szagú baktövis (*Astragalus praelongus*) képes dúsítani a talaj szeléntartalmát akár néhány száz  $\mu\text{g g}^{-1}$  értékig [UDEN 1998]. Számunkra ezek a növények több okból kifolyólag sem alkalmasak LRM készítésére: (a) csak korlátozottan lehet őket beszerezni (Eurázsiaiában nem honosak); (b) sem élelmiszerben, sem állati tápokban nem használják fel őket, így vizsgálatuk élelmiszer-biztonsági szempontból nem indokolt; végül (c) a bennük kimutatott szelénmódosulatok azonosítása – standardok hiányában – kizárólag ESI-MS segítségével történhet.

Létezik azonban egy növény, a brazil dió (*Bertholletia excelsa*), melynek csonthéjas termése minden szempontból megfelelő alanynak látszott szelén módosulatanalitikai referenciaanyag kialakítására. A hazánkban általában héjatlánítva, paradió megnevezéssel polcokra kerülő termék hazája Brazília, ahol két, egymástól a talaj szeléntartalmában rendkívüli módon eltérő, esőerdővel borított régióban terem. A közép-brazíliai régióból származó, héjastul és kisebb kiszerelekben (0,25-0,75 kg) csomagolt dió szeléntartalma az  $500 \mu\text{g g}^{-1}$  értéket is meghaladhatja, míg a szelénben szegényebb talajjal jellemezhető, nyugat-brazil terület termése ömlesztve, héjjal vagy héj nélkül jut el a fogyasztóhoz, átlagosan 3, de legfeljebb is csak  $30 \mu\text{g Se g}^{-1}$  koncentrációval [SECOR 1989, CHANG 1995]. A leginkább desszertként felhasznált brazil dió azóta népszerű Nyugat-Európában, amióta a 70-es évek végén a brit kormány külön felhívta a lakosság figyelmét arra, hogy az észak-amerikai búzaimport európai búzával történő kiváltása miatt lecsökkenő, élelmiszer-eredetű szelénbevitel brazil dió fogyasztásával is helyreállítható [REILLY 1998]. E termés napjainkban szinte minden jelentősebb nyugat-európai bolt polcain megtalálható, a hagyományos dióhoz képest jóval alacsonyabb árfekvéssel; hazánkban a rendszerváltást követően jelent meg és még viszonylag drága, „luxus” élelmiszerként kapható, 150-250 g-os tasakokban. A brazil dió további jellegzetességei közül fontos megemlíteni, hogy 70 m/m % körüli zsírtartalommal rendelkezik, és szárazanyag-tartalma meghaladja a 99 m/m %-ot.

Annak ellenére, hogy a világ jelenleg ismert legnagyobb természetes szeléntartalmú élelmiszeréről van szó, meglehetősen későn kezdték el táplálkozás-élettani és módosulatanalitikai vizsgálatát. CHANSLER et al. [1986] eredményei azt mutatták, hogy a brazil dió szeléntartalmának több mint 95%-a biológiailag hozzáférhető formában van jelen; ez az érték az eddig ismert legnagyobb a nem állati eredetű élelmiszerek között. Ez a tény, kiegészítve azokkal az ismeretekkel, hogy a brazil dió fehérjefrakciója kiemelkedő metionintartalommal rendelkezik (19 n/n %) a növényi élelmiszer-fehérjékhez képest [TU 1998], és hogy a brazil dióval etetett patkányok testszövetekben a SeMet-t tartalmazó tápot fogyasztó társaikhoz hasonló mértékű szeléndúsulást figyeltek meg [IP 1994], arra utal, hogy ebben a mintában nagy valószínűség szerint SeMet lehet a fő szelénmódosulat – tehát minden szempontból ideális választásnak tűnik a szelén módosulatanalitikai referenciaanyag céljára: várhatóan (a) nagy Se-koncentráció, (b) minőségileg és mennyiségileg meghatározható Se-módosulat(ok) és (c) valódi élelmiszer-biztonsági kérdés jellemzi, hiszen akár néhány szem dió elfogyasztása a Se-módosulattól függően már túlzott Se-bevitelhez vezethet. Ezek alapján határoztuk el, hogy egyrészt végrehajtjuk a brazil dió módosulatanalitikai vizsgálatát, másrészt –



amennyiben a mérések sikerrel zárulnak – LRM előállítását kíséreljük meg, a hozzá tartozó összetételi, homogenitási és stabilitási mérésekkel együtt.

#### **4.4.1. Felhasznált anyagok és vegyszerek**

A kísérletekhez felhasznált két, egyenként 500 grammos, összesen kb. 80 db héjas brazil diót tartalmazó csomag egy római bevásárlóközpontból származott. Az egyik csomag tartalmát a mintaelőkészítési és előzetes módszeranalitikai elemzésekhez használtuk fel, míg a másik csomagot teljes egészében a referenciaanyag elkészítésére fordítottuk.

A zsírtalanítási módszer kialakítása során felhasznált gumiarábikum, lipáz enzim, Na-taurokolát, ciklohexán és a foszfátpuffer készítéséhez alkalmazott  $K_2HPO_4$  és  $KH_2PO_4$  sók jellemzőit a 3.1. fejezetben ismertettem, a mintaelőkészítés egyéb lépéseinél alkalmazott pronáz (nem szubsztrátspecifikus fehérjebontó enzimkeverék), cc.  $HNO_3$  ill. a 30 m/m %  $H_2O_2$  oldattal együtt. Az összes szeléntartalom meghatározásának analitikai minőségbiztosításához TORT-2 (lábásfejű hepatopankreászból készült) CRM-et használtunk, melyet a National Research Council of Canada (Halifax, Kanada) állít elő és forgalmaz.

A kromatográfiás – anioncserélő ill. ionpárhépzéssel végrehajtott fordított fázisú HPLC – elválasztás és a hidridfejlesztés segítségével, atomfluoreszcens detektálással történő minőségi és mennyiségi Se-módsulat meghatározás részletes leírását, így az ott alkalmazott standardok és vegyszerek bemutatását is STEFÁNKA et al. közleménye [2003b] és STEFÁNKA PhD értekezése [2003a] tartalmazza.

#### **4.4.2. A brazil dió zsírtalanítása**

A dió enzimes zsírtalanítását MÁTRAI [1997] által leírt módszer átalakításával végeztem. A külső és belső héjától megtisztított diót konyhai kávédaráló segítségével krémes állagúvá őröltem, majd 0,50 g-nyi mennyiséget 20 ml-es főzőpohárba mértem, amelyhez – emulgeálási célból – 1 ml, 20 mg ml<sup>-1</sup> Na-taurokolát-oldatot, 5 ml 100 mg ml<sup>-1</sup> gumiarábikum-oldatot, ill. 5 ml, 0,25 mol l<sup>-1</sup> (pH=8,0) foszfátpuffert adagoltam. Ezt követően az elegyet mágneses keverő segítségével homogenizáltam, hőmérsékletét külső fűtő folyadékközeg segítségével 37-38°C-ra melegítettem, majd 1 ml foszfátpufferben oldott, 30 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú lipáz enzim hozzáadásával elindítottam a zsírbontási reakciót. Az oldat kémhatását előzetesen kalibrált pH-mérő segítségével folyamatosan nyomon követtem. A reakció előrehaladtával az elegy kémhatása semleges, majd savas tartományba csúszott át, ekkor 0,05 mol l<sup>-1</sup> NaOH-oldat automata pipettával történő adagolásával a kémhatást többlépésben visszaállítottam az enzim pH-optimumához közeli 7,5-ös értékre. Kb. 1000 µl NaOH adagolása után a kémhatás csökkenése lelassult és további lúg adagolására nem volt szükség. Ekkor a 20 ml-es főzőpoharat tartalmával együtt a keverő eltávolítása után rázóasztallal ellátott termosztátba helyeztem át, parafilmmel lefedtem és 37°C fokon még 12 órán keresztül, 160 perc<sup>-1</sup> fordulatszámot kevertettem. A teljes zsírbontási reakció kb. 26 órát tett ki. Ezt követően az elegyet maradék nélkül 15 ml-es centrifugacsőbe mostam át és 5°C hőmérsékleten, 25 percig, 4100 g terhelés

mellett centrifugálással 3 frakcióra (lipidréteg, pufferoldat, diótörmelék) osztottam, melyeknek savas roncsolás segítségével határoztam meg az összes szeléntartalmukat.

A dió szerves oldószerrel történő zsírtalanításához a megtisztított terméseket konyhai reszelővel 2-3 mm-es forgácsokká aprítottam, amelyeket 10,00 grammonként extrahálólüvelyekbe mértem ki. Soxhlet-berendezés segítségével, 1:10 dióreszelék:ciklohexán tömegarány beállítása után 10 átbukáson keresztül zsírtalanítottam a mintát. A kb. 3 órás folyamat végén az extrahálólüvelyeket kiürítettem, az eltávolított dióforgácsokat súlyállandóság eléréséig szobahőmérsékleten tartottam a rajtuk maradt ciklohexán eltávolítása céljából, majd visszamértem a mintákat a tömegcsökkenés meghatározása végett. Az extrahált zsírt tartalmazó ciklohexánt ioncserélt vízzel választótölcsérben ráztam ki; a vizes és interfázist elválasztottam, és addig ismételtam a vizes kirázást, amíg a szerves fázis zavarodása meg nem szűnt. Az egymást követő folyadék-folyadék extrakciókból származó vizes és interfázisokat egyesítettem, infralámpa alá helyezett PTFE edényekben 1-2 ml-es térfogatra pároltam és savas roncsolással meghatároztam összes szeléntartalmukat. Az extrahált ciklohexánból vákuumbepárlással nyertem vissza a tiszta oldószert, a bepárlási maradékot pedig az előbb leírtakhoz hasonlóan savas roncsolásnak vettem alá.

#### **4.4.3. A brazil dió módosulatanalitikai mintaelőkészítése során végrehajtott műveletek bemutatása**

A szerves oldószerrel zsírtalanított dióreszeléket porcelán dörzsmozsár segítségével finom porrá őröltem, majd 125 µm-es szitányéron átszitáltam; az enzimes módosulatanalitikai mintaelőkészítés céljaira az áthulló frakciót használtam fel. Ebből a lisztszerű mintából 150 mg-ot polietilén fiolába mértem ki, 3 ml 0,06 mol l<sup>-1</sup> (pH=7,4) foszfátpuffert adtam hozzá és a mintát rázogatóssal-kevergetéssel feloldottam; ezután 0,6 ml pufferben oldott 15 mg pronáz enzimet mértem az oldathoz. A fiolát lezártam, és 37°C fokon, 24 órán keresztül, 180 perc<sup>-1</sup> fordulatszámon keverttem. A kezelés végén a fiola tartalmát maradék nélkül centrifugacsőbe mostam át, és 15°C hőmérsékleten, 25 percig, 4100 g terhelés mellett centrifugálással kiülepítettem a minta oldhatatlan részeit. A felülúszót elválasztottam, 0,45 µm-es fecskendőszűrőn keresztül 5,0 ml-es mérőlombikba juttattam, majd a lombikot ugyancsak a szűrőn keresztül ioncserélt vízzel jelre töltöttem. Ezt az oldatot használtuk fel mind a HPLC-vel végzett módosulatanalitikai mérésekhez, mind pedig a párhuzamosan futó, ICP-OES segítségével történő összes Se-meghatározáshoz.

A centrifugálással kapott üledéket a hozzá tartozó 0,45 µm-es szűrővel együtt savas roncsolással (3.1. fejezet) tártam fel és meghatároztuk az összes Se-tartalmat a kinyerési határfok értékeinek (más megfogalmazásban a szelénmérleg) megállapításához; ez utóbbi teljessé tételéhez a kiindulási diópor összes szeléntartalmát is meg kellett mérni. Az összes Se-meghatározás minőségbiztosítását TORT-2 CRM párhuzamos elemzésével (150-200 mg beméréssel) oldottuk meg.

#### **4.4.4. A brazil dióból készülő, Se-módosulatanalitikai LRM kialakítása során alkalmazott műveleti lépések ismertetése**

##### **4.4.4.1. A referenciaanyag előállítása a nyersanyag feldolgozásától a tárolási kísérletek kialakításáig**

A referenciaanyag készítéséhez 500 g brazil diót használtunk fel. A terméseket feltörtük, a hibás darabokat és a külső héjat eltávolítottuk, majd a termésekről lekapartuk a belső barna héjat is. A válogatást követően 210 g tiszta dióhoz jutottunk, melyet apróra reszeltünk és a 4.4.2. pontban leírtak szerint Soxhlet-extrakció segítségével ciklohexánnal zsírtalanítottuk. A zsírmentes dióreszelék tömege 61,0 g-nak adódott, amely 71 m/m %-os tömegcsökkenést jelent. A dió egy kis részéből összes Se-meghatározást végeztünk el; a maradék további kezelését (a 125 µm-es mérettartomány eléréséhez szükséges finomra őrlést, szitálást és homogenizálást) a minta viszonylag nagy mennyisége miatt felkérésünkre az Országos Mezőgazdasági Minőségügyi Intézet (OMMI) laboratóriuma végezte el. Ezt követően a dióport 1,5 grammos kiszerezésekben azonosító jelekkel ellátott, polietilén fiolákba osztottuk szét, amelyek egy részéből homogenitásvizsgálatot végeztünk el (4.4.4.2. pont). Mivel ez utóbbi sikerrel zárult, tehát a minta homogenitása megfelelőnek bizonyult, a fiolákat lezártuk és egy (az ún. besugárzási kontroll) kivételével a Központi Élelmiszertudományi Kutatóintézet (KÉKI) Mikrobiológia Osztályán <sup>60</sup>Co ágyú segítségével 25 kGy γ-besugárzásnak tettük ki; ugyanitt zajlott le a vízkaktivitás ( $a_w$ ; készülék: Novasina; Novasina A.G., Zürich, Svájc) ill. a sugárkezelés eredményességét vizsgáló baktérium, penész és élesztő összcsíraszám meghatározás is. A mikrobiológiai vizsgálatok után az immár steril dióport a 6. ábrán bemutatott elosztás szerint 3 különböző (-18°C, +4°C és +24°C) hőmérsékletű helyen tároltuk és a jelölt időközönként a hagyományos ill. izokrón stabilitásvizsgálati elv [LAMBERTY 1998] szerint végeztük el a módosulatanalitikai vizsgálatokat. A besugárzási kontroll elemzésére 1 hónapos tárolást követően került sor.

##### **4.4.4.2. A homogenitásvizsgálat menete**

A szelén és a SeMet ún. „tárolási egységen belüli” homogenitását két, a töltést követően véletlenszerűen kiválasztott fiolából végzett vizsgálatokkal határoztuk meg; az egyik fiola az összes szelén, míg a másik a SeMet eloszlásának ellenőrzésére szolgált. Fiolánként 9-9 párhuzamos mérést hajtottunk végre, melyek során a mintaelőkészítést 150 mg diópor bemérésével végeztük el. Az ún. „tárolási egységek közötti” homogenitás megállapításához 9 db fiolából egyenként 300 mg mintát vettünk, melyből 150 mg-t az összes szelén, míg 150 mg-ot a SeMet módosulatanalitikai meghatározására használtunk fel. A mintavétel előtt a fiolákat néhány percig kézzel összeráztuk, hogy az esetleg összetapadt szemcséket szétválasszuk egymástól és így biztosítsuk a homogén mintavétel lehetőségét.

Tárolási elrendezés és hőmérséklet	Jel	$^{60}\text{Co}$	Tárolás időtartama (hónap) és a mérés időpontja (●)			
			1	2	3	
-18°C	Hagyományos	a <sup>1</sup>	✓	■	●	
		a <sup>2</sup>	✓	■	●	
		a <sup>3</sup>	✓	■	●	
+4°C		b <sup>1</sup>	✓	■	●	
		b <sup>2</sup>	✓	■	●	
		b <sup>3</sup>	✓	■	●	
+24°C		c <sup>1</sup>	✓	■	●	
		c <sup>2</sup>	✓	■	●	
		c <sup>3</sup>	✓	■	●	
Áthelyezés -18°C-ról +24°C-ra	Izokrón	d <sup>1</sup>	✓	-18°C	+24°C	●
		d <sup>2</sup>	✓	-18°C	+24°C	●
		d <sup>3</sup>	✓	-18°C		●
-18°C	e <sup>1</sup>	×	■	●		

6. Ábra. A brazil dióból referenciaanyag célzattal létrehozott készítmény stabilitásvizsgálatának tárolási elrendezése és mérési ütemterve. A „pipa” szimbólum a  $\gamma$ -besugárzáson átesett anyagot mutatja. A „●” jelzés a módosulatanalitikai mintaelőkészítés és mérések végrehajtásának időpontját jelöli. A „Jel” fejlécű oszlopban található azonosító betűk felső indexei a tárolási időtartam hosszára utalnak.

#### 4.4.5. A minta zsírtalanítására irányuló kísérletek kiértékelése

A brazil dió szeléntartalmának megoszlását illetően ismeretlen összetételű és jellegzetesen nagy (70 m/m % körüli) zsírtartalma elvileg magában hordozta annak a lehetőségét, hogy esetleg lipofil karakterű vegyületek is hordoznak szelént – ugyanakkor a számunkra rendelkezésre álló HPLC rendszerekkel kivitelezhetetlen lett volna egy ekkora zsírtartalmú minta közvetlen elemzése. Így első megközelítésben célszerűnek tűnt a „gyengéd” mintaelőkészítési módszerek között számon tartott enzimes kezeléssel megbontani a minta egységét, hogy képet kaphassak a szelén mintaalkotókon belüli eloszlásáról; bár a szelén általában a minta fehérjetartalmához kapcsolódik, erről a brazil dió esetében is bizonyosságot kellett szerezni. Ehhez természetesen egyrészt emulgeálószerre (gumiarábikumra és Na-taurokolátra) volt szükség a minta vizes oldatba történő viteléhez, másrészt a zsírbontással együtt járó pH-csökkenés fékezésére és ellensúlyozására pufferoldatot kellett adagolni. Előzetes méréseim alapján a kb. 350 mg zsírt tartalmazó, 500 mg dióminta lipáz enzimmel való kezelésénél még a 0,25 mol l<sup>-1</sup> (pH=8,0) foszfátpuffer sem bizonyult elegendő kapacitásúnak a pH legalább semleges (tehát a felhasznált enzim optima körüli) értéken tartásához. Ebből kifolyólag a reakció indítását követően híg NaOH-oldat adagolásával állítottam vissza a kémhatást egészen addig, amíg a foszfátpuffer és a vélhetően az enzim által felszabadított zsírsavak Na-sói által biztosított pufferhatás stabilizálta az elegy pH-ját. A 24 órás kezelést követő, 5°C fokon végzett centrifugálás három, egymástól tisztán elkülönülő fázist eredményezett: vastag hófehér zsírréteget kissé diffúz (interfázis jellegű)

alsó határfelülettel a cső tetején, egy köztes szinten pufferes-vizes fázist és az oldhatatlan diótörmelékkel. A rétegek összes szeléntartalma volt hivatott eldönteni, hogy a módszer alkalmas-e a zsírtartalom eltávolítására ill. hogy valójában hol helyezkedik el a szelént tartalmazó diófrakció.

A savas roncsolás a következő eredményre vezetett: (a) a törmelék szeléntartalma kimutatási határ alattinak adódott, (b) a pufferes-vizes fázis és a zsírréteg kb. fele-fele arányban hordozott szelént. Mindez azt jelentette, hogy felemás helyzet alakult ki: bár a lipáz enzim kezelés a minta összes szeléntartalmát oldatba vitte, annak fele továbbra is módosulatanalitikai elemzésre nem bocsátható frakcióban helyezkedett el. Továbbra is nyitva maradt a kérdés: vajon a szelén jelentős része valóban lipofil vegyületek formájában található-e meg a mintában, vagy esetleg a feltárás nem bizonyult tökéletesnek és a zsíros mintamátrix nem bomlott meg teljesen, magába zárva pl. a minta fehérjetartalmának egy részét.

Fontos megjegyezni, hogy a kísérletet kontroll mintával is elvégeztem, amely enzimet nem, csupán emulgeálószeret és puffert tartalmazott; ennek centrifugálásakor két réteg, a diótörmelék és egy zavaros, fehér, tejszerű emulzió alakult ki, tehát a zsírréteg enzim kezelés nélkül nem különült el a vizes fázistól.

A zsírtalanítás másik módjával a korábban szelén módosulatanalitikai szakirodalomban még nem jegyzett módszert, a Soxhlet-extrakcióval végzett, vízzel nem elegyedő szerves oldószeres (tehát alkoholokat nem alkalmazó) kezelést választottam. Ez az eljárás nem jár számottevő hőmérséklet-emeléssel, mivel a mintával a már lecsapódott, 50°C fok körüli hőmérsékletű oldószer érintkezik, tehát a szerves Se-módosulatok közti redox átmenet veszélye még nem áll fenn. Szerves oldószerként ciklohexánt választottam, mivel ez a – klórt nem tartalmazó – vegyület vélhetőleg inert közegként viselkedik és a lipofil vegyületek kioldásán kívül nem lép más reakcióba a minta alkotóival.

A kísérlet teljes mértékben beváltotta a hozzá fűzött reményeket. Mint ahogy a későbbiekben bemutatásra kerülő szelénmérleg adatai igazolják, a ciklohexán gyakorlatilag a szeléntartalom csökkentése nélkül zsírtmentesítette a diómintát, és a kezelés azzal a járulékos előnnyel is járt, hogy a kialakuló dióreszeléket a továbbiakban könnyen, összetapadás veszélye nélkül lehetett őrölni és szitálni. Mindez azt is igazolta, hogy a brazil dió számottevő mennyiségben nem tartalmaz lipofil Se-módosulatokat.

A brazil dióval folytatott, minden további vizsgálatot ciklohexánnal zsírtalanított formában hajtottunk végre.

#### **4.4.6. A szelénmérleg alakulása a referenciaanyag készítése során**

Az előzetes kísérletek során nyilvánvalóvá vált, hogy a nem zsírtalanított dió savas roncsolása – a kiemelkedő, 70 m/m % körüli lipidtartalom, annak valószínűleg egyenetlen eloszlása és az egyes diók közti eltérések miatt – csak kis megbízhatósággal teszi lehetővé az összes szeléntartalom megállapítását. Ebből kifolyólag a tisztítás és válogatás után rendelkezésre álló 210 g dióból nem végeztünk el összes Se-meghatározást, hanem végrehajtottuk a reszelést és a zsírtalanítást, majd a létrejövő 2 frakciónak (zsírtmentes diópor + szerves oldószerrel

eltávolított lipid és lipofil dióalkotók) külön-külön határoztuk meg savas roncsolással a Se-tartalmát, amely a diópornál  $81,3 \mu\text{g Se g}^{-1}$  (RSD: 5,9%, n=5), míg a Soxhlet-extrakcióval kialakuló lipidfrakciónál összesen  $9,9 \mu\text{g Se}$  értékűnek adódott. Mindez azt jelenti, hogy a  $61,0 \text{ g}$  zsírtalanított dió hozzávetőlegesen  $4960 \mu\text{g}$  szelént tartalmaz, és a szerves oldószeres kezelés az összes szeléntartalom kb. 0,2%-át távolította el. Mivel a diópor ezt követően még átesett a szemcseméret-csökkentést célzó további aprításon és szitáláson, célszerűnek tűnt még egyszer meghatározni az összes szeléntartalmat, hiszen a szemcseméret-eloszlás változása minden bizonnyal befolyásolja a teljes mérési bizonytalanságnak a minta inhomogenitásából fakadó összetevőjét. Ezen feltételezés igaznak bizonyult: a végül stabilitásvizsgálatokhoz is kijelölt érték  $82,9 \mu\text{g Se g}^{-1}$ -nak adódott (RSD: 4,7%, n=5). Bár két mintás t-próba szerint a két átlagérték között szignifikáns eltérés nincs, azonban az utóbbi érték használata célszerű, mivel a kisebb szemcseméretű diópor képezte az összes későbbi vizsgálat tárgyát.

Az összes szeléntartalom meghatározásának minőségbiztosítására TORT-2 CRM párhuzamos elemzése szolgált. A mért értékek ( $5,85 \pm 1,09 \mu\text{g Se g}^{-1}$ , n=3) eltérése a hiteles értéktől ( $5,63 \pm 0,67 \mu\text{g Se g}^{-1}$ ) nem volt szignifikáns, így az összes Se-tartalom eredmények elfogadhatónak és megfelelőnek tekinthetők.

#### **4.4.7. A brazil dió Se-módosulatanalitikai méréseinek kiértékelése**

A dióminta módosulatanalitikai mérései két csoportba oszthatók. A vizsgálatok első szakaszában a mintaelőkészítés és a HPLC mérés paramétereinek optimalizálásánál minőségi azonosítást hajtottunk végre, hogy megállapíthassuk, mely Se-módosulatokat lehet a későbbiekben megbízhatóan, mennyiségi kiértékeléssel is meghatározni. Ezen szakasz lezárása után a már kifejezetten referenciaanyag célzattal kezelt,  $\gamma$ -besugárzással sterilizált dióból a módosulatanalitikai mérések célja a kiválasztott módosulat mennyiségi meghatározását foglalta magába.

Mivel – ESI-MS vagy MALDI-TOFMS hiányában – a mintában található Se-módosulatokat kizárólag a meglévő standard vegyületekkel mutatott együttes elúcióval (másképpen fogalmazva: azonos retenciós idő alapján) tudjuk azonosítani, így mindenképpen célszerűnek tűnt legalább két, egymástól alapjaiban különböző kromatográfias elválasztási rendszert alkalmazni. Ez a megközelítés – ha nem is zárja ki, de – nagymértékben lecsökkenti a különböző módosulatok azonos retenciós idő miatti téves azonosításának lehetőségét. A dióminta anioncserélő oszlop segítségével végrehajtott ill. a fordított fázisú oszlopon ionpároképző vegyület alkalmazásával kialakított HPLC-elválasztása segítségével két módosulatot, SeCys<sub>2</sub>-t és SeMet-t lehetett kimutatni; e kettőből mennyiségileg csak az utóbbit tudtuk mennyiségileg is meghatározni, mivel a SeCys<sub>2</sub> a holtterefogat közelében eluálódott mindkét kromatográfias rendszer esetében, amelynek közelsége nem teszi lehetővé az egyértelmű azonosítást. Ebből következik, hogy a későbbiekben csak a SeMet módosulat meghatározására törekedtünk.

A referenciaanyagának szánt mintarészlet esetében a SeMet mennyiségi elemzését mindkét kromatográfiai rendszer segítségével végrehajtottuk. Az anioncserélő oszlop használatán alapuló elválasztás szerint a minta – szelénre számítva –  $79,9 \mu\text{g g}^{-1}$  (RSD: 6,2%), míg a fordított fázisú

oszlopon, ionpárpézpözével társított elválasztás alapján  $80,4 \mu\text{g g}^{-1}$  (RSD: 18,9%) SeMet-t tartalmaz. A stabilitásvizsgálatok számára kijelölt értékek az előbbi, nyilvánvalóan robosztusabb és megbízhatóbb módszer által szolgáltatott adatot fogadtuk el, amely egyben azt is jelenti, hogy méréseink szerint a minta szeléntartalmának több mint 96%-át alkotja ez a szeleno-aminosav. Érdeemes megemlíteni, hogy a legújabb irodalmi adatok alapján [LARSEN 2003] az általunk SeCys<sub>2</sub>-nek vélt, a holtterfogot után eluálódó módosulat esetleg a SeMet oxidált formája, a szeleno-oxo-metionin (SeOMet) is lehet, amely a mintaelőkészítés során jöhet létre a fehérjékből felszabadított SeMet-ből; így elvileg nem zárható ki, hogy a brazil dió összes Se-tartalma az utóbbi módosulat formájában van jelen.

A módosulatanalitikai mérések értékelését feltétlenül szükséges kiegészíteni az alkalmazott mintaelőkészítés során tapasztalt kinyerési hatások ismertetésével, hiszen egy esetleg kis hatásfokú vagy kis megbízhatóságú feltárás magában rejtheti annak a veszélyét, hogy pl. a különböző időpontokban végrehajtott mintaelőkészítések más, korábban nem tapasztalt módosulatot eredményeznek ill. ugyanazon módosulat kisebb vagy nagyobb mennyiségben való azonosítása téves stabilitási paraméterek megállapítására vezethet. A dióminta azonban ilyen veszélyt nem rejtett magában: az enzimes mintaelőkészítés 98%-os átlagos kinyerési hatásfokot ért el 94,7-105,2%-os tartomány mellett, amely a minta kiemelkedően jó és könnyű feltárhatóságára utal. Természetesen ehhez nagymértékben hozzájárult a szerves oldószeres kezelés, hiszen az apoláris ciklohexán a zsírtartalom eltávolításán túl a lipidmembránok feloldásával is megkönnyítette az enzimek hozzáférését a dió fehérjetartalmához.

#### **4.4.8. A homogenitásvizsgálat eredményeinek bemutatása és értékelése**

A homogenitás ellenőrzése alapvető feladat a referenciaanyagnak szánt minta minősítésénél, mivel az inhomogén anyag – megnövelt mintabemérés esetén – ugyan még lehetővé teheti a pontos méréseket, de mindez már csak kis megbízhatósággal társulhat. Mindemelllett a módosulatanalitikai referenciaanyag homogenitását a vizsgált elemre és a kiválasztott módosulatra külön-külön ellenőrizni szükséges, hiszen a különböző, esetleg elemzésre nem kerülő, eltérő eloszlású módosulatok az összes elemtartalom kizárólagos homogenitásvizsgálata esetén elfedhetik az egyes módosulatok különböző eloszlását.

A brazil dió esetében tehát mind az összes Se, mind pedig a SeMet vizsgálatára szükség volt; az előbbit savas roncsolással, míg a szeleno-aminosavat anioncserélő oszlop segítségével végzett módosulatanalitikai elemzéssel határoztuk meg, a 6. ábrán ismertetett ütemterv szerint. A 9. Melléklet 1. táblázata tartalmazza a tárolási egységen belüli (B) és közötti (K) homogenitásvizsgálat eredményeit mindkét meghatározandó komponensre. A kiértékelést statisztikai módszerrel lehet végrehajtani: amennyiben a vonatkozó szórásnégyzetek,  $CV_B$  és  $CV_K \pm 1$  bizonytalansági értékkel ( $U_{CV}$ ; definíció szerint  $U_{CV} \approx CV/\sqrt{2n}$ , ahol  $n$  = ismétlések száma) bővített értéktartományai átfedik egymást, úgy a homogenitás kielégítőnek tekinthető [KRAMER 2003]. Ezen szabály szerint a brazil dió referenciaanyag megfelelő homogenitást mutat, bár érdemes megjegyezni, hogy az összes Se értékeket tekintve az átfedés meglehetősen szűk; ebből következően egy esetleges következő gyártási folyamat során célszerű lesz a

szemcseméretet egy további szítálási fokozattal 90 µm alá csökkenteni, ill. a 150 mg-os bemérést a növényi eredetű referenciaanyagoknál javasolt elv szerint 250 mg-ra emelni [KORHAMMER 2000].

CRM-ek esetében a gyártók egy része a hitelesítési paramétereken túl megadja a minimális bemérendő mintamennyiséget is, azt a tömeget, amelynek elemzése esetén a bizonylatolt értékek az adott megbízhatósági (leggyakrabban 95%-os) szinten még teljesülnek. Ehhez olyan mérőrendszerrel kell elvégezni a CRM mérését, amely egyrészt lehetővé teszi nagyon kis (< 1 mg) mintamennyiségek mintaelőkészítés nélküli elemzését, másrészt a magában a mérési folyamatban rejlő bizonytalanság elég kicsi ahhoz, hogy a mérés teljes bizonytalanságát főleg a minta inhomogenitásából fakadó tényező határozza meg [PAUWELS 1993]. Erre a célra a közvetlen szilárd mintás AAS vagy INAA módszerek felelnek meg – azonban mindkét eljárás csupán az összes elemtartalom meghatározására alkalmas, módosulatanalitikai mérésekre nem. A 2003 májusáig ismertetett módosulatanalitikai szakirodalom nem is említ 100 mg-nál kisebb beméréseket, mivel a ma ismert mérési összeállítások kizárólag oldatba vitellel (és az azzal minden esetben együtt járó hígulás miatt igényelt, legalább néhány száz mg mintából) képesek mennyiségileg is meghatározni a vizsgált módosulatokat. Így módosulatanalitikai referenciaanyagoknál csak áttételesen, az összes elemtartalom alapján lehet következtetést levonni a minimális bemérendő mennyiségről – és mindezt kizárólag akkor, ha egyetlen módosulat képezi az adott minta teljes módosulatspektrumát, hiszen az összes elemtartalomra megállapított homogenitás származhat a módosulatokra nézve lokálisan inhomogén eloszlásból is. Mérési eredményeink alapján nem zárható ki, hogy a brazil dió Se-tartalma csak SeMet-ből áll, így elvileg megállapítható lenne a minimálisan bemérendő mintamennyiség – azonban az említett, szilárd mintás módszerek nem álltak rendelkezésünkre.

A homogenitásvizsgálat adatait érdemes még egy további elemzésnek is alávetni, amely során a tárolási egységek közötti (in)homogenitási érték vizsgálata nyújthat értékes többlet-információt. A 9. Melléklet 1. táblázatában feltüntetett, 9 tárolási egységből származó átlagok szórásnégyzete ( $u_{c(K)}$ ) 2 részből, a tárolási egységek közötti inhomogenitás ( $s_K$ ) és a mérési eljárás szórás-négyzete ( $s_{mérés}$ ) által okozott bizonytalansági tényezőkből áll össze; az utóbbi pedig az analitikai (másképpen: a módszerben rejlő változékonyság által okozott) szórásnégyzetet és a tárolási egységen belüli inhomogenitást foglalja magába [PAUWELS 2000, VAN DER VEEN 2001]:

$$s_{mérés}^2 = (s_{módszer}^2 / n) + s_B^2$$

ahol  $n$  az egy tárolási egységből elvégzett mérések száma a tárolási egységek közötti inhomogenitás megállapításánál,  $s_B$  pedig a tárolási egységen belüli inhomogenitás.

Mivel a tárolási egységen belüli inhomogenitás nem képezi részét a referenciaanyagok összesített bizonytalanságának,  $s_B^2=0$  értékűnek vehetjük akkor, ha a homogenitásvizsgálat során mind a tárolási egységek közötti, mind pedig a tárolási egységen belüli elemzéseket azonos mintabeméréssel hajtottuk végre, hiszen így a referenciaanyag belső inhomogenitása azonos mértékben járul hozzá mindkét érték mérési bizonytalanságához. A dió vizsgálatánál minden esetben ugyanazt a módszert, ugyanakkora mintabeméréssel alkalmaztuk akkor, amikor 9



fiolából egy mérésrel  $u_{c(K)}$ -t becsültük, ill. amikor egy fiolából 9 párhuzamos mérést hajtottunk végre; így  $n=1$  és  $s_K$  értékét a következőképpen közelíthetjük [PAUWELS 1998]:

$$s^2_K = u^2_{c(K)} - s^2_{\text{mérés}} = u^2_{c(K)} - s^2_{\text{módszer}}$$

A tárolási egységek közötti mérések szórásából  $u_{c(K)}$ -t, míg az egy tárolási egységen belüliekből  $s_{\text{módszer}}$ -t számolhatjuk ki; így az összes szeléntartalomnál az  $s_K$  átlagra vetítve 3,40%-nak, SeMet esetében pedig 3,34%-nak adódik (ld. 9. Melléklet 2. táblázata). Ezekből több, részben egymásra épülő következtetést vonhatunk le:

1., Mivel a két vizsgált összetételi paramétert, tehát a dióminta összes szeléntartalmát és a SeMet mennyiségét eltérő módszeres/véletlen hibákkal terhelt, egymástól szinte független mérési eljárások (ICP-OES és AC-HPLC-UV-HG-AFS) segítségével állapítottuk meg, a közel azonos inhomogenitási értékek szerint a két meghatározandó komponens inhomogenitása azonos mértékben járul hozzá a referenciaanyag teljes bizonytalanságához. Más megfogalmazásban ezt azt jelenti, hogy a két komponens azonos eloszlású a referenciaanyagban.

2., Az összes Se-tartalom és a SeMet hasonló eloszlása – bár csak szükséges, de nem elégséges módon – közvetetten hozzájárul ahhoz, hogy a minta módosulatanalitikai méréseinél két független elválasztási módszerrel biztosított, SeMet-ra vonatkozó kromatográfias csúcstisztaságot igazolni lássuk, hiszen az esetleg jelentősen eltérő inhomogenitási értékek mögött egy vagy több, a SeMet-nal együttesen eluálódó Se-módsulat jelenléte is állhatott volna. Nagy biztonsággal azt jelenthetjük ki, hogy a SeMet módosulatanalitikai kalibrációs egyenesének meredekségétől jelentősen eltérő meredekségű kalibrációs egyenessel rendelkező, SeMet-nal együtt eluálódó Se-módsulat nem volt jelen az enzimes mintaelőkészítéssel kapott mintaoldatokban. Az utóbbi esetben ugyanis az összes Se-tartalom inhomogenitásához (vagy másképp fogalmazva: a nagy megbízhatóságú összes Se-tartalom értékekhez) képest valószínűleg jóval nagyobb SeMet-inhomogenitást (másképpen: mindkét kromatográfias rendszer esetén kis megbízhatóságú SeMet-értékeket) rögzíthettünk volna.

3., A módosulatanalitikai mérések teljes bizonytalanságához a módszer által okozott szórás (5,20%) nagyobb mértékben járul hozzá, mint a minta inhomogenitása, míg az összes szeléntartalom esetén fordított a helyzet. Ebből következik, hogy bár a korábban említett további szemcseméret-csökkentés valószínűleg javítaná a mérések megbízhatóságát, elsődlegesen magát a HPLC mérés technikát érdemes megvizsgálni a módszerben rejlő, mintától független szórás mérséklése céljából.

#### **4.4.9. A stabilitásvizsgálat eredményeinek bemutatása és értékelése**

A módosulatanalitikai referenciaanyag stabilitása nyilvánvalóan magasabb szintű minőségi követelményeket támaszt (a készítés során) és sugall is (a felhasználás közben) a „csupán” összes elemtartalomra megadott-hitelesített referenciaanyagokhoz képest, hiszen az utóbbi anyagban tárolás közben kialakuló esetleges módosulátváltozás csak ritkán (rendszerint illékony módosulatok létrejöttékor) járhat együtt a vizsgált – s így kimutatható – paraméter, pl. összes elemtartalom csökkenésével. Hasonló elvek alapján a több módosulatot egyenként is jelentős mennyiségben hordozó referenciaanyag stabilitását nem célszerű csak a módosulatok egy részére

vizsgálni, hiszen az egyik, éppen tanulmányozott módosulat állandónak vélt értéke származhat egy nem vizsgált módosulat átalakulásából is – gyakori példaként a Se(VI) - Se(IV) közti redox egyensúlyt lehet említeni – illetve az ún. műtermék jelenség is felléphet, amely a detektor nem kielégítő mértékű szelektivitása miatt következhet be.

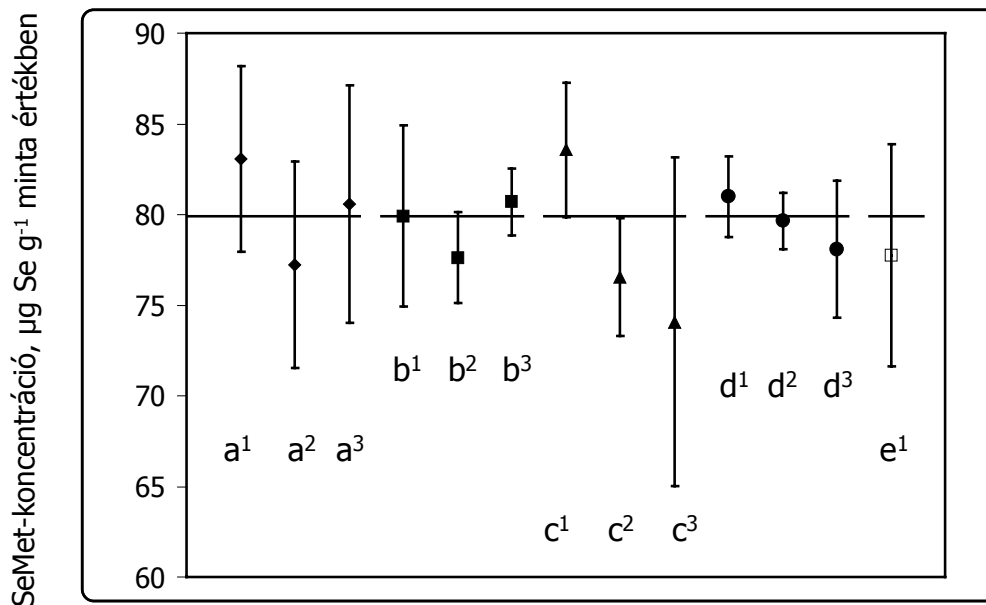
A brazil dió esetében az egyetlen valóban mennyiségileg meghatározható módosulat, a SeMet egyértelmű túlsúlya miatt nem merült fel az utóbb felvetett lehetőség, amelyet a rendelkezésre álló, eltérő elválasztási elveket használó kromatográfias módszerek még inkább valószínűtlenné tettek. Ugyanakkor a HPLC mérések sajnálatos jellegzetességei közé tartozik, hogy az oszlopok és reagensek viszonylag sűrűn mennek keresztül elhasználódásból-eltömődésből ill. új szállítási tételek felhasználásából adódó cseréken és finom összetételi változásokon. Az olykor végletekig optimalizált elválasztási körülmények ilyenkor újbóli összehangoláson esnek át, amely folyamat a korábbi körülmények nem teljesen azonos együtteséhez vezethet. Ebből fakadóan a stabilitási vizsgálatok során célszerű olyan vizsgálati elvet kialakítani, amely figyelembe tudja venni ezen változásokat is, és képes elkülöníteni egymástól a mérőrendszer eltéréseiből és a tényleges módosulatátalakulásból származó, esetleg instabilitási értékben testet öltő folyamatokat. A mi esetünkben a két fő stabilitásvizsgálati elv, a hagyományos (hónapról hónapra elemző) és az izokrón (egy időpontban elemző) ötvözése garantálta a helyes értékek megállapítását (7. ábra): mindkét elv alapján meghatároztuk a sorra kerülő fiolák SeMet-tartalmát, és a mért értékeket az ábrán vízszintes vonallal jelölt, az anioncserélő oszlopon végzett méréssorozat elfogadott átlagával együtt tüntettük fel.

Az értékelés során többféle statisztikai eljárás együttes felhasználására van szükség, amelyeket – biológiai mintákról lévén szó – 95%-os megbízhatósági szint mellett érdemes elvégezni. Grafikai kiértékelést alkalmazva az átlagértékek  $\pm 1$  szórással kiegészített tartományának legalább érintenie kell az elfogadott értéket – bár ez minden átlag esetén érvényesül, látható, hogy nem egy esetben (főként a szobahőmérsékleten tárolt mintáknál) a mérés viszonylag nagy szórása teszi lehetővé a megfelelést. Az eredmények egytényezős varianciaanalízise nem mutat szignifikáns eltérést az átlagok között. A páronként elvégzett t- és Welch-próbák szerint azonban a szobahőmérsékleten tárolt minták átlagai különböznek a többi átlag jelentős részétől, míg a mélyhűtőben (-18°C) és a hagyományos hűtőben (+4°C) tárolt minták sem egymástól, sem saját csoportjukon belül, sem pedig az izokrón elv alapján tárolt-mért társaiktól sem mutatnak szignifikáns eltérést. Mindez azt jelenti, hogy a három hónapi tárolás során a végig +24°C fokon lévő mintákban a SeMet stabilitása megkérdőjelezhető, bár bizonyos kiértékelési szabályok alapján még nem lépi túl az instabilitási határértéket; ugyanakkor az összes többi minta kielégítő stabilitással rendelkezik.

A referenciaanyagok tárolóedényzete a valódi gyakorlati felhasználás során számos, akár több tucat nyitási-zárási folyamaton esik át, mivel a rendszerint 15-20 grammos edényenkénti tömegből mintatípustól függően 200-500 mg anyag kerül kimérésre. Minden egyes nyitáskor a referenciaanyag érintkezik a külső levegővel, amelyből oxigént és nedvességet vehet fel. Amennyiben a készítmény vízaktivitása túl kicsi ( $a_w < 0,15$ ), úgy egyrészt autooxidáció indulhat meg, másrészt a kinyitást követő gyors vízfelvétel és a higroszkópos anyagokra jellemző

összetapadás jelensége következhet be [LINSINGER 2001]. Az átlagos szemcseméret-növekedés magában még nem tesz feltétlenül kárt a referenciaanyag minőségében, azonban az esetleg 0,4-0,5 körüli szintre emelkedő vízakktivitás már teret biztosíthat bizonyos enzimes és nem enzimes degradációs folyamatoknak ill. ha  $a_w > 0,42$ , akkor – szélsőséges esetben – már xerofil baktériumok szaporodhatnak el,  $a_w=0,61$ -nél pedig penészek jelenhetnek meg. Mindez azt jelenti, hogy a stabilitási méréseken túl – melyek fiolánként olykor még tíz nyitási-zárási együttes műveletet sem igényelnek – a minta vízakktivitásának mérése (beállítása) lényeges részét képezi a referenciaanyag stabilitásának és gyakorlati felhasználhatóságának megállapításánál.

A brazil dióból készített referenciaanyag 23°C hőmérsékleten megállapított vízakktivitása  $a_w=0,36$ -nak adódott, amely a fenti adatok tükrében ideálisnak tekinthető, így a korábban ismertetett stabilitásvizsgálatok eredményein túl egy további, fontos gyakorlati paraméter megfelelő értéke is igazolja a készítmény használhatóságát.



7. Ábra. A brazil dióból készített, Se-módszertanalitikai referenciaanyag-jelölt készítmény stabilitásvizsgálatának eredménye. Az ábrán az anioncserélő kromatográfiai rendszerrel meghatározott SeMet-koncentráció (mint  $\mu\text{g Se g}^{-1}$ ) került feltüntetésre. A jelölő betűk magyarázata (a 6. ábrával összhangban): (a)  $-18^\circ\text{C}$ , (b)  $+4^\circ\text{C}$ , (c)  $+24^\circ\text{C}$ , (d) izokróon vizsgálatok, (e) besugárzási kontroll minta; a betűk felső indexei a tárolási időtartam hosszára (1-2-3 hónap) utalnak. A hibajelölő sávok  $\pm 1$  szórásra utalnak. A vízszintes vonalak a SeMet kijelölt középértékére ( $79,9 \mu\text{g g}^{-1}$ , mint Se) utalnak.

#### 4.4.10. A brazil dió alapú, Se-módszertanalitikai referenciaanyag készítése során elért új tudományos eredmények

Megállapítottam, hogy a kiemelkedő (71 m/m %-os) zsírtartalmú brazil diót szerves oldószerrel végrehajtott, folyadék-szilárd extrakció segítségével zsírtalanítani lehet úgy, hogy a minta szeléntartalma számottevő mértékben nem csökken.

Elkészítettem a Se-módszertanalitika első laboratóriumi referenciaanyagát, amelyhez a zsírtalanított brazil dió készítmény megfelelő alapul szolgált, mivel (a) minőségi és mennyiségi

meghatározásra egyaránt alkalmas mértékben tartalmaz SeMet-t, amely napjaink egyik leginkább tanulmányozott szelénmódosulata, tehát a referenciaanyag készítése valós igényre épül; (b) könnyen, kellő finomságúra őrölhető és jól homogenizálható, amelyet az összes Se és SeMet homogenitásvizsgálata igazol; (c) a SeMet-tartalom kielégítő mértékben stabil maradt mind a  $\gamma$ -besugárzás, mind pedig a különböző hőmérsékletű tárolás során; (d) a Se-módosulatanalitikában legtöbbször alkalmazott, egylépéses enzimes kezeléssel az elkészített referenciaanyag közel 100%-os határfokkal tárható fel, nagy megbízhatóságú mintaelőkészítést téve lehetővé.

#### **4.4.11. A brazil dióval végzett kísérletek lezárása és utószó**

A bemutatott eredmények alapján a brazil dióból készült referenciaanyag alkalmasnak bizonyult arra, hogy nagyobb léptékben, meghosszabbított tárolási-stabilitási vizsgálatok után SeMet módosulatanalitikai LRM, vagy akár CRM készülhessen belőle. A dió korábbról ismert biokémiai és táplálkozás-élettani tulajdonságai háttérben sejtett nagy SeMet-tartalom a közvetlenül, HPLC segítségével végzett módosulatazonosítást közvetett bizonyítékokkal egészíti ki, így a téves azonosítás lehetősége gyakorlatilag kizárt.

A brazil dióból készített referenciaanyag – amellet, hogy a szakirodalom alapján valószínűleg a világ első szelén-módosulatanalitikai LRM-je – még számos járulékos előnnyel is bír:

1., A benne minőségileg és mennyiségileg meghatározott Se-módosulat standard vegyülete bárki számára könnyen elérhető a vegyszergyártók kínálatában, és azonosítása a hagyományos kromatográfiai elvek használatával, viszonylag olcsó műszerezettséggel megoldható; nincs tehát szükség ESI-MS vagy MALDI-TOFMS készülékekre.

2., Bár hazánkban a brazil dió csonthéjas állapotban még nem kapható, valószínűleg hamarosan megjelenik ilyen formában is a boltok polcain. Mindez azért lényeges, mert a különböző eredetű diók keverésével a kialakuló referenciaanyag összes Se- és SeMet-tartalma bizonyos korlátok közt, de szabadon beállítható lesz, az 1-2  $\mu\text{g g}^{-1}$  értéktől a 100-120  $\mu\text{g g}^{-1}$  gyakorlati felső határig. Ezáltal ez lehet az első olyan, nem mesterséges körülmények között előállított, módosulatanalitikai referenciaanyag, melynek egyszerűen, az alapanyagok keverésével, akár három nagyságrenden keresztül előre lehet szabályozni a vizsgálandó módosulat kívánt koncentrációját úgy, hogy közben a mátrix összetétele változatlan marad.

Érdemes néhány szót ejteni munkánk nemzetközi helyzetéről és visszhangjáról is. A 2001 telén indult kísérletek néhány hónap eltéréssel ugyan, de egymástól függetlenül, szinte fej-fej mellett haladtak Caruso professzor (Cincinnati, USA) csoportjának munkájával. A részben eltérő mintaelőkészítési elvekből fakadó eredmények és a teljesen más kategóriájú műszerezettség miatt az amerikai csoport a hangsúlyt az ESI-MS azonosításra és a kinyerési-azonosítási határfok növelésére helyezte, és közleményeikben is ezeket a területeket emelték ki [KANNAMKUMARATH 2002, VONDERHEIDE 2002, WROBEL 2003]. A mi esetünkben a referenciaanyag kialakítása szerepelt az első helyen, és munkákat a 2003. évi European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry konferenciadíjas posztere [BODÓ 2003a] és két közlemény [STEFÁNKA 2003b, BODÓ 2003b] dicséri.

## 5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

PhD értekezésem új tudományos eredményeit négy fő csoportba sorolom, melyek egyúttal a négy vizsgált témakör összefoglalásaként is értelmezhetőek.

### 1., Az arzéntartalmú alga- és halminták enzimes mintaelőkészítésének kritikai vizsgálata során elért új tudományos eredmények

Arzénnel dúsított algaminta vizsgálatával igazoltam, hogy sejtfalbontó (drizeláz) enzimes kezeléssel szignifikáns mértékben növelni lehet mind az összes arzén, mind pedig az As-módosulatok kinyerését.

Többváltozós statisztikai módszer (RSM) segítségével igazoltam, hogy természetes (nem dúsított) As-tartalmú halminta módosulatanalitikai mintaelőkészítése során fehérjebontó enzimmel (tripszinnel) végzett kezeléssel nem lehetett szignifikánsan nagyobb As-kinyerési hatásfokot elérni az enzimet nem alkalmazó módszerek használatához képest.

### 2., A szelénrel dúsított élesztőminták vizsgálata során elért új tudományos eredmények

Megállapítottam, hogy az üzemi fermentációval előállított, többek között szárítással stabilizált és a szemcseméretet tekintve az általános LRM követelményeknek megfelelő Se-dúsított élesztő nem szubsztrátspecifikus fehérjebontó enzimmel végrehajtott módosulatanalitikai mintaelőkészítésénél a sejtfal- ill. lipidbontó enzimek használata szignifikánsan nem növelte a Se-kinyerési hatásfokot.

Se-dúsított élesztőn végzett, egy lépéses enzimes módosulatanalitikai mintaelőkészítés segítségével összehasonlítottam a szakirodalomban legtöbbször jegyzett fehérjebontó enzimkeveréket (XIV-es típusú proteáz; Sigma) az ugyanazon fonalas baktérium által előállított, eltérő tulajdonságokkal bíró pronáz enzimmel (Merck). Az elvégzett statisztikai elemzés alapján megállapítottam, hogy a két enzimmel elérhető kinyerési hatásfok szignifikáns mértékben különbözik: a Merck-féle enzim használatával nagyobb mennyiségű szelén extrahálható.

### 3/a., Új tudományos eredmények a szelénsóval kiegészített komposzton termesztett, Se-dúsított gomba módosulatanalitikai vizsgálatához kapcsolódóan

Elsőként alakítottam ki egy olyan szekvenciális enzimes módosulatanalitikai mintaelőkészítési eljárást, amelynek segítségével a szelénsóval kiegészített komposzton termesztett gomba szeléntartalma 75%-ban kinyerhetővé vált.

Adalékolással és az azt követő szekvenciális enzimes módosulatanalitikai mintaelőkészítéssel igazoltam, hogy a Se-módosulatok egy része nem az elméletileg várható módon (jelen esetben vizes extrakcióval) nyerhető vissza a mintából: a fehérjemátrix bontása szükséges az adalékolt mennyiség oldatba viteléhez. Adalékolási eljárás segítségével közvetett módon bizonyítottam, hogy a módosulatanalitikai mérések során azonosított Se-módosulatok közül legalább az egyik, a Se(IV) mennyiségi meghatározása valódi értékre vezetett.

### 3/b., Új tudományos eredmények a Se-tartalmú élesztővel kiegészített kompoziton természetett, Se-dúsított gomba módosulatanalitikai vizsgálatához kapcsolódóan

Megállapítottam, hogy a többlépéses, sejtfalbontó enzimes kezelést is tartalmazó mintaelőkészítési módszerrel szignifikánsan nagyobb kinyerési hatásfokot lehet elérni a csupán fehérjebontó enzimre építő vagy pufferelt közegű extrakciókhoz képest, még abban az esetben is, amikor a sejtfalbontó enzimkeverék fehérjebontó aktivitását szelektíven gátoltam. Két különböző inhibitor vegyület alkalmazásával, statisztikai kiértékelés segítségével igazoltam, a sejtfalbontás során valóban lejátszódott fehérjebontás; mindez azt jelenti, hogy a fehérjebontás gátlásával megkülönböztethetővé tettem a sejtfalbontás szelénkinyerésre gyakorolt hatását.

A „lysing” enzim használatával más módszerekkel nem kinyerhető Se-módosulatot tettem hozzáférhetővé a fehérjebontó kezelés számára. Ez a módosulat a HPLC-vizsgálatok segítségével (retenciós idő alapján) végrehajtott azonosítás során SeCys<sub>2</sub>-nek bizonyult.

### 4., A brazil dió alapú, Se-módosulatanalitikai referenciaanyag készítése során elért új tudományos eredmények

Megállapítottam, hogy a kiemelkedő (71 m/m %-os) zsírtartalmú brazil diót szerves oldószerrel végrehajtott, folyadék-szilárd extrakció segítségével zsírtalanítani lehet úgy, hogy a minta szeléntartalma számottevő mértékben nem csökken.

Elkészítettem a Se-módosulatanalitika első laboratóriumi referenciaanyagát, amelyhez a zsírtalanított brazil dió készítmény megfelelő alapul szolgált, mivel (a) minőségi és mennyiségi meghatározásra egyaránt alkalmas mértékben tartalmaz SeMet-t, amely napjaink egyik leginkább tanulmányozott szelénmódosulata, tehát a referenciaanyag készítése valós igényre épül; (b) könnyen, kellő finomságúra őrölhető és jól homogenizálható, amelyet az összes Se és SeMet homogenitásvizsgálata igazol; (c) a SeMet-tartalom kielégítő mértékben stabil maradt mind a  $\gamma$ -besugárzás, mind pedig a különböző hőmérsékletű tárolás során; (d) a Se-módosulatanalitikában legtöbbször alkalmazott, egylépéses enzimes kezeléssel az elkészített referenciaanyag közel 100%-os hatásfokkal tárható fel, nagy megbízhatóságú mintaelőkészítést téve lehetővé.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Célkitűzéseimben megfogalmazott tevékenységi területem alapvetően két vizsgálati irányvonalban öltött testet: egyrészt a Se- és As-módosulatanalitika enzimes mintaelőkészítésének kiterjeszhetőségét, fejlesztettségét helyeztem a középpontba, valódi mintákkal történő kísérletek révén; másrészt megvizsgáltam annak a lehetőségét, hogy a rendelkezésre álló laboratóriumi körülmények között létrehozható-e Se-módosulatanalitikai referenciaanyag (LRM).

Az első témakör számos, különböző típusú – mesterségesen ill. természetes módon – szelénnel vagy arzénnel dúsított minta elemzésén vezetett keresztül. Alga és tengeri hal (arzén) ill. élesztő és csiperkegomba (szelén) vizsgálata során enzimes mintaelőkészítési módszerek alkalmasságát vettem össze, és egyedi ill. szekvenciális eljárásokat dolgoztam ki, hogy részben statisztikai, másrészt módosulatanalitikai mérések alapjain nyugvó kiértékelés segítségével eldönthessem, jár-e valamilyen előnnyel ezen eljárások használata az adott területen elterjedtnek számító alapmódszerekhez képest. Eredményeim azt mutatták, hogy növényi eredetű minták esetén az As-módosulatanalitikai mintaelőkészítés kialakítása során érdemes figyelembe venni a sejtfalbontó enzimek használatát, mivel szignifikáns mértékben javíthatják a kinyerési hatásfokot. Ezzel ellentétben az arzéntartalmú tengeri halminta elemzése annak a ténynek a megállapításához vezetett, hogy az enzimes mintaelőkészítés alkalmazása nem jár előnnyel a jóval egyszerűbb, csupán pufferes közeget igénylő hagyományos módszerhez képest.

A szeléntartalmú minták vizsgálata során tapasztaltak tágabb teret nyújtanak az enzimes mintaelőkészítés számára. Az általam kidolgozott szekvenciális eljárás, mely sejtfalbontó és / vagy fehérjebontó enzimek egymást követő használatára épít, bizonyos mintatípusoknál a mintaelőkészítés kinyerési hatásfokát növelte meg, míg más esetekben a hagyományos (egylépéses enzimes) módszerekhez képest új módosulatanalitikai információkhoz vezetett.

A célkitűzés kérdéseire a következőképpen lehet felelni: (a) az enzimes mintaelőkészítés az As-módosulatanalitikában korlátozott mértékben, csupán bizonyos /bár nem elhanyagolható/ mintacsoportok esetében mutat fel egyértelmű előnyöket; (b) Se-módosulatanalitika területén azonban életképes és fejlesztésre érdemes módszernek tekinthető – egy ilyen fejlesztési irányvonalat jelent az általam kidolgozott, többféle enzim szekvenciális alkalmazására építő eljárás is; (c) bár egyre több „minta + mintaelőkészítés” összerendelést tudunk kialakítani eddigi ismereteink alapján, Se-módosulatanalitikában a korábban még nem vizsgált minták elemzéséhez még mindig célszerű általános, széleskörű mintaelőkészítési megközelítést alkalmazni a hagyományos eljárások helyett – ugyanakkor As-módosulatanalitika esetén ezzel ellentétben, az egyszerű és elterjedtebb (nem enzimes) mintaelőkészítési módszerek használatára érdemes hangsúlyt fektetni.

A célkitűzés második témakörének kérdésére jóval egyértelműbb válasz adható: igen – az általános laboratóriumi felszereltséggel elő lehet állítani módosulatanalitikai referenciaanyagot. Természetes szeléntartalmú (brazil dió) alapanyagból az általános LRM előírásoknak megfelelő, stabil, könnyen kezelhető és elemezhető referenciaanyagot állítottam elő, amely az általános minőségbiztosítási célokra túl alapul szolgálhat egy későbbi CRM kialakításához is.

## SUMMARY

My scientific activity carried out in the frame of PhD formation was focused on two directions: on one hand, I studied the extensibility and development of enzymatic sample preparation in the fields of As- and Se-speciation by analysing real samples; on the other hand, I evaluated the possibility of preparing LRMs under usual laboratory circumstances for Se-speciation analyses.

The first subject led through the analysis of several – artificial or natural Se- and As-enriched – samples of different origin. I compared and developed single and sequential enzymatic sample preparation methods through the study of algae and marine fish samples (for As) & yeast and agaric samples (for Se) on the basis of statistical and speciation evaluation in order to assess if any of these methods possess significant advantages over the usually applied basic techniques. According to the results of the study, when designing the speciation sample preparation of samples of plant origin it is worth taking into consideration the use of cell wall degrading enzymes capable to significantly increase extraction efficiency. In contradistinction to plant samples, the analysis of marine fish arrived at a conclusion that there was no point in replacing simple (usually buffered only) methods with the application of enzymatic ones.

My experiences on the field of selenised samples reveal greater possibilities for the use of enzymatic sample preparation. I developed a sequential method addressing the succeeding use of cell wall degrading and/or proteolytic enzymes, which proved to be capable either to increase extraction efficiency or to provide additional speciation information over usual (one-step) methods, depending on the given samples to analyse.

The questions of the relevant parts of my scientific targets presented at the beginning of this thesis can be answered as follows: (a) the enzymatic sample preparation applied in the field of As-speciation shows obvious advantages only in the case of special, however not neglectable, group of samples; (b) the enzymatic sample preparation applied in the field of Se-speciation proved to be a really viable technique worth developing, hopefully according to the method I set up by sequentially applying several different enzymes; (c) however more and more combination of adequate “sample & sample preparation” twins can be set up according to our knowledge, Se-speciation still requires an open-minded and large sample preparation approach instead of applying usual techniques, especially when facing samples never analysed before; on the other hand, it seems there is no universal need to change the well-established sample preparation techniques of As-speciation for enzymatic methods – possibly except for plant samples.

It is much easier to answer the question set in the second part of the introduction: yes, it is – usual labware is just enough to produce LRMs for speciation analytical purposes. Natural Se-enriched raw material (from Brazil nuts) can serve as a base for the production of a reference material easy to handle and to analyse along with fulfilling the common requirements of RMs. This candidate LRM may become a future CRM and may be integrated into the regular quality control routine procedures of Se-speciation analyses.



## 1. MELLÉKLET (IRODALOMJEGYZÉK)

- ABOU-SHAKRA F. R., RAYMAN M. P., WARD N. I., HOTTON V., BASTIAN G. (1997): Enzymatic digestion for the determination of trace elements in blood serum by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12, 429–433. p.
- ACKLEY K. L., B'HYMER C., SUTTON K. L., CARUSO J. A. (1999): Speciation of arsenic in fish tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14, 845–850. p.
- ALBERTI J., RUBIO R., RAURET G. (1995): Extraction method for arsenic speciation in marine organisms. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 351 (4-5) 420–425. p.
- ALSING PEDERSEN G., LARSEN E. H. (1997): Speciation of four selenium compounds using high performance liquid chromatography with on-line detection by inductively coupled plasma mass spectrometry or flame atomic absorption spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 358, 591–598. p.
- BEAUCHEMIN D., BEDNAS M. E., BERMAN S. S., MCLAREN J. W., SIU K. W. M., STURGEON R. E. (1988): Identification and quantitation of arsenic species in a dogfish muscle reference material for trace-elements. *Analytical Chemistry*, 60 (20) 2209–2212. p.
- BECKER-ROSS H., FLOREK S., HEITMANN U. (2000): Observation, identification and correction of structured molecular background by means of continuum source AAS-determination of selenium and arsenic in human urine. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15, 137–141. p.
- BEHNE D., HAMMEL C., PFEIFER H., RÖTHLEIN D., GESSNER H., KYRIAKOPOULOS A. (1998): Speciation of selenium in the mammalian organism. *The Analyst*, 123, 871–873. p.
- BERMEJO-BARRERA P., FERNÁNDEZ-NOCELO S., MOREDA-PIÑEIRO A., BERMEJO-BARRERA A. (1999): Usefulness of enzymatic hydrolysis procedures based on the use of pronase E as sample pre-treatment for multi-element determination in biological materials. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14, 1893–1900. p.
- BESSER J. M., CANFIELD T. J., LA POINT T. W. (1993): Bioaccumulation of organic and inorganic selenium in a laboratory food chain. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 57–72. p.
- B'HYMER C., CARUSO J. A. (2000): Evaluation of yeast-based selenium food supplements using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15, 1531–1539. p.
- BIRD S. M., UDEN P. C., TYSON J. F., BLOCK E., DENOYER E. (1997): Speciation of selenoamino acids and organoselenium compounds in selenium-enriched yeast using high-performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12, 785–788. p.
- BLOCK E., BIRINGER M., JIANG W., NAKAHODO T., THOMPSON H. J., TOSCANO P. J., UZAR H., ZHANG X., ZHU Z. (2001): *Allium* chemistry: synthesis, natural occurrence, biological activity, and chemistry of Se-alk(en)ylselenocysteines and their  $\gamma$ -glutamyl derivatives and oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 458–470. p.
- BODÓ E. T., DERNOVICS M., STEFÁNKA Z., FODOR P. (2003a): Preparation of a laboratory reference material (LRM) for selenium speciation. Konferenciadíjas poszterelőadás a 2003. évi „European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry” konferencián, Garmisch-Partenkirchen, Németország, 2003.01.12–17.
- BODÓ E. T., STEFÁNKA Z., IPOLYI I., SÖRÖS C., DERNOVICS M., FODOR P. (2003b): Preparation, homogeneity and stability studies of a candidate LRM for Se speciation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (in press)
- BÓDOG I., POLYÁK K., HLAVAY J. (1997): Determination of heavy metals in lake and river sediments by selective leaching. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 66, 79–94. p.
- BOWEN H. J. M. (1966): A standard biological material for elementary analysis. 1–7. p. In: SHALLIS P. W. (Szerk.): *Proceedings of the SAC Conference, Nottingham 1965*. Cambridge: Heffers.
- BÖRZSÖNYI M., BEREZKY A., RUDNAI P., CSANÁDY M., HORVÁTH A. (1992): Epidemiologic studies on human-subjects exposed to arsenic in drinking-water in southeast Hungary. *Archives of Toxicology*, 66 (1) 77–78. p.
- BRAMAN R. S., FOREBACK C. C. (1973): Methylated forms of arsenic in the environment. *Science*, 182 (118) 1247–1249. p.
- BRANCH S., EBDON L., O'NEILL P. (1994): Determination of arsenic species in fish by directly coupled high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 9, 33–37. p.
- BRANDHUBER P., AMY G. (1998): Alternative methods for membrane filtration of arsenic from drinking water. *Desalination*, 117, 1–10. p.
- BROOKE P. J., EVANS W. H. (1981): Determination of total inorganic arsenic in fish, shellfish and fish products. *The Analyst*, 106 (1262) 514–520. p.
- CALOMME M. R., VAN DEN BRANDEN K., VANDEN BERGHE D. A. (1995a): Selenium and *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 331–340. p.
- CALOMME M., HU J., VAN DEN BRANDEN K., VANDEN BERGHE D. A. (1995b): Seleno-lactobacillus – an organic selenium source. *Biological Trace Element Research*, 47, 379–383. p.

- CAO T. H., COONEY R. A., WOZNICHAK M. M., MAY S. W., BROWNER R. F. (2001): Speciation and identification of organoselenium metabolites in human urine using inductively coupled plasma mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 73, 2898–2902. p.
- CARUSO J. A., HEITKEMPER D. T., B'HYMER C. (2001): An evaluation of extraction techniques for arsenic species from freeze-dried apple samples. *The Analyst*, 126, 136–140. p.
- CASES J., WYSOCKA I. A., CAPORICCIO B., JOUY N., BESANÇON P., SZPUNAR J., ROUANET J. (2002): Assessment of selenium bioavailability from high-selenium spirulina subfractions in selenium-deficient rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3867–3873. p.
- CASIOT C., SZPUNAR J., ŁOBINSKI R., POTIN-GAUTIER M. (1999): Sample preparation and HPLC separation approaches to speciation analysis of selenium in yeast by ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14, 645–650. p.
- CAVALLI S., CARDELLICCHIO N. (1995): Direct determination of seleno-amino acids in biological tissues by anion-exchange separation and electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 706, 429–436. p.
- CHANG J. C., GUTENMANN W. H., REID C. M., LISK D. J. (1995): Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. *Chemosphere*, 30 (4) 801–802. p.
- CHANSLER M. W., MUTANEN M., MORRIS V. C., LEVANDER O. A. (1986): Nutritional bioavailability to rats of selenium in Brazil nuts and mushrooms. *Nutrition Research*, 6 (12) 1419–1428. p.
- CHEN C., ZHAO J., ZHANG P., CHAI Z. (2002): Speciation and subcellular location of Se-containing proteins in human liver studied by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and hydride generation-atomic fluorescence spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372, 426–430. p.
- CHEN X. S., YANG G. Q., CHEN J. S., CHEN X. C., WEN Z. M., GE K. Y. (1980): Studies on the relations of selenium and Keshan disease. *Biological Trace Element Research*, 2 (2) 91–107. p.
- CLARK L. C., COMBS G. F., TURNBULL B. W., SLATE E. H., CHALKER D. K., CHOW J., DAVIS L. S., GLOVER R. A., GRAHAM G. F., GROSS E. G., KRONGRAD A., LESHER J. L., PARK H. K., SANDERS B. B., SMITH C. L., TAYLOR J. R. (1996): Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin - a randomized controlled trial. *JAMA-Journal of the American Medical Association*, 276 (24) 1957–1963. p.
- CORNELIS R., CÁMARA C., EBDON L., PITTS L., SPERLING M., MORABITO R., DONARD O. F. X., CREWS H., LARSEN E. H., NEIDHART B., ARIESE F., ROSENBERG E., BERROUIGUET O., MORRISON G. M., CORDIER G., ADAMS F., DERO B., MARSHALL J., STOJANIK B., EKVALL A., QUEVAUVILLER P. (2000): The EU network on trace element speciation in full swing. *Trends in Analytical Chemistry*, 19 (2+3) 210–214. p.
- CORR J. J., LARSEN E. H. (1996): Arsenic speciation by liquid chromatography coupled with ionspray tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 11, 1215–1224. p.
- CREWS H. M., CLARKE P. A., LEWIS D. J., OWEN L. M., STRUTT P. R., IZQUIERDO A. (1996): Investigation of selenium speciation in *in vitro* gastrointestinal extracts of cooked cod by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 11, 1177–1182. p.
- CSABAI Z. (2003): Mintaelőkészítési módszerek fejlesztése szelén speciációhoz. Diplomadolgozat. SZIE-ÉK Alkalmazott Kémia Tanszék.
- DAVEY G. P., RICHARDSON B. C. (1981): Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. *Applied and Environmental Microbiology*, 41 (1) 84–89. p.
- DEAKER M., MAHER W. (1999): Determination of arsenic in arsenic compounds and marine biological tissues using low volume microwave digestion and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14, 1193–1207. p.
- DE BRÄTTER V. E. N., RECKNAGEL S., GAWLIK D. (1995): Speciation of Se, Fe and Zn in human milk whey: the use of instrumental neutron activation analysis (INAA) to corroborate element profiles measured with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 353, 137–142. p.
- DE LA CALLE-GUNTIÑAS M. B., BRUNORI C., SCERBO R., CHIAVARINI S., QUEVAUVILLER P., ADAMS F., MORABITO R. (1997): Determination of selenomethionine in wheat samples: comparison of gas chromatography-microwave-induced plasma atomic emission spectrometry, gas chromatography-flame photometric detection and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12, 1041–1046. p.
- DEMIRCI A., POMETTO III A. L. (1999a): Production of organically bound selenium yeast by continuous fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2491–2495. p.
- DEMIRCI A., POMETTO III A. L., COX D. J. (1999b): Enhanced organically bound selenium yeast production by fed-batch fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2496–2500. p.
- DERNOVICS M., STEFÁNKA Z., FODOR P. (2002): Improving selenium extraction by sequential enzymatic processes for Se-speciation of selenium-enriched *Agaricus bisporus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372, 473–480. p.
- D'ILIO S., ALESSANDRELLI M., CRESTI R., FORTE G., CAROLI S. (2002): Arsenic content of various types of rice as determined by plasmabased techniques. *Microchemical Journal*, 73, 195–201. p.

- D'ULIVO A. (1997): Determination of selenium and tellurium in environmental samples. *The Analyst*, 122, 117R–144R p.
- EDMONDS J. S., FRANCESCONI K. A., CANNON J. R., RASTON C. L., SKELTON B. W., WHITE A. H. (1977): Isolation, crystal-structure and synthesis of arsenobetaine, arsenical constituent of western rock lobster *Panulirus-longipes-cygnus george*. *Tetrahedron Letters*, 18, 1543–1546. p.
- EDWARDS M., PATEL S., MCNEILL L., CHEN H. W., FREY M., EATON A. D., ANTWEILER R. C., TAYLOR H. E. (1998): Considerations in As analysis and speciation. *Journal of American Water Works Association*, 90, 103–113. p.
- (2003): Az egészségügyi, szociális és családügyi miniszter 9/2003. (III. 13.) ESZCSM rendelete az élelmiszerek vegyi szennyezettségének megengedhető mértékéről szóló 17/1999. (VI. 16) EüM rendelet módosításáról. *Magyar Közlöny*, 25, 1960–1967. p.
- EL MOLL A., HEIMBURGER R., LAGARDE F., LEROY M. J. F., MAIER E. (1996): Arsenic speciation in marine organisms: from the analytical methodology to the constitution of reference materials. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 354, 550–556. p.
- ELWAER N., BELZILE N. (1995): Microwave dissolution of lake sediments and mine tailings and determination of arsenic and selenium by atomic absorption spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 61, 189–194. p.
- EMTEBORG H., BORDIN G., RODRIGUEZ A. R. (1998): Speciation of organic and inorganic selenium in a biological certified reference material based on microbore ion-exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma atomic emission spectrometry via a direct injection nebulizer or coupled to electrothermal atomic absorption spectrometry. *The Analyst*, 123, 245–253. p.
- EURACHEM/CITAC GUIDE (2000): Quantifying uncertainty in analytical measurement. II. kiadás. Szerk.: ELLISON S. L. R., ROSSLEIN M., WILLIAMS A. <http://www.eurachem.ul.pt/index.htm>.
- FAIRWEATHER-TAIT S. J. (1999): The importance of trace element speciation in nutritional sciences. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 363, 536–540. p.
- FAN T. W. M., LANE A. N., MARTENS D., HIGASHI R. M. (1998): Synthesis and structure characterization of selenium metabolites. *The Analyst*, 123, 875–884. p.
- FAN T. W. M., TEH S. J., HINTON D. E., HIGASHI R. M. (2002): Selenium biotransformations into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California. *Aquatic Toxicology*, 57, 65–84. p.
- FELDMANN J., LAI V. W. M., CULLEN W. R., MA M. S., LU X. F., LE X. C. (1999): Sample preparation and storage can change arsenic speciation in human urine. *Clinical Chemistry*, 45 (11) 1988–1997. p.
- FRANCESCONI K. A., KHOKIATTIWONG S., GOESSLER W., PEDERSEN S. N., PAVKOV M. (2000): A new arsenobetaine from marine organisms identified by liquid chromatography–mass spectrometry. *Chemical Communications*, 12, 1083–1084. p.
- GALLAGHER P. A., SHOEMAKER J. A., WEI X., BROCKHOFF-SCHWEGEL C. A., CREED J. T. (2001): Extraction and detection of arsenicals in seaweed via accelerated solvent extraction with ion chromatographic separation and ICP-MS detection. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 369, 71–80. p.
- GANONG W. F. (1990): Az orvosi élettan alapjai. Budapest: Medicina. 488 p.
- GILON N., ASTRUC A., ASTRUC M., POTIN-GAUTIER M. (1995): Selenoamino acid speciation using HPLC-ETAAS following an enzymatic-hydrolysis of selenoprotein. *Applied Organometallic Chemistry*, 9 (7) 623–628. p.
- GILON N., POTIN-GAUTIER M., ASTRUC M. (1996): Optimization of the determination of inorganic and organic selenium species using high-performance liquid chromatography-electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 750, 327–334. p.
- GOESSLER W., LINTSCHINGER J., SZÁKOVÁ J., MADER P., KOPECKÝ J., DOUCHA J., IRGOLIC K. J. (1997): *Chlorella* sp. and arsenic compounds: an attempt to prepare an algal reference material for arsenic compounds. *Applied Organometallic Chemistry*, 11, 57–66. p.
- GÓMEZ M. M., GASPARIC T., PALACIOS M. A., CÁMARA C. (1998): Determination of five selenium compounds in urine by liquid chromatography with focused microwave assisted digestion and hydride generation-atomic absorption spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 374, 241–251. p.
- GÓMEZ-ARIZA J. L., CARO DE LA TORRE M. A., GIRÁLDEZ I., SÁNCHEZ-RODAS D., VELASCO A., MORALES E. (2002): Pretreatment procedure for selenium speciation in shellfish using high-performance liquid chromatography-microwave-assisted digestion-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. *Applied Organometallic Chemistry*, 16, 265–270. p.
- GONG Z., LU X., CULLEN W. R., LE X. C. (2001): Unstable trivalent arsenic metabolites, monomethylarsonous acid and dimethylarsonous acid. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16, 1409–1413. p.
- GONG Z., LU X., MA M., WATT C., LE X. C. (2002): Arsenic speciation analysis. *Talanta*, 58, 77–96. p.
- GRAEME K. A., POLLACK C. V. (1998): Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. *The Journal of Emergency Medicine*, 16 (1) 45–56. p.
- HAGMAR L., PERSSON-MOSCHOS M., ÅKESSON B., SCHÜTZ A. (1998): Plasma levels of selenium, selenoprotein P and glutathione peroxidase and their correlation to fish intake and serum levels of thyrotropin and thyroid hormones: a study on Latvian fish consumers. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52, 796–800. p.

- HALL G. E. M., PELCHAT J. C., GAUTHIER G. (1999): Stability of inorganic arsenic(III) and arsenic(V) in water samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14, 205–213. p.
- HANAOKA K., GOESSLER W., OHNO H., IRGOLIC K. J., KAISE T. (2001): Formation of toxic arsenical in roasted muscles of marine animals. *Applied Organometallic Chemistry*, 15 (1) 61–66. p.
- HEITKEMPER D. T., VELA N. P., STEWART K. R., WESTPHAL C. S. (2001): Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16, 299–306. p.
- HELGESEN H., LARSEN E. H. (1998): Bioavailability and speciation of arsenic in carrots grown in contaminated soil. *The Analyst*, 123, 791–796. p.
- HUANG W., ÅKESSON B., SVENSSON B. G., SCHÜTZ A., BURK R. F., SKERFVING S. (1995): Selenoprotein P and glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) in plasma as indices of selenium status in relation to the intake of fish. *British Journal of Nutrition*, 73, 455–461. p.
- HUBER R. E., CRIDDLE R. S. (1967): Comparison of the chemical properties of selenocysteine and selenocystine with their sulfur analogs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 122 (1) 164–173. p.
- IP C., LISK D. J. (1994): Characterization of tissue selenium profiles and anticarcinogenic responses in rats fed natural sources of selenium-rich products. *Carcinogenesis*, 15 (4) 573–576. p.
- IP C., BIRNINGER M., BLOCK E., KOTREBAI M., TYSON J. F., UDEN P. C., LISK D. J. (2000): Chemical speciation influences comparative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2062–2070. p.
- IPOLYI I., STEFÁNKA Z., FODOR P. (2001a): Speciation of Se(IV) and the selenoamino acids by high-performance liquid chromatography–direct hydride generation–atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 435, 367–375. p.
- IPOLYI I., CORNS W., STOCKWELL P., FODOR P. (2001b): Speciation of inorganic selenium and selenoamino acids by an HPLC-UV-HG-AFS system. *Journal of Automated Methods & Management in Chemistry*, 23 (6) 167–172. p.
- IPOLYI I. (2003): Gyakorlati megoldások a speciációs analitika minőségének biztosításához. PhD értekezés. Szent István Egyetem, Alkalmazott Kémia Tanszék.
- ISO/IEC GUIDE 30 (1992): Terms and definitions used in connection with reference materials.
- ITOH K., CHIKUMA M., TANAKA H. (1988): Determination of selenium in sediments by hydride generation atomic-absorption spectrometry - elimination of interferences. *Fresenius Zeitschrift für analytische Chemie*, 330 (7) 600–604. p.
- JAKUBOWSKI N., STUEWER D., KLOCKOW D., THOMAS C., EMONS H. (2001): Speciation of organic selenium compounds using reversed-phase liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. Part III. Application of a sector field instrument with low and high mass resolution for selenium speciation in herring gull eggs. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16, 135–139. p.
- JÓKAI ZS., HEGÓCZKI J., FODOR P. (1998): Stability and optimization of extraction of four arsenic species. *Microchemical Journal*, 59, 117–124. p.
- KANNAMKUMARATH S. S., WROBEL K., WROBEL K., VONDERHEIDE A., CARUSO J. A. (2002): HPLC–ICP–MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373, 454–460. p.
- KIRBY J., MAHER W. (2002): Measurement of water-soluble arsenic species in freeze-dried marine animal tissues by microwave-assisted extraction and HPLC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17, 838–843. p.
- KNUDSEN M. (1925): L'emploi de l'eau normale dans l'océanographie. 4–6. p. In: CONSEIL PERMANENT INTERNATIONAL POUR L'EXPLORATION DE LA MER: *Publications de Circonstance N° 87*. Koppenhága: Andr. Fred. Høst & Fils.
- KOBAYASHI Y., OGRA Y., SUZUKI K. T. (2001): Speciation and metabolism of selenium injected with (82)Se-enriched selenite and selenate in rats. *Journal of Chromatography B*, 760, 73–81. p.
- KOBAYASHI Y., OGRA Y., ISHIWATA K., TAKAYAMA H., AIMI N., SUZUKI K. T. (2002): Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (25) 15932–15936. p.
- KORHAMMER S., HERZIG R., SCHRAMEL P., KUMPULAINEN J., MARKERT B., MUNTAU H., QUEVAUVILLER P. (2000): The preparation of a cabbage reference material for environmental monitoring and food analysis. *Accreditation and Quality Assurance*, 5, 238–242. p.
- KOTREBAI M., BIRNINGER M., TYSON J. F., BLOCK E., UDEN P. C. (1999a): Identification of the principal selenium compounds in selenium-enriched natural sample extracts by ion-pair liquid chromatography with inductively coupled plasma- and electrospray ionization-mass spectrometric detection. *Analytical Communications*, 36, 249–252. p.
- KOTREBAI M., BIRD S. M., TYSON J. F., BLOCK E., UDEN P. C. (1999b): Characterization of selenium species in biological extracts by enhanced ion-pair liquid chromatography with inductively coupled plasma-mass spectrometry and by referenced electrospray ionization-mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 54, 1573–1591. p.

- KOTREBAI M., BIRNINGER M., TYSON J. F., BLOCK E., UDEN P. C. (2000): Selenium speciation in enriched and natural samples by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS with perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents. *The Analyst*, 125, 71–78. p.
- KRAMER K. J. M., KRAMER G. N., MUNTAU H. (2003): Practical manual for the production of laboratory reference materials. Bergen: Mermayde Publications. 2. kiadás: 36–38. p. Hollandia.
- KROLL J., RAWEL H., KROCK R. (1998): Microwave digestion of proteins. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und -forschung*, 207 (3) 202–206. p.
- KRYUKOV G. V., KRYUKOV V. M., GLADYSHEV V. N. (1999): New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (48) 33888–33897. p.
- KUEHNELT D., GOESSLER W., IRGOLIC K. J. (1997): Arsenic compounds in terrestrial organisms I: *Collybia maculata*, *Collybia butyracea* and *Amanita muscaria* from arsenic smelter sites in Austria. *Applied Organometallic Chemistry*, 11, 289–296. p.
- LAGARDE F., AMRAN M. B., LEROY M. J. F., DEMESMAY C., OLLÉ M., LAMOTTE A., MUNTAU H., MICHEL P., THOMAS P., CAROLI S., LARSEN E. H., BONNER P., RAURET G., FOULKES M., HOWARD A., GRIEPINK B., MAIER E. A. (1999): Certification of total arsenic, dimethylarsinic acid and arsenobetaine contents in a tuna fish powder (BCR-CRM 627). *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 363, 18–22. p.
- LAMBERTY A., SCHIMMEL H., PAUWELS J. (1998): The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 360, 359–361. p.
- LAMBLE K. J., HILL S. J. (1996): Arsenic speciation in biological samples by on-line high performance liquid chromatography-microwave digestion-hydride generation-atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 334, 261–270. p.
- LARSEN E. H., PRITZL G., HANSEN S. H. (1993): Speciation of eight arsenic compounds in human urine by high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection using antimonate for internal chromatographic standardization. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 8, 557–563. p.
- LARSEN E. H., PEDERSEN G. A., MCLAREN J. W. (1997): Characterization of National Food Agency shrimp and plaice reference materials for trace elements and arsenic species by atomic and mass spectrometric techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12, 963–968. p.
- LARSEN E. H. (1998a): Method optimization and quality assurance in speciation analysis using high-performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 53, 253–265. p.
- LARSEN E. H., HANSEN M., GÖSSLER W. (1998b): Speciation and health risk considerations of arsenic in the edible mushroom *Laccaria amethystina* collected from contaminated and uncontaminated locations. *Applied Organometallic Chemistry*, 12, 285–291. p.
- LARSEN E. H., HANSEN M., FAN T., VAHL M. (2001): Speciation of selenoamino acids, selenonium ions and inorganic selenium by ion exchange HPLC with mass spectrometric detection and its application to yeast and algae. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16, 1403–1408. p.
- LARSEN E. H. (2002): Személyes közlés.
- LARSEN E. H., SLOTH J., HANSEN M., MOESGAARD S. (2003): Selenium speciation and isotope composition in <sup>77</sup>Se-enriched yeast using gradient elution HPLC separation and ICP-dynamic reaction cell-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18, 310–316. p.
- LE X. C., LI X. F., LAI V., MA M., YALCIN S., FELDMANN J. (1998): Simultaneous speciation of selenium and arsenic using elevated temperature liquid chromatography separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Spectrochimica Acta Part B*, 53, 899–909. p.
- LE X. C., MA M. S., LU X. F., CULLEN W. R., APOSHIAN H. V., ZHENG B. S. (2000): Determination of monomethylarsonous acid, a key arsenic methylation intermediate, in human urine. *Environmental Health Perspectives*, 108 (11) 1015–1018. p.
- LEVANDER O. A., BECK M. A. (1997): Interacting nutritional and infectious etiologies of Keshan disease. Insights from Coxsackie virus B-induced myocarditis in mice deficient in selenium or vitamin E. *Biological Trace Element Research*, 56 (1) 5–21. p.
- LINDEMANN T., PRANGE A., DANNECKER W., NEIDHART B. (2000): Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, urine, fish and soil extracts using HPLC/ICP-MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 368, 214–220. p.
- LINSINGER T. P. J., PAUWELS J., VAN DER VEEN A. M. H., SCHIMMEL H., LAMBERTY A. (2001): Homogeneity and stability of reference materials. *Accreditation and Quality Assurance*, 6, 20–25. p.
- LINTSCHINGER J., SCHRAMMEL P., HATALAK-RAUSCHER A., WENDLER I., MICHALKE B. (1998): A new method for the analysis of arsenic species in urine by using HPLC-ICP-MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 362, 313–318. p.
- LINTSCHINGER J., FUCHS N., MOSER J., KUEHNELT D., GOESSLER W. (2000): Selenium-enriched sprouts. A raw material for fortified cereal-based diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5362–5368. p.
- ŁOBIŃSKI R., EDMONDS J. S., SUZUKI K. T., UDEN P. C. (2000): Species-selective determination of selenium compounds in biological materials. *Pure and Applied Chemistry*, 72 (3) 447–461. p.

- MACKEY L. N., BECK T. A. (1982): Quantitative high-performance liquid-chromatographic determination of sulfur amino-acids in protein hydrolysates. *Journal of Chromatography*, 240 (2) 455–461. p.
- MAHAN D. C., PARRETT N. A. (1997): Evaluating the efficacy of selenium-enriched yeast and sodium selenite on tissue selenium retention and serum glutathione peroxidase activity in grower and finisher swine. *Journal of Animal Science*, 74 (12) 2967–2974. p.
- MAHER W., DEAKER M., JOLLEY D., KRIKOWA F., ROBERTS B. (1997): Selenium occurrence, distribution and speciation in the cockle *Anadara trapezia* and the mullet *Mugil cephalus*. *Applied Organometallic Chemistry*, 11, 313–326. p.
- MAICHIN B., KETTISCH P., KNAPP G. (2000): Investigation of microwave assisted drying of samples and evaporation of aqueous solutions in trace element analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366, 26–29. p.
- MAN E. H., BADA J. L. (1987): Dietary D-amino acids. *Annual Review of Nutrition*, 7, 209–225. p.
- MANDAL B. K., SUZUKI K. T. (2002): Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58, 201–235. p.
- MARTENS D. A., SUAREZ D. L. (1997): Selenium speciation of soil/sediment determined with sequential extractions and hydride generation atomic absorption spectrophotometry. *Environmental Science & Technology*, 31, 133–139. p.
- MARTIN J. L., CUMMINS L. M. (1966): Separate elution of selenocystine and selenomethionine by ion-exchange technique. *Analytical Biochemistry*, 15 (3) 530–532. p.
- MARTÍN C., GÓMEZ M., PALACIOS M. A., CÁMARA C. (2001): Evaluation of different types of hydrolysis of proteins for selenium speciation in yeast. Poszterelőadás a "II. International Conference on Trace Element Speciation in Biomedical, Nutritional and Environmental Sciences" konferencián, München, Németország, 2001.05.07-10.
- MASS M. J., TENNANT A., ROOP B. C., CULLEN W. R., STYBLO M., THOMAS D. J., KLIGERMAN A. D. (2001): Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chemical Research in Toxicology*, 14 (4) 355–361. p.
- MASSUMI A., NAJAFI N. M., BARZEGARI H. (2002): Speciation of Cr(VI)/Cr(III) in environmental waters by fluorimetric method using central composite, full and fractional factorial design. *Microchemical Journal*, 72, 93–101. p.
- MÁTRAI V. (1997): A környezetszennyező nehézfémek és kombinációik hatása a lipáz enzim működésére étolajban. Szakdolgozat. Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem, Kémia és Biokémia Tanszék.
- MATTUSCH J., WENNRICH R., SCHMIDT A. C., REISSER W. (2000): Determination of arsenic species in water, soils and plants. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366, 200–203. p.
- MATUSIEWITZ H., STURGEON R. E., BERMAN S. S. (1989): Trace element analysis of biological material following pressure digestion with nitric acid – hydrogen peroxide and microwave heating. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 4, 323–327. p.
- MCADAM P. A., LEVANDER O. A. (1987): Chronic toxicity and retention of dietary selenium fed to rats as D-selenomethionine or L-selenomethionine, selenite, or selenate. *Nutrition Research*, 7 (6) 601–610. p.
- MCKIERNAN J. W., CREED J. T., BROCKHOFF C. A., CARUSO J. A., LORENZANA R. M. (1999): A comparison of automated and traditional methods for the extraction of arsenicals from fish. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14, 607–613. p.
- MCSHEEHY S., MARCINEK M., CHASSAIGNE H., SZPUNAR J. (2000): Identification of dimethylarsinoyl-riboside derivatives in seaweed by pneumatically assisted electrospray tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 410, 71–84. p.
- MCSHEEHY S., POHL P., SZPUNAR J., POTIN-GAUTIER M., ŁOBIŃSKI R. (2001a): Analysis for selenium speciation in selenized yeast by two-dimensional liquid chromatography with ICP-MS and electrospray MS-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16, 68–73. p.
- MCSHEEHY S., POHL P., ŁOBIŃSKI R., SZPUNAR J. (2001b): Investigation of arsenic speciation in oyster test reference material by multidimensional HPLC-ICP-MS and electrospray tandem mass spectrometry (ES-MS-MS). *The Analyst*, 126, 1055–1062. p.
- MCSHEEHY S., SZPUNAR J., MORABITO R., QUEVAUVILLER P. (2003a): The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (4) 191–209. p.
- MCSHEEHY S., MESTER Z. (2003b): The speciation of natural tissues by electrospray-mass spectrometry. I: Biosynthesized species, As and Se. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (4) 210–224. p.
- MELTZER H. M., BIBOW K., PAULSEN I. T., MUNDAL H. H., NORHEIM G., HOLM H. (1993): Different bioavailability in humans of wheat and fish selenium as measured by blood platelet response to increased dietary Se. *Biological Trace Element Research*, 36, 229–241. p.
- MICHALKE B., SCHRAMEL P. (1997): Selenium speciation in human milk with special respect to quality control. *Biological Trace Element Research*, 59, 45–56. p.
- MICHALKE B., SCHRAMEL P. (1998): Application of capillary zone electrophoresis–inductively coupled plasma mass spectrometry and capillary isoelectric focusing–inductively coupled plasma mass spectrometry for selenium speciation. *Journal of Chromatography A*, 807, 71–80. p.
- MICHALKE B. (1999): Quality control and reference materials in speciation analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 363, 439–445. p.

- MICHALKE B., WITTE H., SCHRAMMEL P. (2001): Developments of a rugged method for selenium speciation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16, 593–597. p.
- MICHALKE B., WITTE H., SCHRAMMEL P. (2002): Effect of different extraction procedures on the yield and pattern of Se-species in bacterial samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372, 444–447. p.
- MONTES-BAYÓN M., B'HYMER C., PONCE DE LEÓN C., CARUSO J. A. (2001): Resolution of seleno-amino acid optical isomers using chiral derivatization and inductively coupled plasma mass spectrometric (ICP-MS) detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16, 945–950. p.
- MONTES-BAYÓN M., YANES E. G., PONCE DE LEÓN C., JAYASIMHULU K., STALCUP A., SHANN J., CARUSO J. A. (2002a): Initial studies of selenium speciation in *Brassica juncea* by LC with ICPMS and ES-MS detection: an approach for phytoremediation studies. *Analytical Chemistry*, 74, 107–113. p.
- MONTES-BAYÓN M., LEDUC D. L., TERRY N., CARUSO J. A. (2002b): Selenium speciation in wild-type and genetically modified Se accumulating plants with HPLC separation and ICP-MS/ES-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17, 872–879. p.
- MONTERRUS M., BOHARI Y., BUENO M., ASTRUC A., ASTRUC M. (2002): Comparison of extraction procedures for arsenic speciation in environmental solid reference materials by high-performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectroscopy. *Applied Organometallic Chemistry*, 16, 347–354. p.
- MORENO P., QUIJANO M. A., GUTIÉRREZ A. M., PÉREZ-CONDE M. C., CÁMARA C. (2001): Fractionation studies of selenium compounds from oysters, and their determination by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16, 1044–1050. p.
- MORENO P., QUIJANO M. A., GUTIÉRREZ A. M., PÉREZ-CONDE M. C., CÁMARA C. (2002): Stability of total selenium and selenium species in lyophilised oysters and in their enzymatic extracts. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374, 466–476. p.
- MSZ EN ISO/IEC 17025:2001. Magyar Szabvány: Vizsgáló- és kalibrálólaboratóriumok felkészültségének általános követelményei (ISO/IEC 17025:1999).
- MULSPOT (1998): Hitelesítési együttműködés az As, Hg, Sn és Se módosulatainak a T34 (BCR-710-jelölt) osztrigaszövetben történő meghatározására. EC Contract SM&T CT98-2232
- MUÑOZ O., VÉLEZ D., MONTORO R. (1999a): Optimization of the solubilization, extraction and determination of inorganic arsenic [As(III) + As(V)] in seafood products by acid digestion, solvent extraction and hydride generation atomic absorption spectrometry. *The Analyst*, 124, 601–607. p.
- MUÑOZ O., VÉLEZ D., CERVERA M. L., MONTORO R. (1999b): Rapid and quantitative release, separation and determination of inorganic arsenic [As(III)+As(V)] in seafood products by microwave-assisted distillation and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14, 1607–1613. p.
- MUNTAU H. (2001): Recent developments in the field of environmental reference materials at the JRC Ispra. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 370, 134–141. p.
- MÜLLER S., HEIDER J., BÖCK A. (1997): The path of unspecific incorporation of selenium in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 168, 421–427. p.
- NAGODAWITHANA T., GUTMANIS F. (1985): Method for the production of selenium yeast. United States Patent. Patent No. 4,530,846.
- NAR-20 (2002): Alkalmazási útmutató az MSZ EN ISO/IEC 17025 szabványhoz (1. kiadás). Nemzeti Akkreditálási Rendszer. Nemzeti Akkreditáló Testület, Budapest.
- NAVARRO-ALARCON M., LÓPEZ-MARTÍNEZ M. C. (2000): Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *The Science of the Total Environment*, 249, 347–371. p.
- NING R. Y. (2002): Arsenic removal by reverse osmosis. *Desalination*, 143, 237–241. p.
- OLSON O. E. (1986): Selenium toxicity in animals with emphasis on man. *Journal of the American College of Toxicology*, 5 (1) 45–70. p.
- ONO B., KIJIMA K., ISHII N., KAWATO T., MATSUDA A., PASZEWSKI A., SHINODA S. (1996): Regulation of sulphate assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12, 1153–1162. p.
- ÖNNING G., BERGDAHL I. A. (1999): Fractionation of soluble selenium compounds from fish using size-exclusion chromatography with on-line detection by inductively coupled plasma spectrometry. *The Analyst*, 124, 1435–1438. p.
- ÖNNING G. (2000): Separation of soluble selenium compounds in different fish species. *Food Chemistry*, 68, 133–139. p.
- PARDO-MARTÍNEZ M., VIÑAS P., FISHER A., HILL S. J. (2001): Comparison of enzymatic extraction procedures for use with directly coupled high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of arsenic in baby foods. *Analytica Chimica Acta*, 441, 29–36. p.
- PARKS A. N., GALLAGHER P. A., SCHWEGEL C. A., ACKERMAN A. H., CREED J. T. (2003): The liberation of arsenosugars from matrix components in difficult to extract seafood samples utilizing TMAOH/acetic acid sequentially in a two-stage extraction process. Poszterelőadás a 2003. évi European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry során; Garmisch-Partenkirchen, Németország, január 12-17.
- PAUWELS J., VANDECASTEELE C. (1993): Determination of the minimum sample mass of a solid CRM to be used in chemical analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 345, 121–123. p.

- PAUWELS J., LAMBERTY A., SCHIMMEL H. (1998): The determination of the uncertainty of reference materials certified by laboratory intercomparison. *Accreditation and Quality Assurance*, 3, 51–55. p.
- PAUWELS J., VAN DER VEEN A. M. H., LAMBERTY A., SCHIMMEL H. (2000): Evaluation of uncertainty of reference materials. *Accreditation and Quality Assurance*, 5, 95–99. p.
- PÉREZ MÉNDEZ S., BLANCO GONZÁLEZ E., SANZ MEDEL A. (2000): Chiral speciation and determination of selenomethionine enantiomers in selenized yeast by HPLC-ICP-MS using a teicoplanin-based chiral stationary phase. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15, 1109–1114. p.
- PIORRECK M., POHL P. (1984): Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids in green and blue-green algae during one growth phase. *Phytochemistry*, 23 (2) 217–223. p.
- POLYÁK K., HLAVAY J. (1999): Environmental mobility of trace metals in sediments collected in the Lake Balaton. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 363, 587–593. p.
- PONCE DE LEON C. A., SUTTON K. L., CARUSO J. A., UDEN P. C. (2000): Chiral speciation of selenoamino acids and selenium enriched samples using HPLC coupled to ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15, 1103–1107. p.
- PRUNK A. (2000): Szelénnel dúsított élesztő előállítás laboratóriumi referenciaanyagként történő felhasználás céljából. Diplomadolgozat. SZIE-ÉK Alkalmazott Kémia Tanszék.
- QUEVAUVILLER P. (1996): Improvement of quality control of speciation analysis using hyphenated techniques – a decades of progress within the European Community. *Journal of Chromatography A*, 750, 25–33. p.
- QUEVAUVILLER P. (1998): Requirements for production and use of Certified Reference Materials for speciation analysis: A European Commission perspective. *Spectrochimica Acta Part B*, 53, 1261–1279. p.
- QUEVAUVILLER P. (1999): Reference materials: an inquiry into their use and prospects in Europe. *Trends in Analytical Chemistry*, 18 (2) 76–85. p.
- RAESSLER M., MICHALKE B., SCHULTE-HOSTEDE S., KETTRUP A. (2000): Long-term monitoring of arsenic and selenium species in contaminated groundwaters by HPLC and HG-AAS. *The Science of the Total Environment*, 258, 171–181. p.
- RÁCZ L., BUMBÁLOVÁ A., HARANGOZÓ M., TÖLGYESSY J., TOMEČEK O. (2000a): Determination of cesium and selenium in cultivated mushrooms using radionuclide X-ray fluorescence technique. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 245 (3) 611–614. p.
- RÁCZ L., OLDAL V. (2000b): Investigation of uptake processes in a soil/mushroom system by AES and AAS methods. *Microchemical Journal*, 67, 115–118. p.
- REILLY C. (1998): Selenium: A new entrant into the functional food arena. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 114–118. p.
- SABÉ R., RUBIO R., GARCÍA-BELTRÁN L. (2001): Selenium determination in urine with atomic fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 436, 215–221. p.
- SCHMIDT A. C., REISSER W., MATTUSCH J., POPP P., WENNRICH R. (2000): Evaluation of extraction procedures for the ion chromatographic determination of arsenic species in plant materials. *Journal of Chromatography A*, 889, 83–91. p.
- SCHRAUZER G. N. (2000): Anticarcinogenic effects of selenium. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57, 1864–1873. p.
- SCHWARZ K., FOLTZ C. M. (1957): Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society*, 79 (12) 3292–3293. p.
- SCHWARZ K., MERTZ W. (1959): Chromium (III) and the glucose tolerance factor (Letters to the Editors). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 85, 292–295. p.
- SEAS (2002): Nemzetközi megvalósíthatósági tanulmány szelén- ill. arzéntartalmú LRM-ek létrehozására. A 2002. évi időközi egyeztető tanácskozás kézikönyve. Hozzáférhető a SZIE-ÉK Alkalmazott Kémia Tanszékén. EC Contract GROWTH GRD1-2000-25019.
- SEAS (2003): Nemzetközi megvalósíthatósági tanulmány szelén- ill. arzéntartalmú LRM-ek létrehozására. A 2003. évi időközi értékelő tanácskozás kézikönyve. Hozzáférhető a SZIE-ÉK Alkalmazott Kémia Tanszékén. EC Contract GROWTH GRD1-2000-25019.
- SECOR C. L., LISK D. J. (1989): Variation in the selenium content of individual Brazil nuts. *Journal of Food Safety*, 9 (4) 279–281. p.
- SHARMASARKAR S., VANCE G. F., CASSEL-SHARMASARKAR F. (1998): Analysis and speciation of selenium ions in mine environments. *Environmental Geology*, 34 (1) 31–38. p.
- SHIOMI K., SUGIYAMA Y., SHIMAKURA K., NAGASHIMA Y. (1995): Arsenobetaine as the major arsenic compound in the muscle of two species of freshwater fish. *Applied Organometallic Chemistry*, 9, 105–109. p.
- ŠLEJKOVEC Z., VAN ELTEREN J. T., WORONIECKA U. D. (2001): Underestimation of the total arsenic concentration by hydride generation techniques as a consequence of the incomplete mineralization of arsenobetaine in acid digestion procedures. *Analytica Chimica Acta*, 443, 277–282. p.
- SMEDLEY P. L., KINNIBURGH D. G. (2002): A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17 (5) 517–568. p.
- SOCHASKI M. A., JENKINS A. J., LYONS T. J., THORPE S. R., BAYNES J. W. (2001): Isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of methionine sulfoxide in protein. *Analytical Chemistry*, 73 (19) 4662–4667. p.



- STADTMAN T. C. (1996): Selenocysteine. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 83–100. p.
- STEFÁNKA Z., IPOLYI I., DERNOVICS M., FODOR P. (2001): Comparison of sample preparation methods based on proteolytic enzymatic processes for Se-speciation of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) samples. *Talanta*, 55, 437–447. p.
- STEFÁNKA Z. (2003a): Nagyhatékonyságú mintabeviteli technikák alkalmazási lehetőségei nyomelemek speciációs analízisének. PhD értekezés. Szent István Egyetem, Alkalmazott Kémia Tanszék.
- STEFÁNKA Z., DERNOVICS M., IPOLYI I., MÁTYÁS A., ABRANKÓ L., FODOR P. (2003b): HPLC-UV-HG-AFS módszer szeleno-aminosavak és szerves szelén specieszek meghatározására. *Anyagvizsgálók Lapja*, 13 (1) 23–27. p.
- STÝBLO M., THOMAS D. J. (1997): Binding of arsenicals to proteins in an *in vitro* methylation system. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 147 (1) 1–8. p.
- STÝBLO M., DROBNÁ Z., JASPERS I., LIN S., THOMAS D. J. (2002): The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: a research update. *Environmental Health Perspectives*, 110 (Suppl. 5) 767–771. p.
- SURAI P. F., SPARKS N. H. C. (2001): Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 7–16. p.
- SUZUKI K. T., ISHIWATA K., OGRA Y. (1999): Incorporation of selenium into selenoprotein P and extracellular glutathione peroxidase: HPLC-ICPMS data with enriched selenite. *The Analyst*, 124, 1749–1754. p.
- SZABÓ C. (2003): Mintaelőkészítés arzénspeciesz meghatározásához. Diplomadolgozat. SZIE-ÉK Alkalmazott Kémia Tanszék.
- SZPUNAR J. (2000): Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *The Analyst*, 125, 963–988. p.
- TEMPLETON D. M., ARIESE F., CORNELIS R., DANIELSSON L-G., MUNTAU H., VAN LEEUWEN H. P., ŁOBIŃSKI R. (2000): Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements, definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry*, 72 (8) 1453–1470. p.
- THOMAS C., BUTH I., WALDNER H. (2001): Bioavailability investigations of selenium from foods and supplements after enzymatic digestion using HPLC-ICP-MS with hexapole collision cell. Poszterelőadás a “II. International Conference on Trace Element Speciation in Biomedical, Nutritional and Environmental Sciences” konferencián, München, Németország, 2001.05.07-10.
- THOMAS P., FINNIE J. K., WILLIAMS J. G. (1997): Feasibility of identification and monitoring of arsenic species in soil and sediment samples by coupled high performance liquid chromatography — inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12, 1367–1372. p.
- THORGREN M., ÁKESSON B. (1987): Effect of dietary fish on plasma selenium and its relation to haemostatic changes in healthy adults. *International Journal of Vitamin and Nutritional Research*, 57, 429–435. p.
- TU H. M., GODFREY L. W., SUN S. S. M. (1998): Expression of the Brazil nut methionine-rich protein and mutants with increased methionine in transgenic potato. *Plant Molecular Biology*, 37 (5) 829–838. p.
- TURPEINEN R., PANTSAR-KALLIO M., KAIRESAALO T. (2002): Role of microbes in controlling the speciation of arsenic and production of arsines in contaminated soils. *The Science of the Total Environment*, 285, 133–145. p.
- UDEN P. C., BIRD S. M., KOTREBAI M., NOLIBOS P., TYSON J. F., BLOCK E., DENOYER E. (1998): Analytical selenoamino acid studies by chromatography with interfaced atomic mass spectrometry and atomic emission spectral detection. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 362, 447–456. p.
- URASE T., OH J., YAMAMOTO K. (1998): Effect of pH on rejection of different species of arsenic by nanofiltration. *Desalination*, 117, 11–18. p.
- VAN DER VEEN A. M. H., LINSINGER T., PAUWELS J. (2001): Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 2. Homogeneity study. *Accreditation and Quality Assurance*, 6, 26–30. p.
- VAN ELTEREN J. T., WORONIECKA U. D., KROON K. J. (1998): Accumulation and distribution of selenium and cesium in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* – a radiotracer-aided study. *Chemosphere*, 36 (8) 1787–1798. p.
- VARSÁNYI I., FODRE Z., BARTHA A. (1991): Arsenic in drinking-water and mortality in the southern great plain, Hungary. *Environmental Geochemistry and Health*, 13 (1) 14–22. p.
- VELEZ D., YBÁÑEZ N., MONTORO R. (1995): Percentages of total arsenic represented by arsenobetaine levels of manufactured seafood products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1289–1294. p.
- VERES S., SZÁHL Z. (1991): Accumulation of arsenic in vegetables cultivated with arsenic containing nutrient solutions. *Magyar Kémiai Folyóirat*, 97 (2) 91–96. p.
- VERGARA GALLARDO M., BOHARI Y., ASTRUC A., POTIN-GAUTIER M., ASTRUC M. (2001): Speciation analysis of arsenic in environmental solids Reference Materials by high-performance liquid chromatography–hydride generation–atomic fluorescence spectrometry following orthophosphoric acid extraction. *Analytica Chimica Acta*, 441, 257–268. p.
- VETTER J. (1990): Mineral element content of edible and poisonous macrofungi. *Acta Alimentaria*, 19 (1) 27–40. p.
- VETTER J. (1993): Selenium content of some higher fungi. *Acta Alimentaria*, 22 (4) 383–387. p.
- VILANÓ M., PADRÓ A., RUBIO R., RAURET G. (1998): Organic and inorganic selenium speciation using high-performance liquid chromatography with UV irradiation and hydride generation quartz cell atomic absorption spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 819, 211–220. p.

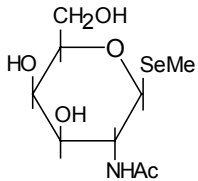
- VONDERHEIDE A. P., WROBEL K., KANNAMKUMARATH S. S., B'HYMER C., MONTES-BAYÓN M., PONCE DE LEÓN C., CARUSO J. A. (2002): Characterization of selenium species in brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5722–5728. p.
- WALDOCK M. J., THAIN J. E. (1983): Shell thickening in *Crassostrea gigas*: organotin antifoulings or sediment induced? *Marine Pollution Bulletin*, 14, 411–415. p.
- WANG Z., SHENMENG XIE S., PENG A. (1996): Distribution of Se in soybean samples with different Se concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2754–2759. p.
- WENZEL W. W., KIRCHBAUMER N., PROHASKA T., STINGEDER G., LOMBIC E., ADRIANO D. C. (2001): Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Analytica Chimica Acta*, 436, 309–323. p.
- WHANGER P. D., IP C., POLAN C. E., UDEN P. C., WELBAUM G. (2000): Tumorigenesis, metabolism, speciation, bioavailability, and tissue deposition of selenium in selenium-enriched ramps (*Allium tricoccum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5723–5730. p.
- WOLF W. R., ZAINAL H., YAGER B. (2001): Selenomethionine content of candidate reference materials. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 370, 286–290. p.
- WROBEL K., WROBEL K., CARUSO J. A. (2002): Selenium speciation in low molecular weight fraction of Se-enriched yeasts by HPLC-ICP-MS: detection of selenoadenosylmethionine. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17, 1048–1054. p.
- WROBEL K., KANNAMKUMARATH S. S., WROBEL K., CARUSO J. A. (2003): Hydrolysis of proteins with methanesulfonic acid for improved HPLC-ICP-MS determination of seleno-methionine in yeast and nuts. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375 (1) 133–138. p.
- YAMSKOV I. A., TICHONOVA T. V., DAVANKOV V. A. (1986): Pronase-catalyzed hydrolysis of amino-acid amides. *Enzyme and Microbial Technology*, 8 (4) 241–244. p.
- YASUMOTO K., IWAMI K., YOSHIDA M. (1983): Nutritional efficiency and chemical form of selenium, an essential trace element, contained in soy protein. *Diazu Tanpakushitu Eiyu Kenkyukai Kaishi*, 4, 35–40. p.
- YASUMOTO K., SUZUKI T., YOSHIDA M. (1988): Identification of selenomethionine in soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 463–467. p.
- YBÁÑEZ N., CERVERA M. L., MONTORO R. (1991): Comparison of dry mineralization and microwave-oven digestion for the determination of arsenic in mussel products by platform in furnace Zeeman-effect atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 6, 379–384. p.
- YBÁÑEZ N., VELEZ D., TEJEDOR W., MONTORO R. (1995): Optimization of the extraction, clean-up and determination of arsenobetaine in manufactured seafood products by coupling liquid chromatography with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 10, 459–465. p.
- ZHANG Y. Q., MOORE J. N. (1997): Changes in selenium speciation in wetland Sediments induced by laboratory testing. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 28 (3-5) 341–350. p.
- ZHANG Y. Q., FRANKENBERGER JR. W. T. (2001): Speciation of selenium in plant water extracts by ion exchange chromatography-hydride generation atomic absorption spectrometry. *The Science of the Total Environment*, 269, 39–47. p.
- ZHANG W., CAI Y., TU C., MA L. Q. (2002): Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. *The Science of the Total Environment*, 300, 167–177. p.
- ZHENG J., OHATA M., FURUTA N., KOSMUS W. (2000): Speciation of selenium compounds with ion-pair reversed-phase liquid chromatography using inductively coupled plasma mass spectrometry as element-specific detection. *Journal of Chromatography A*, 874, 55–64. p.
- ZHENG J., SHIBATA Y., FURUTA N. (2003): Determination of selenoamino acids using two-dimensional ion-pair reversed phase chromatography with on-line detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 59, 27–36. p.
- ZUBOR Z. (2000): Mintaelőkészítési módszerek kidolgozása szelén specieszek meghatározására biológiai mintákban. Diplomadolgozat. SZIE-ÉK Alkalmazott Kémia Tanszék.

## 2. MELLÉKLET (SZELÉNMODOSULATOK)

**M2/1. Táblázat. A leggyakrabban vizsgált szelénmodosulatok [KOTREBAI 2000, LOBIŃSKI 2000, LARSEN 2001, KOBAYASHI 2002, WROBEL 2002 és MCSHEEHY 2003b alapján].**

<u>Megnevezés</u>		<u>Rövidítés</u>	<u>Képlet</u>	<u>Előfordulás, szerep</u>	
1	Szelénsav és sói, a szelenátok	Se(VI)	SeO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Talaj, talajvíz, üledékek, tenger	
	2	Se(IV)	SeO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>		
3	Trimetilszelenonium-ion	TMSe <sup>+</sup>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Se <sup>+</sup>	Se-kiürítés metabolítja	
		DMSe	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Se		
4	Dimetil-szelenid				
5	Szelenocisztein	SeCys	H <sub>2</sub> N-CH(COOH)-CH <sub>2</sub> -SeH	Se-fehéjék funkcionális csoportja	
6	Szelenocisztin	SeCys <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> N-CH(COOH)-CH <sub>2</sub> -Se-Se-CH <sub>2</sub> -CH(COOH)-H <sub>2</sub> N		
7	Szelenometionin	SeMet	H <sub>2</sub> N-CH(COOH)-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Se-CH <sub>3</sub>	Se-tartalmú fehérjék nem funkcionális építőeleme	
8	Se-metilszelenocisztein	MeSeCys	H <sub>2</sub> N-CH(COOH)-CH <sub>2</sub> -Se-CH <sub>3</sub>		
9	γ-glutamil-Se-metilszelenocisztein	---	H <sub>2</sub> N-CH(COOH)-CH <sub>2</sub> -CO-NH-CH(COOH)-CH <sub>2</sub> -Se-CH <sub>3</sub>	A kénanyagcsere kéntartalmú szeléntartalmú vegyületeinek analóg, megfelelői.	
		---	H <sub>2</sub> N-CH(COOH)-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Se-CH <sub>2</sub> -CH(COOH)-H <sub>2</sub> N		
10	Szelenocisztionin	SeHoCys	H <sub>2</sub> N-CH(COOH)-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SeH		
11	Szelenohomocisztein	---	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Se-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>		
12	Szelenocisztamin	---	H <sub>2</sub> N-CH(COOH)-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Se-CH <sub>2</sub> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> N <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>		
13	Se-adenozil-szelenohomocisztein	AdoSeHcy			
Szervetlen Se-vegyületek					
Metilezett Se-vegyületek					
Szeleno-aminosavak és származékaik					

**M2/2. Táblázat. A leggyakrabban vizsgált szelénmódosulatok [KOTREBAI 2000, ŁOBIŃSKI 2000, LARSEN 2001, KOBAYASHI 2002, WROBEL 2002 és MCSHEEHY 2003b alapján].**

	<u>Megnevezés</u>	<u>Rövidítés</u>	<u>Képlet</u>	<u>Előfordulás, szerep</u>
14	Se-lantionin	---	$\text{H}_2\text{N-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-Se-CH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-H}_2\text{N}$	Kénanyagszere analóg intermediere
15	Szelenoetionin	SeEt	$\text{H}_2\text{N-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Se-CH}_2\text{-CH}_3$	Valószínűleg csak mesterségesen előállítható aminosav
16	Dimetilszelenonium-propionát	DMSeP	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$	
17	1 $\beta$ -metilszeleno-N-acetil-D-galaktózamin (Se-metil-N-acetilszeleno-hexózamin)	Szeleno-cukor, MSeAcG		Se-kiürítés metabolitja
18	Se-adenozil-metionin	AdoSeMet	$\text{H}_2\text{N-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Se}^+(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-C}_4\text{H}_5\text{O}_3\text{C}_5\text{N}_4\text{NH}_2$	A kénanyagszere kéntartalmú vegyületének analóg, szeléntartalmú megfelelője
19	Se-allil-szelenocisztein	AllSeCys	$\text{H}_2\text{N-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-Se-CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$	
20	Szeleno-karbamid	SeU	$\text{H}_2\text{N-C}(\text{Se})\text{-NH}_2$	Valószínűleg csak mesterségesen állítható elő

### 3. MELLÉKLET (ARZÉNMODOSULATOK)

**M3. Táblázat. A biológiai rendszerekben vizsgált legfontosabb arzénmodosulatok [CORR 1996, LE 1998, MUÑOZ 1999a, GALLAGHER 2001 és GONG 2002 alapján].**

Megnevezés	Képlet	Rövidítés	LD <sub>50</sub> érték, mg kg <sup>-1</sup>	Jellemző előfordulási hely
Arzénessav (arzenit)	OH-As(OH) <sub>2</sub>	As(III)	14-34,5	talaj, talajvíz, üledékek, magasabb rendű növények
Arzénsav (arzenát)	O=As(OH) <sub>3</sub>	As(V)	20-41	
Monometil- arzonossav	CH <sub>3</sub> As(OH) <sub>2</sub>	MMA(III)	? (valószínűleg igen mérgező)	emlős As-anyagcsere metabolit
Monometil-arzonsav	CH <sub>3</sub> AsO(OH) <sub>2</sub>	MMA(V)	700-1800	emlős As-anyagcsere metabolit
Dimetil-arzinessav	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsOH	DMA(III)	? (valószínűleg igen mérgező)	emlős As-anyagcsere metabolit
Dimetil-arzinsav	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO(OH)	DMA(V)	700-2600	Általános As- „detoxikáció” végtermék
Dimetil-arzinoil (oxarzil) etanol	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	DMAE (DMAsEt)	? (valószínűleg nem mérgező)	Arzenocukor bomlástermékek
Dimetil-arzínil ecetsav	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	DMAA (DMAsAc)		
Trimetilarzin-oxid	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> AsO	TMAO	>10000	
Tetrametil- arzonium-ion	(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> As <sup>+</sup>	TMA <sup>+</sup> (TETRA)	890	AsB bomlástermék
Arzeno-betain	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>	AsB	>10000	As-„detoxikáció” végterméke víziállatokban
Arzeno-betain 2, trimetilarzonio- propionát, trimetil- (2-karboxi-etil)- arzonium	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>	AsB-2 (TMAP)	? (valószínűleg nem mérgező, AsB-hez hasonlóan)	
Arzeno-kolin	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	AsC	6500-6900	As-„detoxikáció” intermedier tengeri állatokban
Trimetilarzin	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As	TMA(III)	? (kiemelten mérgező)	Mesterséges eredetűek vagy mikrobiológiai As-anyagcsere termékei
Arzinek (általános képlet)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>x</sub> AsH <sub>3-x</sub> , ahol x =0-3	Me <sub>x</sub> AsH <sub>3-x</sub> , ahol x =0-3		
Etil-metil-arzinek	(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>x</sub> As(CH <sub>3</sub> ) <sub>3-x</sub> , ahol x =0-3	Et <sub>x</sub> AsMe <sub>3-x</sub> , ahol x =0-3		
Arzéntartalmú ribozidok			? (valószínű- leg nem mérgező)	Alacsonyabb rendű növényi szervezetek (moszatok, hínárok, algák)
	R= (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO-, X= -OH, Y= -OH	Arzenocukor A, X, 392, 11		
	R= (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO-, X= -OH, Y= -OPO <sub>3</sub> HCH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> OH	Arzenocukor B, XI, 328, 13		
	R= (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO-, X= -OH, Y= -SO <sub>3</sub> H	Arzenocukor C, XII, 408, 10		
	R= (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO-, X= -OH, Y= -OSO <sub>3</sub> H	Arzenocukor D, XIII, 482, 12		
	R= (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO-, X= -NH <sub>2</sub> , Y= -SO <sub>3</sub> H	Arzenocukor E, XIV, 390		
	R= (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> -, X= -OH, Y= -OSO <sub>3</sub> H	Arzenocukor F, XV, 407		
	R= (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> -, X= -NH <sub>2</sub> , Y= -OSO <sub>3</sub> H	Arzenocukor G, XVI, 406		

## 4. MELLÉKLET (SZELÉN-MINTAELŐKÉSZÍTÉS)

M4/1. Táblázat. Alkalmazási példák egylépéses, fehérjebontó enzimmel végrehajtott Se-módsulatanalitikai mintaelőkészítésekre. (\*=jelölések a 2. Melléklet táblázata alapján).

Közlemény	Vizsgált minta	Összes Se-tartalom, $\mu\text{g g}^{-1}$	Alkalmazott enzim	Reakcióközeg	Kinyerési hatások az összes Se %-ában	Azonosítási arány, a kinyert Se %-ában	Azonosított főbb Se-módsulatok*
GILON et al. [1995,1996]	Se-dúsított élesztő	1038	proteáz XIV	citromsav-foszforsav puffer, pH=7,5	90-92	80-84	2, 6, 7
BIRD et al. [1997]	Se-dúsított élesztő	1922	proteáz XIV	ioncserélt víz	90	>90	6, 7, 8
UDEN et al. [1998]	Se-dúsító növények: Indiai mustár / <i>Brassica juncea</i> / <i>Astragalus praelongus</i>	138 517	proteáz XIV	ioncserélt víz	~84 ~86	~52 ~54	7, 8, 18
KOTREBAI et al. [1999a], IP et al. [2000]	Se-dúsított élesztő Se-dúsított fokhagyma	1922 296	proteáz XIV	ioncserélt víz	80-90 ~100	82 86	7, 13 7, 9
KOTREBAI et al. [1999b]	plankton Se-dúsító növény / <i>Astragalus praelongus</i> / Se-élesztő tablettá	2071 525 592	proteáz XIV	ioncserélt víz	15 93 95	71 82 99	1, 2, 7, 8 1, 2, 7, 8 1, 2, 7
CASIOT et al. [1999]	Se-dúsított élesztő	1180	proteáz XIV (+lipáz VII)	foszfát-puffer, pH=7,5	88	94	1, 2, 7
KOTREBAI et al. [2000] WHANGER et al. [2000]	Se-dúsított élesztő Se-dúsított hagymaféle / <i>Allium tricoccum</i> / Se-dúsított és hagyományos fokhagyma Se-dúsított és hagyományos vöröshagyma Se-dúsító növény /Indiai mustár- <i>Brassica juncea</i> / Se-dúsító növény / <i>Astragalus praelongus</i> /	1200-2100 48-524 0,2-1355 0,2-140 138 517	proteáz XIV	ioncserélt víz	Azonosítási arány az összes Se %-ában 67-93 60-85 87-96 92-96 90 84	2,6,7,8,9,10,13,14 1,7,8,9,10 1,6,7,8,9,10 1,6,7,8,9,10 1,7,8 1,2,7,8,9,10	
B'HYMER és CARUSO [2000]	Se-dúsított élesztőből készült táplálékkiegészítő tabletták	107-222	proteáz K	NaCO <sub>3</sub> -puffer, pH=7-7,2	12-99	42-103	1, 2, 7
PONCE DE LEON et al. [2000]	Se-dúsított élesztő Se-dúsított fokhagyma Se-dúsított vöröshagyma	1922 296 140	pepszin	HCl+NaCl, pH=1	---	---	7,8,13,14 8,9 1,2,8,9
LINTSCHINGER et al. [2000]	Se-dúsított búzacsíra Se-dúsított lucernacsíra Se-dúsított napraforgócsíra	112 164 900	proteáz XIV	citromsav-foszforsav puffer, pH=7,5	62 74 100	~68 ~62 ~100	1,2 1,2 1

M4/2. Táblázat. Alkalmazási példák egy lépéses, fehérjebontó enzimmel végrehajtott Se-módszeranalitikai mintaelőkészítésekre. (\*=jelölések a 2. Melléklet táblázata alapján).

Közlemény	Vizsgált minta	Összes Se-tartalom, $\mu\text{g g}^{-1}$	Alkalmazott enzim	Reakcióközeg	Kinverési hatások az összes Se %-ában	Azonosítási arány, a kinvert Se %-ában	Azonosított főbb Se-módszeranalitikai módosulatok*
ZHENG et al. [2000]	Se-dúsított élesztőből készült táplálékkiegészítő tabletta	426	proteáz XIV	ammónium-foszfát puffer, pH=7,5	74,1	81,4	6,7
MICHALKE et al. [2001]	Se-dúsított tejsavbaktérium	148	proteáz XIV	TRIS-HCl, pH=7,3	25	35,3	1,2,6,7,19
MORENO et al. [2001, 2002]	osztriga RM	1,22	szubtilizin	TRIS-HCl, pH=7,5	29,5-35	~100	3,7
KANNAMKU-MARATH et al. [2002]	6-féle dió (2 hagyományos, 2 brazil, pekán, kasu)	0,1-35,1	proteáz K	foszfát-puffer, pH=7,5	~60 (a brazil dióra)	~43-47 (a brazil dióra)	7
VONDERHEIDE et al. [2002]	brazil dió	35	proteáz K	TRIS-HCl, pH=7,5	83	38	7
MONTES-BAYÓN et al. [2002]	Se-dúsító növény / Indiai mustár- <i>Brassica juncea</i>	202	proteáz K proteáz XIV	ioncserélt víz	73 70	---	7
GÓMEZ-ARIZA et al. [2002]	rák kagyló tengeri hal CRM (TORT-1)	0,79 2,93 6,88	szubtilizin (+lipáz VII)	ioncserélt víz	60 29 44	~91 ~100 ~100	2 --- 2,6,7
MICHALKE et al. [2002]	Se-dúsított tejsavbaktérium	140	proteáz XIV proteáz XIV +lizozim	TRIS-HCl, pH=7,3	~8,3 ~12,1	~26,6 ~37,0	6,7,19 1,2,6,7,19
ZHENG et al. [2003]	Se-dúsított élesztőből készült táplálékkiegészítő tabletta hal CRM	512 6,06	proteáz XIV	foszfát-puffer, pH=7,5	77 15,7	93 94,6	2,6,7 6,7
LARSEN et al. [2003]	Se-dúsított élesztő	1390	proteáz XIV	ioncserélt víz	90	~59	7

## 5. MELLÉKLET (ARZÉN-MINTAELŐKÉSZÍTÉS)

M5/1. Táblázat. Alkalmazási példák metanol-víz oldószeres extrakcióval végrehajtott As-módsulatanalitikai mintaelőkészítésekre.

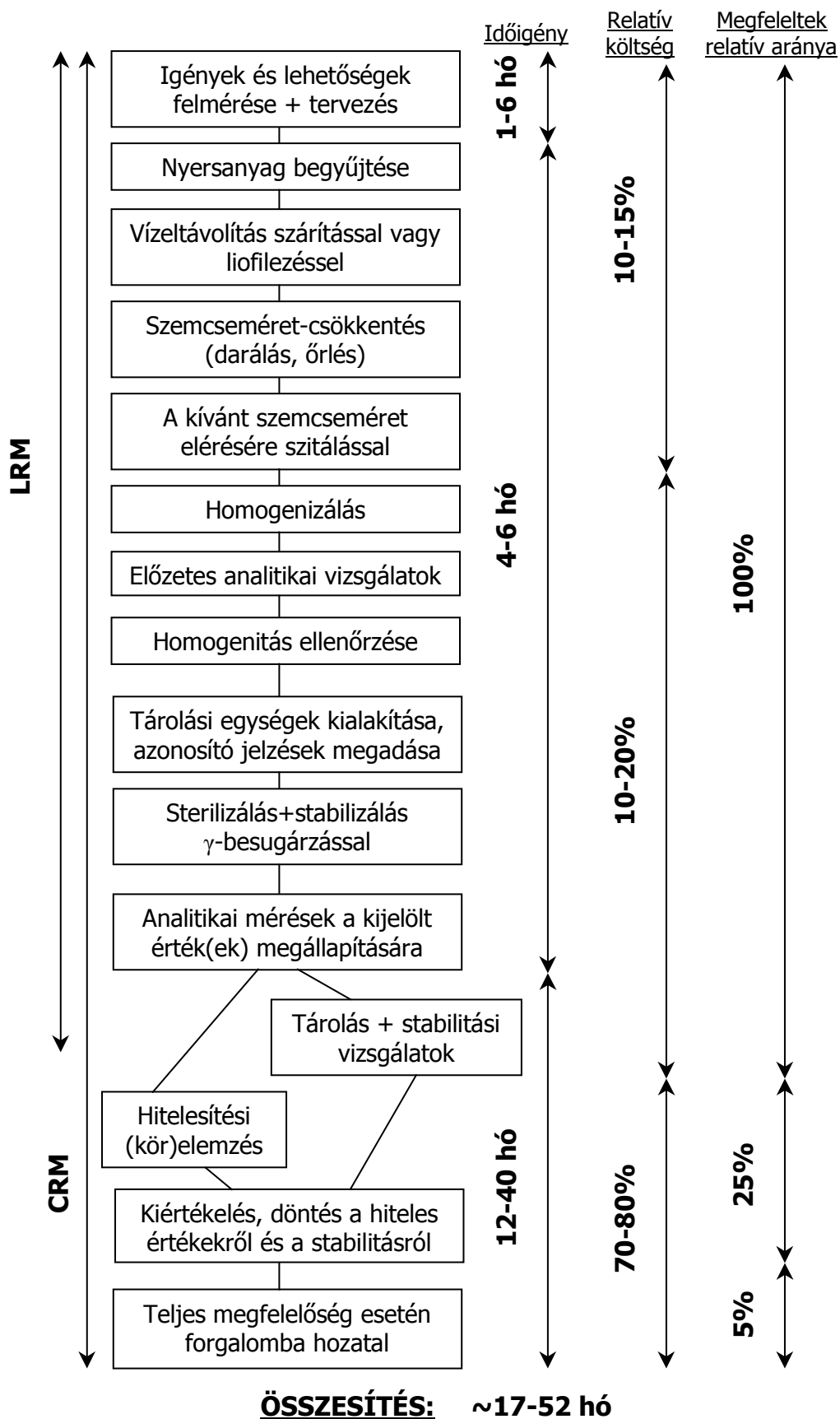
Közlemény	As-tartalmú minta	Összes As-tartalom, $\mu\text{g g}^{-1}$ vizsgált minta	Alkalmazott oldószeres clean-up nélkül	A felhasznált (esetenként leghatékonyabb) oldószer V/V arány	Kinverési hatások az összes As %-ában	Azonosítási arány, a kinvert As %-ában	Hidrofób As-módsulatok az összes As %-ában	Azonosított főbb As-módsulatok
LARSEN et al. [1993]	11-féle hal, osztriga, rák és kagyló	3,2 - 118	kloroform-metanol-víz	1. lépés: 2:5:0 2. lépés: 5:0:7	46-99	---	1-18	AsB, AsC, As(III), As(V), MMA(V), DMA(V), TMAO, TETRA
BRANCH et al. [1994]	7-féle hal	3,5-196,1	kloroform-metanol-víz	1. lépés: 1:2:0 2. lépés: 1:0:1	37-87	---	0,08-2,2	AsB, DMA(V), As(V)
EL MOLL et al. [1995]	7-féle friss hal, csiga, kagyló, rák	3,8-96	metanol-víz	1:1	59,6-144	---	---	AsB, DMA(V)
KUEHNELT et al. [1997]	3-féle kalapos gomba	10,9-30,0	metanol-víz	9:1	85-100	?-147	---	AsB, AsC, DMA(V), As(III), As(V), TETRA
GOESSLER et al. [1997]	zöldalga LRM	2480-14900	metanol-víz	2:3 arányt meghaladva	100 körül	„100 körül”	---	As(III), As(V), MMA(V), DMA(V)
LARSEN et al. [1997]	rák és hal CRM	42,2-43,2	kloroform-metanol-víz	1. lépés: 2:5:0 2. lépés: 5:0:7	99,4	93,2-99,0	---	AsB, TETRA
LARSEN et al. [1998b]	ehető kalapos gomba	23-1420	metanol-víz	1:9	68-85	„100 körül”	---	DMA(V), MMA(V), As(V), AsB, TMAO
JÓKAI et al. [1998]	arzánnal dúsított élesztő	22,4-206	acetone, metanol-víz	1. lépés: acetone (zsírtalanítás) 2. lépés: 1:9	83-98	„100 körül”	---	As(III), As(V), MMA(V)
HELGESEN és LARSEN 1998]	répa	0,11-1,85	metanol-víz	1:9	46-69	„100 körül”	---	As(III), As(V)
LAGARDE et al. [1999]	tonhal CRM	4,8	metanol-víz	1:1	88-99	„100 körül”	---	AsB, DMA(V)
MCKIERNAN et al. [1999]	5-féle friss hal és hal CRM	2,99-60,6	acetone, metanol-víz	1. lépés: acetone (zsírtalanítás) 2. lépés: 1:1 /m/m/	84,9-89,1	98 körül	0,4-5,1	AsB + AsC, As(V), MMA(V), DMA(V)



**M5/2. Táblázat. Alkalmazási példák metanol-víz oldószeres extrakcióval végrehajtott As-módosulatanalitikai mintaelőkészítésekre.**

<u>Közlemény</u>	<u>As-tartalmú minta</u>	<u>Összes As-tartalom, <math>\mu\text{g g}^{-1}</math> vizsgált minta</u>	<u>Alkalmazott oldószer, clean-up nélkül</u>	<u>A felhasznált (esetenként leghatékonyabb) oldószer V/V arány</u>	<u>Kinyerési hatásfok az összes As %-ában</u>	<u>Azonosítási arány, a kinyert As %-ában</u>	<u>Hidrofób As-módosulatok az összes As %-ában</u>	<u>Azonosított főbb As-módosulatok</u>
ACKLEY et al. [1999]	4-féle friss hal és hal CRM	2,6-19,4	metanol-víz	4:1	46-100	100 körül, csak AsB-re	---	AsB
SCHMIDT et al. [1999]	3-féle gyommövény és növényi CRM	0,093-9,90	metanol-víz	1:9	30-100	„100 körül”	---	As(III), As(V), DMA(V)
MCSHEEHY et al. [2001b]	osztriga CRM	15	metanol-víz	1:1	53	71	---	AsB, AsB-2, AsC, TETRA, DMA(V), Arzenocukor B és D
GALLAGHER et al. [2001]	3-féle tengeri hínár	0,045-109,4	metanol-víz	3:7	25,6-77,4	„100 körül”	---	As(III), As(V), DMA(V), Arzenocukor A, B, C, D
HEITKEMPER et al. [2001]	7-féle rizs és gabona CRM	0,11-0,34	metanol-víz	1:1	31-76	„100 körül”	---	DMA(V), As(III)+As(V)
CARUSO et al. [2001]	3-féle alma	0,0082-0,0809	metanol-víz	1:1	60,5-97,1	„100 körül”	---	As(III), As(V), MMA(V), DMA(V)
ZHANG et al. [2002]	As-dúsító páfrány	168-3894	metanol-víz	1:1	60-100	„100 körül”	---	As(III), As(V)
KIRBY és MAHER [2002]	19-féle hal, rák, osztriga és kagyló CRM	3,3-23,2	acetoni, metanol-víz	1. lépés: acetoni (zsírtalanítás) 2. lépés: 1:1	58-103	81-100	0,21-10,5	AsB, AsB-2, AsC, As(V), MMA(V), DMA(V), TETRA, TMAO

## 6. MELLÉKLET (RM-ELŐÁLLÍTÁS)



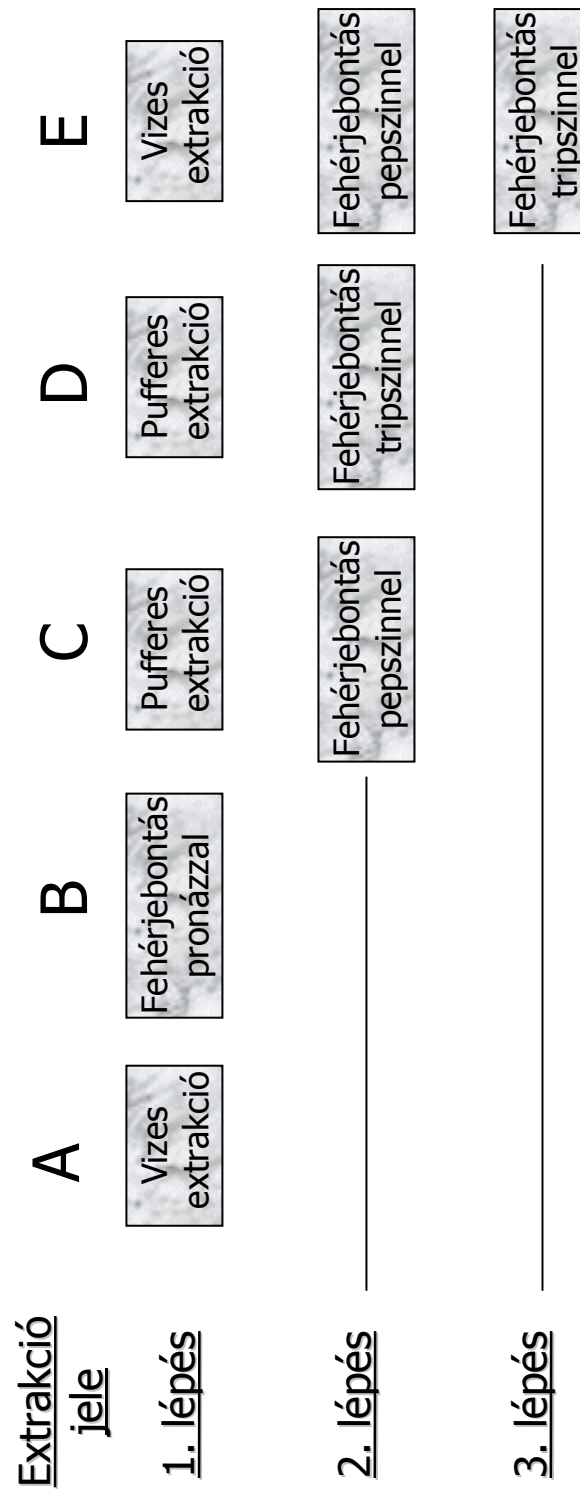
M6. Ábra. A referenciaanyagok előállításának általános folyamatábrája.

## 7. MELLÉKLET (RSM-TÁBLÁZAT)

**M7. Táblázat. Arzéntartalmú halminta („SEAS”) enzimes mintaelőkészítésének többváltozós optimálási megközelítése. A legkisebb négyzetek elve alapján végrehajtott, polinom függvény illesztéshez az  $x_1$ ,  $x_2$  és  $y$  változókat használtam fel; az utóbbi adatok számításánál a  $43,7 \mu\text{g As g}^{-1}$  összes As-tartalom értékét vettem figyelembe.**

Független változók			Függő változók		
$X_1$	$X_2$	---	---	---	Y
Extrakció időtartama, óra	Tripszin koncentráció, m/m %	Minta tömege, g	Kinyert As, $\mu\text{g}$	Kinyert As, $\mu\text{g g}^{-1}$ minta	As-kinyerési hatásfok, %
1	10	0,256	9,8	38,3	87,6
2,35	10	0,253	8,8	34,8	79,6
4	10	0,253	9,3	36,0	82,4
4	5	0,253	9,7	38,3	87,6
4	15	0,253	9,6	37,8	86,5
6	10	0,250	10,0	39,8	91,1
8	10	0,257	10,0	39,1	89,5
8	2,93	0,253	10,2	40,4	92,3
8	17	0,257	10,1	39,1	89,6
10	1	0,252	9,8	38,7	88,6
10	3	0,253	9,9	39,0	89,2
10	8	0,260	10,3	39,6	90,6
10	10	0,255	10,4	40,9	93,6
10	12	0,251	9,8	38,9	89,0
10	10	0,255	10,4	40,9	93,6
10	17	0,259	10,4	40,3	92,2
12	10	0,251	10,3	40,9	93,6
12	5	0,256	9,9	38,6	88,3
12	15	0,256	10,1	39,3	90,0
13,6	10	0,255	10,4	40,7	93,1
16	10	0,258	9,9	38,5	88,1
20	10	0,250	9,9	39,8	91,0

8. MELLÉKLET (FOLYAMATÁBRA)



M8. Ábra. A szelénsóval kiegészített kompoziton természetett, Se-dúsított csiperkegomba módosulatanalitikai mintaelőkészítése során alkalmazott extrakciós eljárások vázlatos ismertetése.

## 9. MELLÉKLET (HOMOGENITÁSVIZSGÁLAT)

**M9/1. Táblázat. A referenciaanyag céljából készített brazil dió tárolási egységen belüli és a tárolási egységek közötti homogenitásának megállapítására végrehajtott módszeranalitikai mérések eredményei, mind az összes Se-, mind pedig a SeMet-tartalmat illetően.**

Minták	HOMOGENITÁSVIZSGÁLAT			
	Összes Se-tartalom		SeMet-tartalom (szelénben számítva)	
	9 párhuzamos mérés egy fiolából, $\mu\text{g g}^{-1}$	9 fiolából származó egyenkénti mérések, $\mu\text{g g}^{-1}$	9 párhuzamos mérés egy fiolából, $\mu\text{g g}^{-1}$	9 fiolából származó egyenkénti mérések, $\mu\text{g g}^{-1}$
1.	82,11	87,50	77,50	87,32
2.	82,32	82,39	83,35	77,70
3.	85,14	76,31	78,81	70,71
4.	83,56	81,54	75,34	79,12
5.	84,63	80,01	71,28	73,03
6.	81,81	80,79	77,76	79,28
7.	77,87	83,85	78,46	79,39
8.	85,68	86,67	85,24	82,42
9.	85,02	87,01	78,04	77,50
Átlag	83,13	82,90	78,42	78,50
Szórás	2,44	3,73	4,07	4,84
Relatív szórás	$CV_B$ 2,94%	$CV_K$ 4,50%	$CV_B$ 5,20%	$CV_K$ 6,16%
Relatív szórás $\pm$ bizonytalanság ( $U_{CV}$ )	2,94 $\pm$ 0,69%	4,50 $\pm$ 1,06%	5,20 $\pm$ 1,23%	6,16 $\pm$ 1,45%
Átfedésben?	IGEN		IGEN	

**M9/2. Táblázat. Az összes Se- és SeMet-tartalom tárolási egységek közötti inhomogenitás értékeinek ( $s_K$ ) megállapítása. A táblázatban közölt szórási paraméterek mértékegysége – a relatív értékek kivételével –  $\mu\text{g Se g}^{-1}$  brazil dió minta.**

Bizonytalansági tényezők	Összes Se-tartalomra		SeMet-tartalomra (szelénben számítva)	
$u_{c(K)}$	---	3,73	4,07	---
$s_{\text{módszer}}$	2,44	---	---	4,84
$\left(u_{c(K)}^2 - s_{\text{módszer}}^2\right)^{0,5}$	$s_K = (3,73^2 - 2,44^2)^{0,5} = 2,82$		$s_K = (4,84^2 - 4,07^2)^{0,5} = 2,62$	
Relatív $s_K$ (a vonatkozó átlag %-ában)	$(2,82 / 82,90) * 100\% = 3,40 \%$		$(2,62 / 78,50) * 100\% = 3,34 \%$	

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Nos, bár teljes mértékben tudatában vagyok annak, hogy nem tudom felidézni az összes jó szándékú embert, akik a négy év során hozzájárultak ezen értekezés valamely szakaszához, mégis kísérletet teszek arra, hogy összegyűjtssem őket – egyúttal elnézést kérve azoktól, akik megérdemelnék, de feledékenységem révén kimaradtak...:

- elsőként feleségemnek, Száraz Leonórának szeretnék köszönetet mondani – aki türelmével és segítségével vezetett át a négyévi munka olykor mélypontokat sem nélkülöző időszakán – és szüleimnek, akik lehetővé tették, hogy idáig eljuthassak;
- témavezetőmnek, Dr. Fodor Péter professzornak, aki tanszékére meghívott és biztosította azt az anyagi és szakismereti háttérrel, melyre munkám épülhetett, lehetővé téve a nemzetközi megmértetést; aki valóban 24 órás rendelkezésre állásával, szabadidejét is ránk fordítva lendítette előre a PhD-képzés szekerét – és aki elviselte olykor önféjű viselkedésemet is...
- a nagybetűs TANSZÉK kollégáinak, akik elképzelhetetlenül sok területen segítettek kisebb vagy nagyobb mértékben munkámat: (1) Dr. Fodor Mariettának, aki annak idején (1995-ben) a kémia tanszékhez „láncolt”; (2) Dr. Pais István professzornak, aki már a diploma elkészítésénél mellettem „bábáskodott” és segítséget nyújtott az egyetemi évek lezárásánál; (3) A „Zsuzsi-triumvirátusnak”: Bertényiné Divinyi Zsuzsának, Fekete Zsuzsannának és Firisz Zsuzsannának, akik a „sok apróság” mellett több mint 2000 (!) ICP-mérést végeztek el számomra az évek során, szüntelen és megbízható referenciát jelentve kísérleteimhez; (4) Dr. Tóth Árpádnak, aki rendíthetetlen nyugalmaival és óriási általános kémiai szaktudásával a legelképzelhetlenebb helyzetekben is kiutat mutatott; (5) Dr. Kosáry Judit professorasszonynak, Stefanovitsné Dr. Bányai Éva tanárnőnek és Dr. Kiss Mártának, akik a biokémia felé hajló kísérleteim háttérét biztosították; (6) Szurduk Sándorné Zsófinak, Balogh Jánosnénak és Erős Juditnak, akik együtt dolgoztak velem a legunalmasabb mintaelőkészítési lépések során is;
- doktoranduszársaimnak: elsősorban Stefánka Zsoltnak, és a többieknek: Ipolyi Ildikónak, Bodó Erzsébet Tündének, Sörös Csillának és Abrankó Lászlónak, akik nélkül – módosulatanalitikai mérések hiányában – ez az értekezés egyszerűen létre sem jöhetett volna;
- a diplomázó hallgatóknak, név szerint Prunk Anikónak, Zubor Zsuzsannának, Csabai Zsuzsannának, Szabó Csillának és Mátyás Andrásnak, akik olykor engem, PhD-hallgatót is megszégyenítő szorgalommal végezték azokat a méréseket és kísérleteket, melyek ehhez az értekezéshez is szükségesek voltak;
- Tömöry Istvánnak, aki a számítástechnika „szünetmentes” szürke eminenciásaként minden elképzelhető informatikai gondot és problémát elhárítva járult hozzá ahhoz, hogy a számítógép valóban segítőként álljon rendelkezésre és ne rémálomként jelenjen meg;
- Dr. Woller Ágnesnek, aki PhD-tanulmányaim elején a kiindulópontként szolgáló kérdések tisztázásában játszott pótolhatatlan szerepet;
- Dr. Mester Zoltánnak, aki szakmai tanácsokkal és közleményekkel tette könnyebbé munkámat;
- a Matematika és Informatika Tanszéken Dr. Ittész Andrásnak és Dr. Ferenczy Antalnak, akik a statisztika útvesztőjében Ariadné-fonalát adták kezembe;
- a Sör- és Szeszipari Tanszéken Dr. Hoschke Ágostonnak, Rezessyné Dr. Szabó Juditnak, Hegyesné Vecseri Beátának, Dr. Nguyen Duc Quangnak, Bujna Erikának, Farkas Gabriellának és Mayer Ágnesnek, akik révén – sok egyéb mellett – még egy centrifugát is kölcsönkérhettem a mintaelőkészítési kísérleteim végrehajtásához, nem beszélve az anaerob fermentációs módszerekhez szükséges segédeszközökről és autoklávozási lehetőségről;
- a Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszéken Juhászné Dr. Román Mariannak és Perkátai Katalinnak törzsiszólási kísérleteimben nyújtott segítségükért;
- a Hűtő és Állatiermék Technológia Tanszéken Dr. Balla Csabának, Csukáné Nemes Mártának és Páztorné Huszár Klárának, akik mintáim liofilizálásában, szakirodalom gyűjtésében és szakfordításban segítettek;
- a Növényélettani Tanszéken Dr. Mészáros Annamáriának, aki a folyékony N<sub>2</sub> kezeléséhez szükséges segédeszközöket bocsátották rendelkezésemre;
- a Nyelvi Lektorátuson Bihariné Dr. Partos Máriának és Uray Katalin tanárnőnek, akik szakfordítói segítséget nyújtottak pályázataim elkészítéséhez;
- Szakács Gabriellának, aki külföldi utazásaim szervezésében (és elszámolásában) sietett segítségemre;
- a KÉKI Mikrobiológiai Osztályán Andrassy Évának és Csányi Júliának, a  $\gamma$ -besugárzással és mikrobiológiai vizsgálatokkal kapcsolatos kísérletekért;
- az OMMI munkatársainak a brazil dió előkészítése során nyújtott segítségükért;
- Dr. Rácz László tanár úrnak, aki a csiperkemintákat biztosította számunkra;
- köszönöm Dr. R. Lobiński, Dr. J. Szpunar (CNRS, Pau, Franciaország) és Dr. B. Michalke (GSF, München, Németország) fogadókészségét, mellyel külföldi ösztöndíjaim alapját szolgáltatták;
- Dr. Hlavay Józsefnek, Dr. Prokisch Józsefnek és Dr. Nyeste Lászlónak az elő- és főbírálat vállalásában és elkészítésében nyújtott segítségüket;
- a Széchenyi István Ösztöndíj Alapítványnak, a három hónapos müncheni ösztöndíj odaítéléséért;
- a Magyar Ösztöndíj Bizottságnak és Philippe Carlevan úrnak, a Francia Nagykövetség kulturális attaséjának, akiknek a két hónapos franciaországi ösztöndíjamat köszönhetem;
- végül, de nem utolsósorban a Magyar Állami Doktori Ösztöndíjat említem meg, mint a PhD-képzésem anyagi háttérét biztosító intézményt.