

Doktori értekezés a Ph.D fokozat elnyerésére

Gyakorlati megoldások a speciációs analitika minőségének biztosítására

Jelölt: Ipolyi Ildikó

Témavezető: Dr. Fodor Péter

Készült:

Szent István Egyetem

Alkalmazott Kémia Tanszék

Budapest, 2003

A doktori iskola

megnevezése: **Élelmiszer-tudományi Doktori Iskola**

tudományága: **Élelmiszertudományok**

vezetője: **Dr. Fekete András**

egyetemi tanár

tudomány(ok) doktora, az MTA doktora

Szent István Egyetem, Budai Campus, Élelmiszertudományi Kar

Fizika- Automatika Tanszék

Témavezető: **Dr. Fodor Péter**

az MTA doktora

Szent István Egyetem, Budai Campus, Élelmiszertudományi Kar

Alkalmazott Kémia Tanszék

Az Iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

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

Az iskolavezető jóváhagyása

A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

<u>TARTALOMJEGYZÉK</u>	1
<u>1. MEGJEGYZÉSEK</u>	3
<u>2. BEVEZETÉS</u>	5
<u>3. IRODALMI ELŐZMÉNYEK</u>	11
<u>3.1 Tervezés</u>	11
<u>3.2 Mintavétel, a minta tartósítása és tárolása</u>	12
<u>3.3 Részminta vétele</u>	14
<u>3.4 Mintaelőkészítés</u>	15
<u>3.4.1 Extrakció és roncsolás</u>	15
<u>3.4.2 Az extrakciós hatások meghatározása</u>	18
<u>3.4.3 A szekvenciális extrakció</u>	20
<u>3.5 Származékképzés</u>	21
<u>3.6 Elválasztás</u>	24
<u>3.7 Elválasztás utáni derivatizálás</u>	27
<u>3.8 Detektálás</u>	28
<u>3.9 Kalibráció</u>	30
<u>3.10 Az eredmények kiértékelése</u>	33
<u>3.11 A speciációs analitika minőségbiztosítása</u>	34
<u>4. CÉLKITŰZÉSEK</u>	39
<u>5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</u>	41
<u>5.1 Arzén és szelén speciációja a HPLC-AFS rendszerekkel</u>	41
<u>5.2 A BCR 3-lépéses szekvenciális extrakció időtakarékos változatainak kidolgozása</u>	49
<u>5.3 Környezeti minták metil higany és szerves ón tartalmának meghatározása GC-MC technikával</u>	52
<u>5.3.1 Metil higany meghatározás</u>	52
<u>5.3.2 Szerves ón meghatározás</u>	54
<u>6. EREDMÉNYEK</u>	57
<u>6.1 Tervezés</u>	57
<u>6.2 Mintavétel, minta tartósítása és tárolása</u>	60
<u>6.3 Részminta vétele – homogenitási vizsgálatok</u>	65

<u>6.4 Extrakció</u>	70
<u>6.5 Derivatizáció</u>	83
<u>6.6 Elválasztás</u>	83
<u>6.6 Elválasztás utáni derivatizálás</u>	91
<u>6.7 Detektálás</u>	98
<u>6.8 Kalibráció</u>	102
<u>6.9 A speciációs analitika minőségbiztosítása</u>	107
<u>7. ÖSSZEFOGLALÁS</u>	113
<u>8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK</u>	117
<u>I. MELLÉKLET - IRODALOMJEGYZÉK</u>	121
<u>II. MELLÉKLET - PUBLIKÁCIÓK</u>	135

1. MEGJEGYZÉSEK

A 'spiking' kifejezésnek, melynek jelentése az EU speciációs gyakorlatában és irodalmában nem egyenlő a standard addícióval, pillanatnyilag nincs magyar megfelelője. A hétköznapi labornyelvben leginkább a magyarított 'spikolás' terjedt el, mely azzal magyarázható, hogy az angol szótó használata a kifejezést egyértelművé teszi, s így nem igényel magyarázatot.

Kutató munkám legnagyobb részét a Szent István Egyetem Alkalmazott Kémia Tanszékén végeztem, ahol több, mint tíz éve folynak módszeranalitikai kutatások. Ezalatt az idő alatt számos esetben alkalmaztuk az ún. spikolást.

Doktori értekezésem keretén belül szeretnénk az angol 'spiking' kifejezésre a magyar 'adalékolás' kifejezést javasolni.

2. BEVEZETÉS

A nyomelemek fogalma a huszadik század elején terjedt el a tudományos életben, a természettudományban. A tudósok rájöttek, hogy léteznek olyan elemek, amelyek nagyon kis mennyiségben ugyan, de mindenhol jelen vannak környezetünkben. Arra a következtetésre jutottak, hogy ezeknek az elemeknek jelentős szerepük van az életfolyamatokban és alapvetően befolyásolják az anyagok tulajdonságait. Az elemek azonosításával azonban már nehézséget jelentett és a mennyiségi meghatározásuk még hatalmas feladatnak tűnt [1]. A huszadik század végére azonban a modern analitikai technikák már pikogrammmnyi és még kisebb koncentrációkat határoztunk meg megbízhatóan. Ma már az elemek kémiai formáinak meghatározását sem hagyhatjuk figyelmen kívül, mert már rendelkezünk azzal az ismerettel, hogy a kémiai forma határozza meg az elem tulajdonságainak nagy részét. Az analitikai kémia kémiai módosulatok meghatározásával foglalkozó ágát nevezzük módosulatanalitikának.

A módosulatanalitika ill. más néven kémiai speciáció, és a módosulat ill. kémiai speciesz fogalmaknak éveken át nem volt általánosan elfogadott definíciója. 2000 óta azonban egyezményesen, az IUPAC (International Union for Pure and Applied Chemistry) nevezéktana szerint a 'kémiai módosulat' kifejezés alatt az elemnek azt a specifikus formáját értjük, amelyet izotópösszetétel, oxidációs állapot és/vagy komplex- vagy molekulaszervezet határoz meg [2], míg a módosulatanalitika ezen specifikus formák meghatározását végzi.

Az elmúlt évek során egyre nagyobb teret nyertek a speciációs analitikai kutatások és egyre szélesebbé vált az elért eredmények felhasználóinak köre. Az egészségügy, a környezetvédelem és számos ipari ágazat, melyek közül az élelmiszeripart említhetjük első helyen, vált érdekelté éppúgy, ahogy a döntés- és törvényhozó szervek is [3]. Ennek az oka az, hogy mára a tudományos kutatások eredményei már teljes bizonyossággal alátámasztották, hogy a kémiai forma meghatározza az elemek bio- és geokémiai viselkedését, esszencialitását és esetleges toxicitását. Az elemek mobilitását, bioelérhetőségét, visszatartását és elraktározódását élő szervezetekben, élelmiszerekben és a környezetben az határozza meg, hogy milyen kémiai formában kerül az elem az adott rendszerbe, milyen átalakulásokon megy keresztül – pl. metabolikus folyamatokban –, milyen végső formát vesz fel és mely formában fejt ki hatását.

A módosulatanalitika intenzív fejlődése a speciációs információ számos előnyének köszönhető, melyeket a következőképpen foglalhatuk össze. Az összkoncentráció mellett az izotópeloszlás meghatározása információt nyújthat számos elem, mint például az ólom, geológiai eredetéről [4], míg az oxidációs állapot meghatározása az oldhatóságról és reakciókészségről [5]. Erre jó példa a króm, melynek hat vegyértékű formája toxikusabb, mint az összes többi oxidációs állapotban található formája, köztük a Cr(III), mely esszencialitásáról ismert. A fémtartalmú szerves

vegyületek esetén a kovalens kötések száma és jellege játszik meghatározó szerepet az elemek tulajdonságainak kialakításában. A tributil-ón toxikusabb vegyület, mint a belőle bomlástermékként keletkező di- és monobutil-ón, így a molekulaszervezet meghatározásából jelentős információkhoz juthatunk. A makromolekulákhoz való kapcsolódás ill. komplexképződés megszabhatja az elemek mobilitását, stabilitását és biológiai elérhetőségét (bioavailability) [6], s toxicitását is. Például a meglehetősen toxikus szerves arzén ionok egyszerű szerkezetüknek köszönhetően könnyen átjutnak a sejtmembránokon. Az arzenobetain egy makromolekulába épült forma, amely a biokémiai folyamatok számára könnyen elérhető szerves ill. egyszerűbb szerves formákból szintetizálódik, stabil és csak erélyes bontási folyamatok eredményeképpen válik szabadon hozzáférhetővé [7]. A speciáció tehát az összkoncentráció meghatározása mellett az elemek különböző formákban való eloszlását definiálja és nyújt információt a vizsgált minta esetleges toxicitásáról, egészségre ártalmatlan voltáról vagy esszencialitásáról.

A módosulatanalitikát nagyon sok esetben a 21. század analitikájának legnagyobb kihívásaként említik [8]. Az állításnak számos oka van. A természetes mátrixok jelentős hányadában már a nyomelemek összkoncentrációja is nagyon kicsi, mint például a humán szérumban a vanádium tartalma, mely ng L^{-1} tartományban esik. Ha a jelenlévő különböző kémiai formákat is azonosítani és mennyiségileg meghatározni szeretnénk, sok esetben ennek a koncentrációnak század, sőt ezred részével kell számolnunk, például az egyes biomolekulákban illetve mikroorganizmusokban. A rendelkezésre álló analitikai technikák ezzel az igénnyel még sok esetben nem tudnak megbirkózni. Az egyik cél tehát olyan módosulatanalitikára alkalmas rendszerek építése, melyek három – hat nagyságrenddel jobb kimutatási határral bírnak, mint a mai rendszerek. Nagyon sok nehézséget okoz az is, hogy nem ismerjük a módosulatok in situ biokémiai folyamatait. Nem tudjuk, hogy milyen közti termékeken át jutnak el végső formájukba, hogyan épülnek be a makromolekulákba és milyen mértékben hasznosulnak és ürülnek ki a szervezetekből. Ha mindekre lenne válaszunk, tisztábban látnánk azt is, hogy melyek azok a kérdések, amelyekre a módosulatanalitikának elsősorban választ kell adni és melyek azok a tudományterületek, melyek fejlődését az elemek specifikus formáiban való eloszlásának meghatározása előrelendíthetne. A sok megválaszolatlan kérdés és a tudományág jelenlegi aktív fejlődése számos esetben jelenti azt, hogy egy-egy speciációs feladatra csak egy speciációs analitikai módszer ismert. Így nehéz az eredmények helyességének ellenőrzése, a mérés hitelesítése és megbízható mérési eredmények szolgáltatása. Gondot jelent egyelőre még az is, hogy nem áll rendelkezésre sok elem számos kémiai módosulatának szintetikus változata és a mérések kalibrálása csak házilag szintetizált formával lehetséges. Ebben az esetben kérdés az előállított kémiai forma tisztasága.

Az analitikai műszer- és rendszerfejlesztések üteme gyors. A speciációs analitika fejlődése a természettudomány sok más területének fejlődésével összefügg és mint minden dinamikusan fejlődő tudományágban, egy megválaszolt kérdés három újabb kérdést vet fel, amely meghatározza a módosulatanalitika fejlődésének irányvonalát.

A speciációs analitika fontosságát a legjobban azzal tudjuk bizonyítani, ha olyan példákat említünk, melyek az érdeklődés középpontjában állnak. Vegyük sorra azokat az elemeket a periódusos rendszerben, amelyekkel a speciációs analitika az elmúlt évek alatt a leginkább foglalkozott, s foglalkozik és azokat a kérdéseket, melyekre a speciációs analitika segítségével kívánunk választ kapni. Kétségtelenül az arzént illeti az első hely.

Az arzén szervesetlen formái, az arzenit és arzenát rendkívül mérgező módosulatok [9]. Azonban az élő szervezetek nagy hányada – köztük az ember is – rendelkezik egy metilezési lépések sorozatából álló méregtelenítő mechanizmussal a szervesetlen arzénformák hatástalanítására, melynek eredményeképpen emlősökben mono- és dimetilezett formák keletkeznek [10], halakban és más tengeri élőlényekben a metilezett formákon kívül még arzenobetén és arzenokolin [11], algákban pedig elsősorban arzenocukrok széles palettája [12]. A felsorolt szerves arzénvegyületek nem toxikusak. Az még kérdéses, hogy a detoxifikálási folyamatok során nem alakulnak-e ki toxikus átmeneti termékek. A másik, eddig még megválaszolatlan és fontos kérdés, hogy vajon az elfogyasztott veszélytelen arzenocukrok az emésztés során nem alakulnak-e toxikus formákká.

A szelén-speciációs kutatások is hagynak maguk után kérdőjeleket. Meglepően nagy azoknak a publikációknak a száma, melyek a szelén rákmegelőzésben hatékony formájának ill. formáinak azonosítását tűzték ki célul [13]. Vajon a szeleno-aminosavak a sejtprotektív formák, vagy a szeleno-metionint és szeleno-ciszteint tartalmazó fehérjeláncoknak van sejtvédő szerepük?

A króm specieszek biokémiai szerepe és hatása is ismert. A szervesetlen hat vegyértékű formát erős citosztatikumként [14], míg a három vegyértékű formát a szénhidrát-metabolizmus máig ismeretlen összetételű glükóz tolerancia faktoraként tartják számon [15,16].

A higany más jellegű problémával szembesíti a kutatókat. A szervesetlen higany a táplálékláncba jutva erősen toxikus metilezett formákká alakul és felhalmozódik, jelentős veszélynek kitéve a csúcsragadozókat [17].

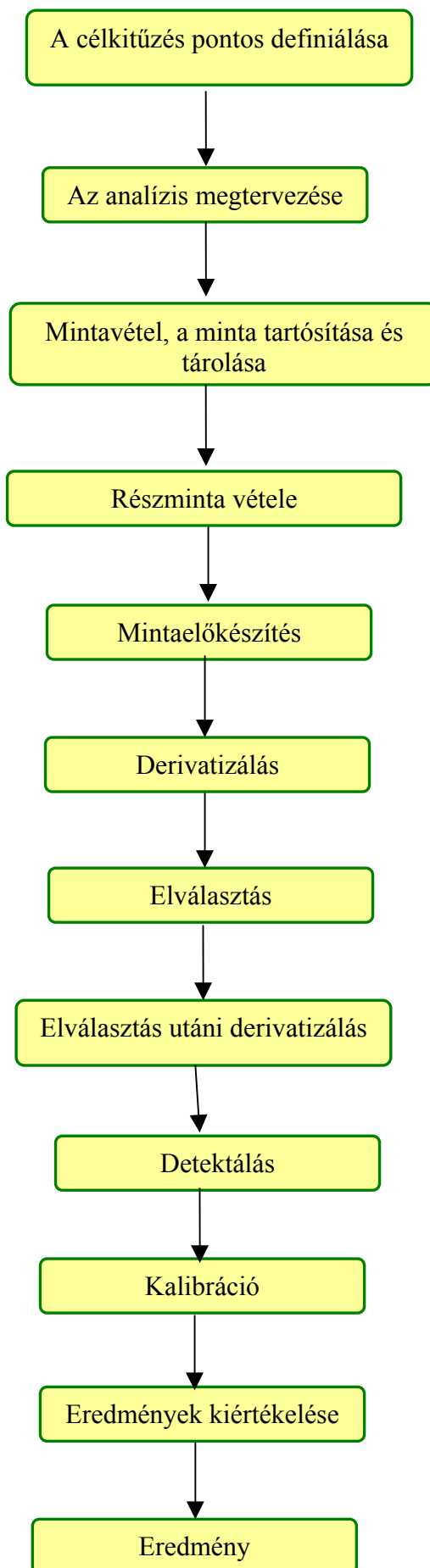
Az antropogén eredetű szerves-ón a széles körben elterjedt biocid használata miatt hatalmas tengeri ökoszisztémák egyensúlyát borítja fel [18] és még a mai napig nem mérhető fel, hogy mekkora az okozott kár és a szennyezés hosszú távon milyen terhet ró az emberi táplálkozásra. Akár évtizedekbe is telhet, mire ez kiderül. Erre is csak úgy van lehetőség, ha analitikai módszerekkel követjük a szerves ón vegyületek átalakulását.

A feltett kérdések nagy részére megbízható választ feltehetően csak az in situ speciáció biztosítana [8]. Ehhez azonban a nyomelem módosulatok kinetikájának átható ismeretére és piko-, sőt fentogramm kimutatási határral bíró módszerekre lenne szükség. Addig azonban még hosszú utat kell megtenni.

A már létező és egyre szélesebb körű igényeket kielégítő speciációs technikák minőségbiztosítása aktuális, sürgető kérdés. Sok életbevágóan fontos döntés függ az analitikai adatok megbízhatóságától, így ma már a speciációs eredmények megbízhatóságától is.

A módosulatanalitikában alkalmazott analitikai metodikák az esetek többségében többféle technikát ötvöznek. Így az extrakciótól az elválasztástechnikán keresztül az elemszelektív detektálásig terjedhetnek. Ezeket egytől egyig rendszeres hibák terhelik. Ráadásul mindegyik lépésnél számolni kell a kémiai módosulatok instabilitásával, nemkivánt reakcióba lépésével és átalakulásával, s a módszer minden lépését jelentősen befolyásolja a mintamátrix is [19]. Külön meg kell említeni a mintavétel és a mintatartósítás bizonytalanságát, hiszen az itt elkövetett hiba később már nem korrigálható [20]. Ha a módosulatanalitikát nem kellő körültekintéssel alkalmazzuk, könnyen vezethet hibás eredményekhez. A hiba pedig elsősorban nem az eredmények ismételhetőségében, hanem azok pontatlanságában rejlik – a valódi értéktől való eltéréstől, melynek eredményeként a következtetéseink helytelenek lehetnek [19]. Annak érdekében, hogy a módosulatanalitikára fejlesztett technikák alkalmazásánál a kémiai módosulat eredeti formája, illetve az azt őrző információ az analitikai eredmény megadásáig megmaradjon, a lehetséges hibaforrásokat már a tervezés stádiumában át kell tekintenünk és ki kell küszöbölnünk.

Minden minőségbiztosítási szempontot, amelyet elemek összkoncentrációjának meghatározásánál már rutinszerűen kezelünk, a speciációs analízisnél is figyelemmel kell kísérni, de a listát még ki kell egészíteni azokkal a különleges figyelmet kívánó problémákkal, melyek a kémiai módosulatok jellegéből adódnak. A speciációs technika általános lépéseit a 1. ábra szemlélteti, a lépéseket és lehetséges hibaforrásait a speciációs irodalom alapján az Irodalmi előzmények fejezet tárgyalja.



3. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

Ebben a fejezetben a speciációs technikák lépéseit, az azokban felmerülő lehetséges hibaforrásokat sorolom fel és irodalmi példákkal szemléltetem az 1. ábra logikáját követve.

3.1 Tervezés

Az analitikai mérések minden esetben, így a speciáció területén is gondos és körültekintő tervezést igényelnek. A mérés célkitűzésének meghatározása során figyelembe kell venni, hogy eredményeinknek mire és hogyan kell választ adniuk.

Már az alapvetően meghatározza a mérés menetét, ha az eredményt számszerűsítve, megbízhatósági tartománnyal együtt kell szolgáltatnunk vagy csak egy alkotó jelenlétét vagy hiányát kell igazolnunk. Ezek után az igények, a mérendő minta és a felhasználható műszerpark ismeretében mérlegelnünk kell a rendelkezésünkre álló infrastruktúra által nyújtott lehetőségeket. Ennek tudatában és a szakirodalom alapos ismeretében ki kell választanunk a módszert, mely a mérés céljának legjobban megfelel. Ha volt már a jelenlegihez hasonló feladatunk vagy fejlesztettünk már módszert a kérdéses alkotók meghatározására és képesek vagyunk a módszer rutinszerű alkalmazására, akkor a kidolgozott módszert kell használnunk. Ezen kívül számos speciációs mintaelőkészítés hosszadalmas és szűk határidők, különösen sok minta esetén, nem tennék lehetővé az alkalmazásukat.

A minta eltarthatósága is fontos tényező a tervezésénél. A speciációs minták tartósítása a specieszek eredeti állapotban való megőrzése és különböző tulajdonságai miatt meglehetősen bonyolult. A több oxidációs állapotban előforduló elemek egymásba alakulhatnak, a szerves vegyületek degradálódhatnak. A legjobb megoldás a mintavétel után a minták azonnali elemzése, de legalábbis tisztában kell lenni azzal, hogy mennyi ideig tartható el a minta úgy, hogy a módosulatok eredeti állapotukban maradjanak.

A speciációs méréseknél sokszor olyan kis koncentrációtartományok meghatározását kell elvégezni, hogy nem csak a műszerezettség, hanem a nem megfelelő labortisztaság is megakadályozhatja a mérés kivitelezhetőségét.

A mérések minőségbiztosítását át kell gondolni. Mennyire egyszerű a mérendő mátrix és van-e már hasonló mátrixokkal annyi tapasztalatunk, hogy kidolgozott protokollt alkalmazhatunk? Ha nem, akkor rendelkezésünkre áll-e az összes mérendő komponensre bizonylatolt hiteles anyagminta? Ha az sem, akkor hány lépéses standard addícióval lehet a mérési eredmény megbízhatóságát biztosítani?

Természetesen az összes többi paraméter mellett a mérés költsége sem elhanyagolható tényező. A következő alfejezetekből nyilvánvalóvá válik majd, hogy a speciációs feladatok fokozottan mátrixfüggőek és validált módszerek teljes újrapvalidálására lehet szükség egy-egy új mátrix esetében. A többlépéses standard addíció, különösen több komponensre drága és meglehetősen időigényes feladat. A speciációs CRM-ek, ha egyáltalán a kérdéses komponensre és mátrixra rendelkezésre állnak, költségesek.

3.2 Mintavétel, a minta tartósítása és tárolása

Az analízis folyamatában a mintavétel a legelső és legtöbb hibával terhelt lépés, ezért a mintavételt körültekintően meg kell tervezni. A mintavétel hibáit nem lehet standardokkal és etalonokkal megbecsülni, ezért megbízhatóan csak ismételt mintavétellel lehet korrigálni. Erre legtöbb esetben nincs lehetőség. Ez elsősorban a különleges biológiai minták esetén igaz, ahol nem áll elegendő minta rendelkezésre a mintavétel megismétlésére, mint például orvos-analitikai biopsziás minták, de sok esetben az ismételt mintavétel költsége is akadályozó tényező.

A tapasztalat azt mutatja, hogy a mintavétel mindenkor egy jelentős hibaforrás [20]:

- ha a mintarészlet nem reprezentatív az eredmény nem vonatkozik az egész anyagra;
- az eredmény függhet az analitikai módszertől, de mindig függ a mintavétel módjától;
- az analitikai módszerek egyre kisebb mintarészletet igényelnek, így a mintavétel hibái egyre nagyobb jelentőségűek;
- ha nincs egyéb előírás, az analitikus tapasztalatára kell hagyatkozni és a korábbi tapasztalatokon alapuló hasonló alkalmazásokat követni;
- ha a minta állapotának megítélésénél kétség merül fel, a mintát heterogénnek kell tekinteni;
- képzett személy végezze a mintavételt.

A fent említett hibaforrások a speciációs analitikához végzett mintavételre fokozottan érvényesek, amelyeket azonban még ki kell egészíteni:

A speciációs mintavételnél elengedhetelen szempont a mérendő elemek kémiai formáinak eredeti állapotban való megőrzése. Felmerül a kérdés, hogy már az eredeti közegből való kiemeléssel nem változtatjuk-e meg - és ha igen, akkor mennyire - az eredeti egyensúlyi vagy kvázi egyensúlyi viszonyokat, melyek következtében a módosulatok szerkezete megváltozhat. Például az elemek fehérjékhez, huminsavakhoz és üledékminták részecskéihez nem kovalensen kapcsolódó kémiai formáinak egyensúlya könnyen felborul akár kisebb pH, redoxipotenciál vagy az oldott oxigén koncentrációjának megváltozására [21]. Különleges edényzet és védő inertgáz

atmoszféra alkalmazása elegendő-e az eredeti állapot megőrzéséhez vagy mást is alkalmaznunk kell?

A körütekintő mintavétel után a specieszek eredeti állapotának megőrzését kell biztosítani az analízisig, illetve ismételt analízisek sorozatáig, melyekhez pontosan meg kell határozni a tárolási paramétereket. Gondosan meg kell választani az edényzetet, melyet a módosulatok stabilitásuk megőrzéséhez igényelnek – mindenképp számolva azzal, hogy ugyanazon elem különböző módosulatai is esetleg más edényzetben stabilabbak. A szerves módosulatok stabilitása legtöbb esetben kisebb, mint a szervetlen formáké [22]. Példákat lehet találni erre az irodalomban a szelénre [23] és a higanyra [24]. Az arzénre az ellenkezője igaz. Míg az arzenit és arzenát ionos formák szabadon dinamikusan egymásba alakulnak természetes környezetükben is – az átalakulás irányát a környezeti (pl.: pH) viszonyok határozzák meg –, a metilezett formák még az erős savas roncsolást is kibírják [25].

Az edényzet anyagán kívül a tárolási paraméterek a tárolási atmoszférát és a hőmérsékletet is magukban foglalják. Ezek meghatározását nehezíti, hogy a stabilitás erősen mátrixfüggő és módosulatonként eltérő, tehát semmiképp sem általánosítható. A szerves önvegyületek stabilitását a mintában, eredeti környezetükben nehezebb biztosítani, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on való tárolást igényelnek [26], míg mérésre előkészített derivatizált formában $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on is hónapokig eltarthatók. Ezzel szemben a metil-higany bármely alkilezett derivatizált formáját előkészítés után rögtön meg kell elemezni [27].

Mára általános gyakorlattá vált, hogy a biológiai és környezeti mintákat mélyhűtve $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, egyes speciális esetekben akár $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, tárolják [28]. Az eltarthatóság növelése érdekében a mintákat többnyire nem frissen, hanem különböző tartósítási eljárásokkal való kezelés után tárolják. A leggyakrabban alkalmazott a fagyasztva szárítás, sterilizálással kombinálva, mely a nem kívánt mikrobiológiai aktivitás és a biokémiai bomlás kiküszöbölését szolgálja.

Viztartalmú minták tárolására $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ alkalmazása az általános javaslat. Ez természetesen csökkenti az eltarthatóságot, de a mélyhűtés bizonyos módosulatok esetében irreverzibilis fizikokémiai változásokat okozhat. Például az arzénformák mélyhűtés során csapadékot képeznek és a kioldás nem mindig eredményezi a csapadék feloldódását is [28].

A stabilitási problémák a kalibráló oldatok tárolása esetén is ugyanúgy felléphetnek, mint a mintáknál. A több oxidációs állapotban előforduló elemek, mint például a Cr(III)/Cr(VI) és az As(III)/As(V) , a tárolási körülményektől – hőmérséklet, fényviszonyok stb. – függően a tapasztalat szerint egymásba alakulhatnak ill. az edények falán adszorbeálódhatnak [28]. A szerves módosulatok a szubsztitúció mértékétől függő sebességgel degradálódnak még szerves oldószerekben is [29]. A speciációs kalibrációs standard oldatokat tehát az összkoncentrációt hitelesítő oldatoknál gyakrabban kell frissen elkészíteni. Érvényes ugyan az ökörszabály: a

töményebb standard oldatok tovább tarthatók el [30]. Mivel a speciációs mérések általában nagyon kis koncentrációk tartományában történnek, a kalibrációs oldatok készítésénél arra is oda kell figyelni, hogy a lehető legnagyobb bemérési térfogatokkal dolgozzunk, ezzel csökkentve a bemérési hibát. Gondosan kell eljárni az egy elem több módosulatát, illetve több elem több módosulatát tartalmazó standard oldatok esetében is. Egy elem több specieszének jelenlétekor az egyik módosulat bomlása könnyen jelentheti a másik képződését, míg több elem több módosulatának jelenléte keresztreakciókat, például transzalkilációt is eredményezhet.

3.3 Részminta vétele

A vizsgálati mintarészlet a mintából kiválasztás vagy osztás útján nyert mintatarészlet; a minta egy részleteként választott egység, egy többlépcsős mintavétel utolsó egysége, melyet elemzés céljára választanak ki [20].

A speciációs analitikai mérések kimutatási határa ma már lehetővé teszi a kis mintamennyiség alkalmazását. Ez több szempontból is előnyös. A kisebb mintamennyiségnek kisebb a vegyszer-, így költségigénye, mely a speciációs előkészítéseknel a speciális mintaelőkészítések különleges vegyszerigénye miatt sokszor nagy is lehet. A kisebb minta:extraktum arány redukálja a mintaelőkészítéshez szükséges időt – különösen a több lépésből álló szerves mintaelőkészítéseknel. Például ha egy 1 g minta – 10 mL oldószerre optimált módszer 4 x 10 perc rázást és a minden rázást követően 10 perc centrifugálást alkalmaz a maximális extrakciós hatások eléréséhez, 0.2 g minta – 10 mL oldószer arányhoz valószínűleg a 2 vagy 3 lépés is elegendő, mely jelentősen csökkenti az előkészítés idejét. A kisebb mintamennyiséggel az analitikai rendszerbe juttatott mátrix zavarások mértékét is csökkenthetjük. Ez különösen fontos az analitikai rendszer beszennyezése, a memória-effektusok, a kromatográfiás kolonnák túlterhelése elkerülése érdekében is.

A mintamennyiség csökkentésekor azonban azzal is számolni kell, hogy minél kisebb a minta mennyisége, annál nagyobb az esélye annak, hogy a minta szennyezése torzítja a teljes mintáról adott képet. A kémiai módosulatok jellegéből adódik, hogy nagyobb mintamennyiség esetén a módosulatok eloszlása ugyan homogénnek tekinthető, de nagyon kis mintamennyiség esetén már nem. Különböző módosulatok feldúsulnak ill. könnyen adszorbeálódnak a minták specifikus részeiben. A szelénmódosulatok többsége, különösen a szelenoaminosavak az organizmusok fehérjedús részeiben halmozódnak fel és zsírban nem oldódnak [31], míg az arzénmódosulatok nagy része vízzoldható. Nagyon kis mintamennyiség alkalmazásakor nagyobb az esélye annak,

hogy éppen egy ilyen rész minta alapján jellemeznénk a mintánk egészét, amely torzított következtetésekhez vezethet. A minták homogenitása párhuzamos mérésekkel ellenőrizendő.

A speciációs analitika területén a (bizonylatolt) referencia mintákat kezelhetjük homogénnek. A hitelesítési folyamatnak szerves része a szigorú szabályoknak megfelelő homogenitás vizsgálat, mely azt szolgálja, hogy a minta alkalmazható legyen a rendszeres hiba becslésére minőségbiztosítási eszközként [32,33]. A rutin sorozatelemzéseknél azonban nincs mód és nem is várható el a CRM-hez hasonló homogenitás elérésére. A speciációs méréseknél a módszer precizitását párhuzamos mérésekkel határozzuk meg.

3.4 Mintaelőkészítés

3.4.1 Extrakció és roncsolás

A speciációs analitikában a kémiai módosulatok extrakciója összetett feladat. Először is azért, mert első pillantásra két egymásnak ellentétesnek tűnő, de a speciációhoz elengedhetetlen követelményt kell kielégítenie: (1) megfelelő kinyerési százalékot kell biztosítani, (2) de a módosulatok eredeti formában való megtartásával, tehát információveszteség nélkül [34]. A mérendő módosulatokat a lehető legnagyobb százalékban kell szerkezetváltozás nélkül elválasztani a zavaró hatásokat okozó mátrixtól. Mivel a fém specieszek, különösen a szerves formáik, igen erősen kötődhetnek a mátrixhoz – kovalensen, adszorpcióval ill. van der Waals kötéssel – az extrakció során jelentős energiát igényel. Ez az energia lehet termikus, kémiai, elektromágneses vagy akár más típusú, de semmiképp sem lehet akkora, amely a mérendő módosulatok szerkezetét megváltoztatja ill. az elroncsolásához vezet. Ez a legtöbb módosulat esetében nagyon szűk munkatartományt tesz lehetővé. Ha több módosulat egyidejű extrakciója a cél, és a speciációs feladatokban általában egyidejűleg legalább egy elem több módosulatának extrakciója a cél, akkor a több szűk munkatartomány közös pontjait kell megtalálni és kompromisszumos megoldást kell alkalmazni. A módosulatok eredeti formájának megőrzése mellett, ez legtöbbször a kinyerési hatások romlását eredményezi.

Az extrahálószer kiválasztása során az oldószer két feladatot lát el: a kötések felbontásával vagy az aktív helyekről való elválasztással felszabadítja a mérendő alkotót a mátrixból; és megakadályozza, hogy a mérendő és a mátrix újból kölcsönhatásba lépjen, readszorbeálódjon vagy esetleg irreverzibilisen komplexet képezzen. Az extrahálószer ezen két kritériumnak való megfelelését egy bizonyos mátrix egy bizonyos komponensére extrakciós hatásfoknak nevezzük [28].

Az extrahálószer a relatív dúsítás szerepét is elláthatja az előkészítés technikájában. Annyira kell a mérendő alkotót az extraktumba koncentrálnia, hogy ezzel a lépéssel annak koncentrációja az alkalmazott módszer kimutatási határánál nagyobb koncentrációban legyen [35]. Például, ha metil-higany biológiai mintákból való meghatározásához sósavas roncsolást és toluolos extrakciót alkalmazunk, akkor 0.5 g mintához 5 mL sósavat adunk, 10 mL nátrium-kloridot, és ezt a térfogatot 2x4 mL toluolba visszük át. Ezután a vizes cisztein fázisban való komplexképződés és derivatizálás után a meghatározáshoz 1 mL hexánban oldjuk a metil-higanyt [36]. Láthatjuk, hogy ebben az esetben 0.5 g minta metil-higany tartalmát 1 mL hexánba dúsítottuk. Míg az összkoncentráció meghatározásokhoz alkalmazott teljes roncsolások során általában 20-50-szeres hígítást érhetünk el, a fent leírt extrakciós technika csak 2-szeres hígítást eredményez. A módszerrel a teljes roncsoláshoz képest 10-25-ször nagyobb koncentrációt mérhetünk.

Az közleményekben számos, szerves ón vegyületek meghatározására alkalmas eljárásról olvashatunk. Ennek oka az, hogy a különböző ón-módosulatok polaritása és fiziko-kémiai tulajdonságai jelentősen eltérnek. Míg a monobutil-ón (MBT) erősen poláris és elsősorban ionos kölcsönhatással kötődik a mátrixban, a trifenilezett forma (TPT) lipofil tulajdonságú és a mátrixban jelentős van der Waals erők tartják [37]. Így olyan extrakciós módszert kell kidolgozni, ami a ónmódosulatok többségére jó extrakciós hatásfokot biztosít és mátrixok viszonylag széles körére is alkalmazható. Ezért a butilezett és fenilezett formák extrakciójára többnyire más extrakciót alkalmaznak.

Az arzén extrakciójával foglalkozó publikációk száma is jelentős. Mivel az As monoizotóp, ezért MS detektálásánál nincs mód izotóparány mérésén alapuló technikákkal kontrolálni az extrakciót. A legtöbb arzén forma vízzel oldható, 85° C-on 30-60 perces inkubálással a szervesetlen ionos – As(III) és As(V) – és a metilezett – MMAs és DMAs – alkotók 93 – 100 % -os hatásfokkal extrahálhatók [38, 39]. A túlnyomórészt tengeri élőlényekben előforduló arzenobetain, arzenokolin és az arzenocukrok sokasága pedig metanol-víz különböző arányú keverékében extrahálható több, mint 80 %-os hatásfokkal és viszonylag jó ismételtelhetőséggel ($RSD \leq 5\%$) [40, 41].

Az vizes és szerves extrakciós mintaelőkészítési technikákon kívül még meg kell említeni a biológiai mintáknál alkalmazott hidrolíziseket, melyek enzimeket ill. enzim keverékeket alkalmaznak vagy elfolyósítják a szövetet [42-47].

Az enzimatisz eljárások lehetnek egy lépésesek, egy enzimet vagy több enzim keverékét alkalmazva, ill. szekvenciálisak, amikor az enzimeket külön-külön alkalmazzák. A szekvenciális technikáknak hosszadalmasságuk ellenére nagy előnyük az enzimkeverékek alkalmazásához képest - ahol az egyes enzimek működési optimumát figyelembe véve kompromisszumos

optimumot kell alkalmazni -, hogy minden enzimet a saját optimumán tudunk felhasználni. Általánosságban az enzimes technikáknak az a nagy előnye, hogy specifikus és pontosan definiált bontást katalizálnak. Tehát ha az elemezni kívánt módosulatok közegét jól ismerjük és a megfelelő enzimeket jól alkalmazzuk, a nemkívánatos módosulat-roncsolódás esélye kicsi [48].

A speciációs analitikában leginkább a szelén módosulatok meghatározására alkalmaznak enzimes bontásokat. Elsőként Gilon és munkatársai próbálkoztak egy nem-specifikus proteolitikus enzim, a pronáz használatával élesztőminta szelén formáinak meghatározására [49]. Mivel az élő szervezetekben a szelén fehérjékbe épül szeleno-aminosavak formájában, a kísérlet reprodukálható kinyerési hatásfokot biztosított. Az úttörő próbálkozás óta számos kutatást végeztek, de a mai napig nem találtak olyan megoldást, még a szekvenciális, több enzimet alkalmazó módszereknél sem, mely 100 % -os kinyerést biztosítana. Ennek oka ill. okai még nem ismertek, de az alábbi feltételezéseket jelenleg vizsgálják. Előfordulhat, hogy vannak nem aminosav szerves szeleno-módosulatok a mintákban, amiket a mai modern szerkezetazonosító analitikai technikákkal majd definiálni lehet. Az is lehet, hogy az enzimes kezelés előtti lépések, mint például a szárítás, liofilizálás vagy fagyasztás és kiolvasztás, olyan fehérjeszerkezetet eredményeznek, melyet a proteolitikus enzimek nem tudnak lebontani. Végül arról sem szabad elfeledkezni, hogy a sejtalkotók, mint például a sejtfal, melynek a sejtre nézve protektív szerepük is van, nem feltétlenül engednek szabad utat az enzimnek a sejt belseje felé [50].

A szövet-elfolyósítós módszerekben leginkább tetrametil-ammónium hidroxidot (TMAH) alkalmazzák [44-46, 51]. A TMAH a szövetek teljes feloldását eredményezi és előnye, hogy az extraktumot tisztítás nélkül lehet a gázkromatográfiás oszlopokra injektálni, szemben a jelentősen erősebb alkáli lúgokkal – nátrium-, kálium-hidroxid –, melyek a módosulatokat is roncsolják, és az extraktumban jelentős az alkálifémek koncentrációja terhelik. Sajnos a folyadékkromatográfiás elválasztásoknál a TMAH jelentős retenciós idő változásokat okoz, melyet csak megfelelően nagy higítás alkalmazásával lehet kiküszöbölni [52].

A összkoncentráció meghatározásokhoz alkalmazott klasszikus roncsolási technikák a speciációban nem alkalmazhatók, mert a módosulatok eredeti állapotát a legtöbb esetben megváltoztatják. A arzén metilezett formái és a tengeri élőlényekben legnagyobb mennyiségben előforduló módosulat, az arzenobetén, királyvizes roncsolásnak is ellenáll, alkalmazása mégsem ajánlható, mert az arzenitet 100%-ban arzenáttá alakítja. A mintaelőkészítési technika egy lépcsőjeként szerves előkészítések is gyakran alkalmaznak savas ill. lúgos roncsolást. A metilhigany meghatározáshoz alkalmazott mintaelőkészítések első lépése általában egy lúgos - pl.: KOH-dal – vagy savas – pl.: 6 mol L⁻¹ HCl-val – roncsolás. A lépés azonban kritikus, mindenképp gondos optimálást igényel, hogy a maximális mátrixbontást érjük el, de a módosulatok eredeti formáját érintetlenül tartsuk.

3.4.2 Az extrakciós hatásfok meghatározása

A speciációs analitikában használt extrakciós technikákkal nem érünk el 100%-os extrakciós hatásfokot. Ezért bármi legyen is az extrakció elve, az extrakciós hatásfok meghatározása elengedhetetlen. Az összkoncentráció meghatározásánál az anyagmérleg meghatározása nélkülözhetetlen. Az összkoncentrációra vonatkozó extrakciós hatásfok meghatározásának menete a speciációs méréseknél semmiben sem különbözik az extrakciós hatásfok általános meghatározásának módjától. Megmérjük az extraktum és a minta koncentrációját, amiből egyszerű osztással kiszámítható az extrakció hatásfoka. Majd az oldhatatlan maradék koncentrációját is meghatározzuk és ellenőrizzük, hogy az extraktum és a maradék koncentrációjának összege a minta eredeti koncentrációját adja-e.

Az egyes módosulatok extraktumban mért koncentrációja nem korrigálható az összkoncentrációnál számolt extrakciós hatásfokkal, hiszen nem feltételezhetjük a módosulatok egyenletes eloszlását és egyforma extrahálhatóságát sem. Az extrakciós maradék ('residue') koncentrációjából nem lehet levonni a minta speciációjára vonatkozó következtetéseket.

Minél nagyobb a hatásfok, annál teljesebb képet kapunk a minta összetételéről és annak esetleges toxicitásáról. Például szelén speciáció esetén a kérdéses minta rákmegelőzésben és gyógyászatban potenciálisan betöltött szerepéről. Arról nem is beszélve, hogyha például kagylók arzén koncentrációjának meghatározásakor az extrakciós hatásfok csak 70 %, akkor az As tartalom 30%-áról nem tudjuk, hogy az nagyobb százalékban a meglehetősen toxikus As(III) vagy pedig a nem toxikus arzenobetain. Ha As(III), akkor a kagyló fogyasztása egészségügyi problémákat okozhat, míg ha arzenobetain, akkor nyugodtan fogyasztható.

A specieszek egyenkénti extrakciós hatásfokának meghatározására mind analitikai szempontból, mind az élettani hatások definiálásának céljából szükség van. Erre jelenleg három elfogadott és a speciációs analitikában alkalmazható megoldás van [28, 53, 54]:

- az ún. 'spiking' – spikolás ('adalékolás'),
- a minta ismételt extrakciója és
- a bizonylatolt referencia minták (CRM) használata.

Ha a mérendő módosulatok standardjei rendelkezésünkre állnak, a spikolás a legegyszerűbben kivitelezhető megoldás, még ha meglehetősen időigényes és munkaigényes is. A standard addíció minden egyes lépése – legtöbbször 3 vagy 4 - egy újabb elemzendő mintát jelent, ha párhuzamos mintákat is alkalmazunk, akkor akár 12 – 16 meghatározandó mintával is kell számolnunk. A legnagyobb hátránya azonban a munkaigény mellett az, hogy a mintához mesterségesen hozzáadott speciesz nem úgy kötődik a mintához, mint az eredetileg benne lévő speciesz. A szeleno-aminosavak az élő szervezetekben fehérjeszerkezetek szerves részei. A már nem élő,

szárított, homogenizált és mélyhűtött mintához mesterségesen hozzáadott szeleno-aminosavak nem épülnek be a fehérjeszerkezetekbe. Megfelelően hosszú – általában 24 óra [55] – kontakt időt hagyva a addicionált mennyiség és a mátrix egyensúlyának kialakulásához erős adszorpció ugyan kialakulhat, de integráció nem. Ennek pedig az a következménye, hogy az addicionált mennyiség könnyebben extrahálódik és nagyobb extrakciós hatásfokot eredményez.

A technika másik hátránya az, hogy mind a szerves, mind a szervetlen módosulatok többsége instabil, így a kontakt idő alatt - melyet általában szobahőmérsékleten biztosítanak - és az oldószer elpárolgatásakor az mintához adagolt mérendő módosulhat.

Az extrakciós hatásfok meghatározására alternatív standard addíciós megoldás a mérendő módosulattal kémiaiilag azonos, izotóppal jelölt módosulat alkalmazása és az izotóphigításos technika, melyeket egyre gyakrabban alkalmaznak [56]. Jelenleg a megfelelő izotópok hiánya és a nagy hatékonyságú tömegspektrometriás módszerek költsége még hátráltatja a szélesebb körben való elterjedésüket. Azt is meg kell említeni, hogy az izotóphigításnál alkalmazott standard oldatok ugyanúgy nem épülnek be a mátrixokba, mint bármely más addicionált komponens.

Annak ellenére, hogy a minta ismételt extrakciójakor nem kell a standard addíció hátrányaival számolni, a technika jelentős nehézségekkel jár. Előfordulhat, hogy az első extrakciós lépés olyan irreverzibilis változásokat eredményez a mátrixban, hogy a következő lépésekre megváltozik a minta extrahálhatósága. Ezen kívül számolni kell azzal is, hogyha a második extrakciós lépésben a célkomponens koncentrációja az alkalmazott analitikai módszer kimutatási határa alá esik, akkor hibásan azt a következtetést vonhatjuk le, hogy már az első lépés 100 %-os hatásfokot eredményezett. Könnyen előfordulhat az is, hogy az első extrakciós lépéssel egy lazán kötött frakciót 100%-ban extraháltunk, ezért a második extrakciós lépés nem ad mennyiségileg meghatározható eredményt, de a maradék még tartalmaz a módosulattól, de ennek kinyeréséhez például erősebb extrahálószerre lenne szükség [28].

A már említett két megoldás ismertetése után tehát megalapozottan állíthatjuk, hogy a kinyerési hatásfok meghatározására felsorolt három módszer közül a CRM-ek használatát ajánlatos választani. Természetesen ennek a megoldásnak is vannak határai. Az alkalmazott CRM mátrixának a lehető legjobban meg kell egyeznie a mérendő minta mátrixával, annak feldolgozottsági fokával és minőségével; a meghatározandó módosulatoakat pedig a mérendő mintával azonos nagyságrendben kell tartalmaznia nem addicionált, hanem természetes formában [57,58]. Mindezt egyszerre teljesíteni nagyon nehéz. Minél jobban sikerül megközelíteni, annál realisabb a CRM-re számolt extrakciós hatásfok alkalmazása a valódi mintára nézve.

3.4.3 A szekvenciális extrakció

Külön kell említést tenni a szekvenciális, más néven műveleti extrakciós, eljárásokról, melyeket a legújabb IUPAC nevezéktan szerint már frakcionálásnak hívunk [2]. A frakcionálás definíciója: mérendő vagy mérendők egy csoportjának osztályokba sorolása fizikai (pl.: méret, oldhatóság) vagy kémiai (kötési mód, reakcióképesség) tulajdonságok alapján.

A nyomelemek mobilitása, bioelérhetősége és az ennek megfelelően toxicitása nem csak a kémiai formájuktól, hanem lokalizációjuktól is függ. Az üledékekben, iszapokban és talajokban felhalmozódott fémek és fémvegyületek potenciális környezeti veszélyforrások azzal, hogy a vízbázisba és onnan a táplálékláncba juthatnak. Ahhoz, hogy felmérjük a fémek beoldódásának veszélyét és potenciális toxicitását, meg kell határozni a különböző kémiai formákat és/vagy a fémek és a hordozó közötti kötési mechanizmust [59]. Az elmúlt 25 év során számos műveleti extrakciós módszert fejlesztettek ki erre a célra, melyek különböző extrahálószerkeket alkalmaznak szekvenciális eljárást követve a fémformák kinyerésére [60-63]. Számos paraméter befolyásolja ezeknek a módszereknek a hatékonyságát. Ilyen maga az extrahálószer kiválasztása, annak koncentrációja és pH-ja, az extrakciós lépések száma, az extrahálószer és az extrahálandó anyag aránya, az extrakció mechanikája és ideje. A különbségekből adódóan a különböző szekvenciális extrakciós módszerekkel kapott eredmények nem összehasonlíthatóak. Ezenkívül sokáig gyenge pontja volt ennek az analitikai területnek, hogy nem volt bizonylatolt referencia anyag az analitikai munka minőségbiztosítására [64-67].

E kettős probléma megoldódott. Egy, az EU által támogatott projekt keretében, melynek célja a szekvenciális extrakciós eljárás harmonizálása volt, 18 laboratórium kifejlesztette a BCR három lépéses szekvenciális extrakciót és a procedura alkalmazásával egy tó üledék referencia anyagot hitelesített Cd, Cr, Cu, Ni, Pb és Zn tartalom meghatározására, a CRM 601-t. A folyamat reprodukálhatósága még a pontos szabályozás ellenére sem volt biztosított, így egy következő projekt a reprodukálhatóságot befolyásoló tényezők meghatározását és az eljárás ennek megfelelő módosítását tűzte ki célul.

Mára a BCR három lépéses extrakciót már számos mátrixon – pl.: ipari szennyezett talaj, szennyvíziszap, szállóhamu – alkalmazták sikerrel, geológiai bizonylatolt referencia minták jellemzésére is használták, és alkalmasságát a hat bizonylatolt fémen kívül U, Th, Ce és La meghatározására is bizonyították [68-73].

Míg a különböző szekvenciális extrakciós módszerek minőségbiztosítása nem volt megoldott, a CRM 601 együttes alkalmazása a hitelesített folyamattal bizonyosságot nyújt a folyamat megfelelő alkalmazásáról, és így az ismeretlen mintát jellemző adatok megbízhatóságáról. Ennek alapvető feltétele minden egyes lépésének szabályszerű, pontos betartása.

3.5 Származékképzés

A származékképzés elsődleges feladata az analitikai kémiában, elsősorban a gázkromatográfiában, a mérendő alkotó illékony formává alakítása. Mivel általában sem a szervetlen, sem a szerves fém-specieszek nem illékonyak, a speciációs analitikában a derivatizálást leginkább azoknál a technikáknál alkalmazzuk, ahol a mérendő módosulatok elválasztását a gázfázis képzése után végezzük [74]. Az illékonyság elérése mellett a derivatizálásnak az illékony komponensek megfelelő mértékű stabilizálása is feladata azért, hogy a gázkromatográfiás elválasztás hőmérsékletprogramja ne okozza a módosulatok bomlását az állófázison. Nem szabad elfeledkezni azokról a módszerekről sem, ahol a derivatizálás elsősorban a mintamátrixtól való elválasztást biztosítja, amellyel nem csak a detektálást zavaró mátrixhatásokat küszöböljük ki, de a komponens mintabeviteli hatásfokát is növeljük.

A legelterjedtebb derivatizálási módszerek a következők [28]:

- hidridfejlesztés,
- alkilálás Grignard reagenssel,
- alkilálás tetraalkil-borátokkal.

A hidridfejlesztést általában nátrium-tetrahidroborát (NaBH_4) végezzük, szakaszos és folyamatos rendszerben egyaránt [75]. A hidridfejlesztési körülményeket egyedileg szükséges optimalizálni a mátrixtól, a meghatározandó elemtől, speciációs technikák esetében pedig a meghatározandó speciesztől függően. A megfelelő sav kiválasztása, a NaBH_4 koncentráció és a pH beállítása után a folyamat vizes oldatból egy egyszerűen kivitelezhető pillanatreakció [76].

A hidridfejlesztés a származék és mátrixmentessége, valamint a mintabevitel nagy hatásfoka miatt nagy érzékenység elérését biztosítja. Kriogén csapdával való alkalmazása, mely a mérendő alkotót koncentrálja, az érzékenységet még tovább növeli [28].

A hidridfejlesztés hatásfoka elsősorban a mérendő módosulat oxidációs állapotától függő. Például míg a Se(IV) közvetlenül is 100 %-ban hidridképző; a Se(VI) meghatározása hidridfejlesztéses technikákkal csak a Se(VI) előzetes Se(IV) -é való redukciójával érhető el. Jelentősen csökkentheti a hidridképződés hatásfokát a mátrix nagy szervesanyag- és fémtartalma is [77], melyek közül biológiai mintáknál legalább az egyikkel, de többnyire mind a kettővel számolni kell.

A technikát a klasszikus hidridképző elemek specieszeinek meghatározásánál alkalmazzák a speciációs analitikában [78,79]. Leginkább az arzén esetében terjedt el, mert a szervetlen ionos formák (As(III) és As(V)) mellett a metilezett formák (MMAs és DMAs) is közel 100 %-os hatásfokkal képeznek hidridet; de a szelén és ón módosulatok meghatározására is alkalmazzák. Gyakorlatban mind a három elem szerves módosulatainak meghatározásánál, elválasztás – mind a

gáz- és a folyadékkromatográfiás megoldásoknál – után, on-line oxidációs roncsolást alkalmaznak a hidridfejleszthetőség biztosítása ill. a hidridfejlesztési hatásfok növelésére [80] (lásd 2.7).

A fémhidridek termikusan instabil származékok, így a nagy hőmérsékletet alkalmazó gázkromatográfiás módszerekkel nem határozhatóak meg.

A Grignard-reagensek alkalmazása a szerves ón és szerves ólom módosulatok meghatározása során terjedt el, az ionos szerves módosulatok származékképzésére alkalmazzák. Az irodalomban leggyakrabban említett Grignard derivatizációs reakciók a következők: metilezés metil-magnézium kloriddal (MeMgCl), etilezés etil-magnézium kloriddal (EtMgCl), propilezés propil-magnézium kloriddal (PrMgCl) és pentilezés pentil-magnézium kloriddal (PeMgCl) [81-84].

Az alkilezett származékok stabilak, így a hidridekkel ellentétben gázkromatográfiás módszerekkel is jól meghatározhatóak. A Grignard-reagensek alkalmazásának nagy előnye, hogy a reakció kevésbé érzékeny a mátrixhatásokra, mint a hidridfejlesztés, általában nagy hatásfokú, rendkívül gyors és mivel a Grignard-reagensek erőlyes származékképzők, ezért sem a reakcióidő, sem a hőmérséklet nem kritikus paraméterek a származékképzés folyamatában. A reagens koncentrációt általában $1\text{--}2\text{ mol L}^{-1}$ –re állítják be a reprodukálható származékképzési hatásfok biztosítása érdekében. A Grignard-reagens gondos megválasztása kritikus, hatékonyságuk módosulatonként változik és meghatározza a származék stabilitását. Sztérikus okok miatt a rövid láncú Grignard-reagensek, mint például a MeMgCl , könnyebben képeznek származékot; míg a hosszabb láncú reagensek használatának az az előnye, hogy általában olyan stabil származékokat adnak, melyek előkoncentráltat szolgáló párologtatási lépésnél nem okoznak veszteséget [85].

A eljárás a gyakorlatban rendkívül összetett. Az ionos szerves fémmódosulatot szerves fázisba, hexánba vagy izo-oktánba extraháljuk a vizes fázisból, többnyire komplexképző – pl.: dietil-ditiokarbamát (DDTC) – alkalmazásával. A Grignard reagens adagolása után pár perccel a reakció végbemegy, majd a reagens feleslegét elroncsoljuk, ami általában néhány csepp víz hozzáadásával történik. A lépés meglehetősen heves reakciót eredményez, a veszteséget csak a reakcióedény megfelelő hűtésével ill. plusz oldószer hozzáadásával akadályozzuk meg. A mintát még a mérés előtt tisztítjuk (clean-up) [86]. A módszer bonyolultsága miatt számos lépésben hordozza a szennyeződés és mintaveszteség esélyét, ezért alkalmazása nagy szakértelmet és körültekintést kíván. Megemlítendő, hogy nagy kéntartalmú mátrixokból a Grignard derivatizálás során dialkil mono-, di- és triszulfidok képződnek, melyek láng- és tömegspektrometriás detektálásnál zavaró hatásokat okozhatnak [87].

A tetraalkil-(és aril-)borátok alkalmazása áthidalja a NaBH_4 és a Grignard reagensek alkalmazásánál felmerülő problémákat. A szerves módosulatokból is nagy hatásfokkal képeznek származékot; a létrejövő alkilezett származékok stabilabbak, mint a hidridek; a Grignard-

reagensekkel ellentétben vizes oldatban is alkalmazható, ami lehetővé teszi az *in situ* alkalmazást, így csökkenti a szükséges lépések számát, a szennyezés és a veszteség esélyét. A pozitívumokkal szemben meg kell említeni, hogy a származékképzés hatásfoka általában kisebb, mint a Grignard-reagensek használatakor [88].

A származékképzést többnyire vizes oldatban, az extraktumban végezzük. Az elemzésre szánt szerves fázist – hexán vagy izo-oktán – a származékképzővel egyidejűleg adagoljuk, mely a keletkező komponenseket oldja és gázkromatográfiás meghatározásra alkalmassá teszi. Például a metil-higany meghatározására alkalmazott egyik technika a savas roncsolást és a toluolos extrakciót követően a módosulatot cisztein vizes oldatába extrahálja vissza, majd az extraktum savanyítása és hexán hozzáadása után nátrium tetraetil-boráttal (NaBEt_4) származékot képez és a hexán fázist elemzi [89].

Tapasztalat szerint e technikánál a mintaextraktum pH értéke és a származékképző koncentrációja a kritikus paraméterek. Például a szerves önvegyületek származékképzése pH=4-5 értéknél a legnagyobb hatásfokú. Kisebb pH-n a származékképző gyorsan bomlik, nagyobb értéken pedig a reakció nem megy végbe [90]. A származékképzőt mindig több nagyságrendnyi feleslegben adagolják. Ezzel az *in situ* alkalmazásnál jelenlévő mátrix fém és szervesanyag koncentráció származékképző hatását is kompenzálni lehet, bár a mátrixhatás csökkentése érdekében egyre gyakrabban elválasztják az extraktumot a mintától származékképzés előtt.

A legelterjedtebb alkil-borát származékképző a NaBEt_4 , különösen szerves ón, ólom és higany módosulatok meghatározására [91]. Tudományos közlemények olyan alternatív származékképző reagensek sikeres alkalmazását is bemutatják, mint a nátrium tetrapropil-borát (NaBPr_4), a tetrabutil ammónium tetrabutil borát (NaBBu_4) és a nátrium tetrafenil borát (NaBPh_4) [92-94]. Bár az utóbbi származékképzők nem minden elemnél alkalmazhatóak, előnyük, hogy kevésbé illékonyak, mint a NaBEt_4 , így ha a mintaelőkészítés koncentráló lépést is magában foglal, kisebb a mintavesztés esélye. A propilborátot azért kell megemlíteni, mert alkalmazásával sikeresen fejlesztettek ki olyan módszert, mely szerves ólom és ón módosulatok egyidejű meghatározására is alkalmas. A különböző elemek módosulatainak teljesen eltérő karaktere miatt az egyelemes módszerek terjedtek el, a szimultán speciáció különleges megoldásnak számít. Mivel a NaBPh_4 gyenge származékképző, szerves ón és ólom alkotók illékonyá tételére nem alkalmas. Metil-higany származékképzésénél viszont a kis reakciókészség válik előnyére a NaBEt_4 -tal és a NaBH_4 -el szemben. Jelentős gondot okoz ugyanis a metil-higany meghatározáshoz alkalmazott mintaelőkészítéseknél a metil-higany véletlen előállításának veszélye (ún. műtermék képződés) [95, 96]. A jelenség számos technikát terhel, a NaBPh_4 csekély reakciókészsége viszont minimálja előfordulásának esélyét [97].

Az elmúlt években több publikáció jelent meg olyan kísérletekről, melyek a származékképzési reakciót az extrakcióval egyidejűleg vitték végbe mikrohullámú energia illetve ultrahang alkalmazásával [98] annak érdekében, hogy csökkentsék az időszükségletét és a sok lépéssel járó veszteség- és szennyezésforrásokat. A paraméterek sokaságának kompromisszumos optimalása ígéretes eredményeket nyújtott, de a származékképzés hatásfoka a hagyományos kivitelezés hatásfokát nem érte el.

A ma már elterjedt nagy felbontású, kis kimutatási határral bíró és egyidejűleg több izotóp meghatározására alkalmas ICP-MS technikák és a szerkezetazonosításra is alkalmas ES-MS/MS készülékek folyadékkromatográfiával kapcsolva további fejlesztési lépésekkel lehetővé tehetik a derivatizációs lépés elhagyását és új nagy hatékonyságú alternatív technikák fejlesztését.

A származékképzés kétségtelenül a speciációs analitika egyik legbonyolultabb és legkritikusabb lépése [81]. Összetettsége miatt hosszadalmas, megfelelő hozzáértést igényel és nagyon sok hibaforrást tartalmaz. A sokféle vegyszer és edényzet mind potenciális szennyezőforrások. A lépések száma és a reagensek ill. származékok illékonyága miatt sok pontban léphet fel veszteség.

A derivatizációs hatásfok meghatározása bonyolult feladat, mert a származékképzés erősen mátrix- és meghatározandó-függő és nincs egyelőre olyan módszer, mellyel teljes folyamatot megbízhatóan nyomon lehetne követni. Ezenkívül az mérendő alkotó és a származékának kémiai jellege jelentősen különbözik, így a kalibrációhoz és a származékképzési hatásfok meghatározásához mindkét komponensre szükség van. Ezek a kereskedelemben nem minden esetben elérhető vegyületek, és laboratóriumi előállításuk – házi szintetizálásuk - újabb hibaforrást visz a speciáció folyamatába. A szerves fémmódosulatok gyakran instabilak, ezért a hosszadalmas folyamat során, bomlásuk mellett, egymásba alakulásukkal is számolni kell.

3.6 Elválasztás

A speciációs analitikában erre a célra leginkább három technikát alkalmaznak: a gázkromatográfiát (GC), a folyadékkromatográfiát (LC) és a kapilláris elektroforézist (CE).

A gázkromatográfia előnye a jó elválasztási képesség, az egyszerű összekapcsolhatóság detektorokkal. A technika rendkívül érzékeny, különösen kapilláris kolonnákkal és szelektív detektorokkal alkalmazva, amilyen a tömegspektrométer (MS), a lángfotometriás - (FPD), az elektronbefogósos - (ECD) és az atomemissziós detektor (AED). A gázkromatográfiás elválasztáshoz a mérendő módosulatoknak megfelelően illékonyaknak, de termikusan stabilnak kell lennie, ami a derivatizációs technikákkal biztosítható [82].

A mérendő módosulatok sikeres extrakciója és derivatizációja után a gázkromatográfiát alkalmazó speciációs módszereknél azokkal a nehézséggel kell számolni, amelyek a szerves analíziseknél általában fellépnek. Ezek a következők lehetnek: (1) csúcsszélesedés (tailing), ami származhat az állófázis szennyezettségéből és a komponens szélesebb hőmérséklet tartományban való illékonyságából; ill. abból, hogy a hőmérséklet-program és a komponensek illékonysága nincs megfelelően összehangolva, s a komponens termikusan bomlik az állófázison; (2) mátrixhatás, amely a standardoldatok után injektált valódi minták csúcsainál intenzitáscsökkenést okozhat; és (3) a rendszer rendkívüli tisztaság és inertség igénye, mert a kolonnákat és a detektorokat nagyon könnyű beszennyezni, de annál nehezebb tisztítani [99].

A nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiának (HPLC) nagy előnye a gázkromatográfiás módszerekkel szemben, hogy nincs szükség bonyolult derivatizációs lépésre a nem illékony ill. a nem ionos szerves módosulatok elválasztásához [100]. Az elválasztási hatékonysága nem ér fel GC-ével és egy elem különböző karakterű – anionos, kationos – módosulatainak elválasztásához különböző elven alapuló technikákat kell alkalmazni. A szerves fémmódosulatok elválasztására az ioncserén (anion- és kationcserélő) és ionpároképzésen alapuló elválasztástechnikák a megfelelőek. Például a leggyakrabban meghatározott arzénmódosulatok – az As(III), As(V), MMAs és DMAs [101] – jó hatékonysággal elválaszthatók ionpároképzővel kondicionált C-18-as oszlopon. Ez a technika viszonylag olcsó megoldást kínál a négy módosulat elválasztására, ellenben a tengeri eredetű mintákban legnagyobb mennyiségben előforduló arzenobetain, arzenokolin és arzenocukrok elválasztására nem alkalmas. A közelmúltban olyan ionkromatográfiás módszereket fejlesztettek ki, melyek közel egy órás gradiens program alkalmazásával, 12-17 különböző ionos karakterű As módosulat mennyiségi meghatározását teszik lehetővé nagy felbontású detektor segítségével [102].

A méretkizárásos (SEC) technikát is egyre gyakrabban alkalmazzák szerves arzén és szerves szelén módosulatok elválasztására, melynek az előnyei a többi HPLC technikával szemben: tolerálja az összetett biológiai mátrixokat, viszonylag kis áramlási sebességeket alkalmaz ($0.7-1 \text{ mL perc}^{-1}$) és nincs szükség a mozgó fázis pufferrel való beállítására, melyek általában gondot okoznak mind a láng atomabszorpciónál, mind a plazma technikáknál. A SE-HPLC-t gyakran alkalmazzák extraktumok frakcionálására a speciációs analitikában és a kapott méret szerinti frakciókat különböző elven működő kromatográfiás módszerekkel tovább elemzik. Ez esetben azzal a hátránnyal mindenképpen kell számolni, hogy a módszer elve, a méret szerinti elválasztás általában csak a viszonylag nagy fehérjékre és poliszacharidokra igaz. A kisebb módosulatok – különösen a nagy tömeg/töltéssel jellemezhetők – esetén azonban másodlagos adszorpció és ioncsere léphet fel, mely jelentősen befolyásolja az elválasztás minőségét [6].

A kapilláris elektroforézis (CE) az egyik legújabb és az egyik legtöbb technikai gondot okozó elválasztástechnika ma a speciációs analitikában. Ionos módosulatok elválasztására alkalmas. Előnye a kicsi, μL nagyságú mintafelhasználás, mely különösen a kis térfogatú biológiai minták esetén érvényesül. Az elektromos tér erő változtatásával egy futtatásban az anionos és kationos formák elválasztása megoldható. Detektorokkal való összekapcsoláskor éppen ez az előny okoz technikai gondokat [103]. Rendkívül érzékeny detektorokra van szükség, hogy az amúgy is kis mennyiségben jelen levő módosulatókat a kis mintamennyiségekből ki tudja mutatni; és olyan speciális mintabeviteli egységek alkalmazását igényli, amelyek érvényesítik a kis mintamennyiség előnyét. Az új generációs ICP-MS készülékekkel kapcsolva, különösen a percenként μL mennyiségeket hasznosító mikro- ill. direkt- porlasztókkal – mint például a mikrokonzentrikus porlasztó (MCN), nagy hatékonyságú porlasztó (HEN), direkt befecskendezéses nagy hatékonyságú porlasztó (DIHEN) - felszerelve jelentős eredményeket értek el több elem speciációja terén [104-107].

A általános elválasztástechnikai problémákon túl mindhárom technika alkalmazásakor gondot okoz a detektorokkal való összekapcsolás, a megfelelő felbontású elválasztást biztosító, de a detektor optimális működéséhez szükséges térfogatáramok összehangolása. Például az atmoszférikus nyomáson működő ionforrásokkal – pl.: induktív csatolású plazma – a leggyakrabban alkalmazott hagyományos porlasztók - Babington-, Meinhardt- és szögporlasztók - nem alkalmasak a CE kis, $\mu\text{L min}^{-1}$ -es térfogatáramának porlasztására. Ezzel szemben a nagy hatékonyságú hidraulikus nagynyomású porlasztónak (HHPN) és az ultrahangos porlasztónak (USN) optimális működéséhez nagy folyadékáramot kell biztosítani ($\geq 1 \text{ mL min}^{-1}$), amely folyadékkromatográfiával kapcsolva az elválasztás minőségét ronthatja [101].

A speciációs analitikában külön gondot jelent, hogy a módosulatok azonosítása kizárólag a retenció időn alapul, ha nem molekulaszervezet megállapítására alkalmas készüléket alkalmazunk [108]. A retenció időt standard oldatok segítségével lehet meghatározni. A mintáról mintára változó mátrix jelenléte azonban megváltoztathatja a retenció időket. Ennek ellenőrzőre standard addíciós módszer alkalmas. A mátrixhatás minimalizálására mindenképp törekedni kell. Ez a minta többszörös hígításával érhető el legegyszerűbben. Alkalmazásakor azonban sokszor kiemelkedően nagy érzékenységre van szükség.

A speciációs standardok hiánya jelent még sok esetben gondot, különösen szerkezetazonosításra alkalmas detektor hiányában. Ha a standardok elérhetőek, de nincs lehetőség szerkezetazonosításra és megfelelő bizonylatolt referenciaanyag sem áll rendelkezésre a módosulatok azonosítására, két különböző elven működő kromatográfiai módszer alkalmazása kínálhat minőségbiztosítási alternatívát. Az ismeretlen csúcsok azonosításában azonban ez a megoldás sem jelent előrelépést.

3.7 Elválasztás utáni derivatizálás

Számos speciációs technika megköveteli a folyadékkromatográfiás módszerrel elválasztott alkotók derivatizációját egyrészt a vegyület azonosítása másrészt a technika érzékenységének növelése érdekében. Példa mind a két feladat egy rendszerben való megoldására a Se módosulatok meghatározása HPLC-AFS rendszerrel. Az szeleno-aminosavak – szeleno-metionin (SeMet), szeleno-cisztin (SeCys), szeleno-etionin (SeEt) – és Se(IV) és a Se(VI) ionos formák a hosszú apoláris láncsal rendelkező kvaterner ammónium só - pl.: didodecil-dimetil-ammónium bromid (DDAB) – alkalmazásával, ionpároképző kromatográfiával elválaszthatók, és az igen érzékeny AFS detektorral meghatározhatók. A nagy hatékonyságú porlasztásos mintabeviteli technikák – pl.: hidraulikus nagynyomású porlasztó (HHPN) és ultrahangos porlasztó (USN) – azonban, 40-50 %-os mintabeviteli hatásfokuk ellenére nem biztosítanak megfelelő érzékenységet vizsgálandó minták Se speciációjára. A hidridfejlesztés 100%-os derivatizációs mintabevitel technika és biztosítja a mátrixtól való teljes elválasztást, így a HPLC-HG-AFS rendszer kiváló érzékenységűvé válik. A Se(VI) nem, a szelenoaminosavak pedig nem egyenlő mértékben hidridképzőek. Megfelelő on-line roncsolással azonban megfelelően savas pH beállítása után redukció és on-line mikrohullámú ill. UV-besugárzásos technikákkal 100 %-osan hidridképző Se(IV) formába hozhatók [76].

Említést érdemelnek azok a módszerek is, melyek folyadékkromatográfiás elválasztás után spektrofotometriás detektorokkal meghatározható komponenseket hoznak létre on-line származékképzéssel. A két szervetlen ionos krómmódosulat (Cr(III) és Cr(VI)) elválasztás és on-line oxidáció után difenil-karbazidos származékképzéssel tehető spektrofotometriás detektálással meghatározhatóvá [109]. A megoldás hátránya a folyadékkromatográfiát és spektrofotometriát kapcsoltan alkalmazó technikákhoz hasonlóan az, hogy a szerves fémmódosulatok meghatározására a természetben előforduló minták koncentrációtartományában nem elég érzékenyek.

Az elválasztás utáni derivatizáció speciációs rendszerek esetén mindenképpen on-line megoldást jelent. Ennek megfelelően nem lehet olyan bonyolult, mint a gázkromatografálásra alkalmassá tevő származékképzési reakciók, de a megfelelő fizikai, kémiai kondíciókat – pH, hőmérséklet, energiaközlés stb. - itt is biztosítani kell. Mivel mindezt zárt rendszerben kell megoldani úgy, hogy a már véghezvitt elválasztás ne változzon – ne legyen jelentős csúcsszélesedés ill. csúcsok ne mosódjanak össze -, az optimalás szűk határok közé szorul és a kompromisszumos optimumot nehéz meghatározni. Azt sem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a rendszerben szimultán, de legalábbis közvetlenül egymás után több folyamat megy végbe: a roncsolás, a származékképzés, s

ezek részfolyamatai. A részfolyamatok hatásfokát így nehéz megállapítani, és az esetleg felmerülő gondok okát hosszadalmas megtalálni.

3.8 Detektálás

Míg a speciációs irodalomban számos detektor alkalmazásáról olvashatunk, mindenképpen az elem-, ill. molekulaszpecifikus detektorok használata előnyös. Ellenben detektálási módszer elvi elemspecifikussága nem minden esetben jelenti, hogy a mért integrált intenzitás csak a speciesz koncentrációjával arányos. Már a kalibrációnál is követhetünk el hibát és mivel a detektálási eljárások többsége mátrixfüggő, valódi minták mérésénél az alábbi zavaró hatások - a mintabeviteli és az atom- és ionképződési, a spektrális és az iontömeginterferencia, a nem tökéletes háttérkorrekció – mind befolyásolhatják a jelintenzitást [110].

Az optikai detektoroknál – atomemissziós, atomabszorpciós és láng fotometriás – a mért elem jellemző hullámhosszán megjelenő háttéremisszió jelentős gondokat okozhat, meg is akadályozhatja a nagyon kis koncentrációk meghatározását [111,112]. Speciációs kapcsolt rendszereknél pedig, főleg nem ismert retenciós idővel megjelenő csúcsoknál, mindenképpen meg kell bizonyosodni, hogy a mért jelet a mérendő adja és nem az interferenciák. Atomemissziós detektálásnál az atom jellemző spektrumvonalának vizsgálatával, vagy ha mód van rá, alternatív technika alkalmazásával lehet erről megbizonyosodni.

Az atomfluoreszcens detektálás a speciációs analitikában a hidridfejlesztő elemek módosulatainak meghatározásában terjedt el, érzékenységének és viszonylag kis üzemeltetési költségének köszönhetően. Ennél a technikánál, különösen ha mintabeviteli egységként hidridfejlesztést alkalmazunk, nem kell spektrális interferenciákkal számolni és nagyon jó kimutatási határok elérésére ad lehetőséget. Nagy hátránya ellenben, hogy egyszerre csak egy elem meghatározására alkalmas, tehát multielemes speciációs rendszerek építésében nem alkalmazható [76,113,114].

Napjainkban az ICP-MS a speciációs analitikában legelterjedtebben alkalmazott és legérzékenyebb szimultán multielemes elem (tömeg) specifikus detektor. A legnagyobb számban még mindig az ICP-kvadrupol-MS-t alkalmazzák [115-117], de egyre több a gyakorlati alkalmazása a repülési idő ICP-TOF (time-of-flight)-MS-nek [118-121], az új generációs nagy felbontású ICP-HR(high resolution)-MS-nek [122], az ICP-SF(sector-field)-MS-nek [123,124], a tranziens jelek izotóparányainak szimultán mérésére alkalmas ICP-MC(multicollector)-MS [123,125], a spektrális interferenciák csökkentésére kifejlesztett dinamikus reakció cellát alkalmazó ICP-DRC(dynamic reaction cell)-MS-nek és az ütközési cellát alkalmazó ICP-collision cell-MS-nek [126]. Az ICP-TOF-MS előnye, hogy gyors jelek szimultán multielemes

speciációjára is alkalmazható, de kimutatási képessége rosszabb, mint a kvadrupól készüléké. A nagy felbontású készülékek érzékenysége és kimutatási határai már lehetővé teszik az olyan zavaróhatások elválasztását a mérendő jeltől, amire előtte nem volt lehetőség. A dinamikus reakció cella alkalmazása a spektrális zavarások kiküszöbölésében nagy előrelépés, megfelelő reakciógáz alkalmazásával olyan elemek is meghatározhatók nyomnyi mennyiségben, melyeket a plazmában keletkező molekulaionok jelenléte eddig nem tett lehetővé. Itt kell megemlíteni az arzént, mely monoizotópos elem ($m/z=75$) és tömegszámán nagy mértékben jelentkezik az argon plazmában keletkező $ArCl^-$ molekulaion jele, ami az As meghatározását megnehezíti minden ICP-MS készülékben, főleg nagyon kis koncentrációknál. A szelén esetén a meghatározást az akadályozza, hogy az elem intenzívebb izotópjai, $m/z=78$ és $m/z=80$, spektrális zavaróhatásokkal terheltek, míg a kevésbé érzékenyek, $m/z=74$, 76, 82, nem biztosítanak elegendő érzékenységet a nagyon kis koncentrációban jelen levő szelén módosulatok kimutatására.

Az új generációs készülékek nagy előnye, hogy nagy felbontóképességükkel és a spektrális zavaróhatások kiküszöbölésével biztosítják az izotópmérésekhez szükséges stabilitást, és lehetővé teszik az izotóphígítás előnyeinek kiaknázását.

Az ICP-MS készülékek megfelelő mintabeviteli egységek alkalmazásával mind gáz- és folyadékkromatográfiás technikákkal, mind kapilláris elektroforézissel kapcsolva megbízható speciációs rendszerek összeállítását teszik lehetővé. Az induktív csatolású plazma nagy energiájával a kémiai kötéseket elroncsolja és a detektálási célnak megfelelően ionokat állít elő [115]. Ezzel azonban elroncsolja a specieszeket és így azt az információt, melyet az egész analitikai művelet sor alatt, a speciáció eredeti gondolatköre szerint próbáltunk megőrizni. A specieszre jellemző információt tehát vagy az elválasztástechnikából – retenciós időre alapozva – vagy szerkezetazonosításra alkalmas molekula-tömegspektrométerek párhuzamos alkalmazásával biztosíthatjuk.

A GC-MS használata már széles körben elterjedt a speciációs analitika bizonyos feladataira – pl.: ón-, ólom- és higanyspeciáció, az LC-MS-ről azonban még nem mondhatjuk el ugyanezt. Mindkét technika előnye, hogy a speciesz molekulaszervezetéről tömegspektrum formájában nyújt információt.

Az elválasztásnál már szó esett arról, hogy két vagy több különböző elven működő elválasztástechnika alkalmazása kínálhat minőségbiztosítási alternatívát a csúcsok azonosítására. Ugyanígy két különböző elven működő detektor párhuzamosan kapcsolása is megoldás lehet a mérési eredmények minőségbiztosítására egy speciációs rendszerben, ha ezt a kimutatási határok lehetővé teszik [127].

Készülékek széles köre áll rendelkezésünkre speciációs feladatok megoldására, ezért detektorválasztás fontosságáról is említést kell tenni. A detektornak elsősorban célnak

megfelelőnek kell lenni - biztosítani kell az elemspecifikusságot, a szükséges érzékenységet és a szolgáltatott adat megbízhatóságát, de az adott körülmények között a lehető legegyszerűbben kivitelezhető mérést kell biztosítani. A célnak pedig nem mindig csak a legmodernebb készülékek felelnek meg.

3.9 Kalibráció

A speciációs analitikai koncentrációk mennyiségi meghatározása és a mennyiségi meghatározás legmegfelelőbb módjának kiválasztása a mai napig a terület fontos kérdése. Nagyon sokféle javaslattal és kísérlettel találkozhatunk az irodalomban – mindegyiknek vannak előnyei, de hátrányai is. A két legelterjedtebb megoldás azonban mindenképpen [28]

- a 'hagyományos' kalibráció és
- az ún. belső kalibráció - a standard addíció .

A hagyományos kalibráció mindenképp a mennyiségi meghatározás legkézenfekvőbb módja, azonban a legegyszerűbb mátrixok esetétől eltekintve megfelelősége kérdéses. Alkalmazása eltérő lehet.

Azokban az analitikai módszerekben, ahol derivatizációs lépést is alkalmaznak, a mérendő módosulat derivatizált formájának oldatba vitt formájával való kalibráció tűnik a legegyszerűbbnek. Alkalmazásánál a következő problémákkal kell számolnunk. Sok esetben a derivatizált formákhoz nem lehet hozzájutni, de ha mégis, akkor kalibrációra való felhasználásuk előtt stabilitásukról és az előkészítés folyamán fellépő veszteségekről meg kell bizonyosodni. Például a fenilezett metil-higany – a fenilmetil-higany kereskedelemben kapható vegyület, ezért nem kell házilag előállítani, de oldatban nem stabil [128]. Megfelelő tisztaságú alkilált szerves ónvegyületeket a kereskedelem nem árusít, de előállításuk nem ütközik akadályba és stabilitásuk is megfelelő [129]. Az ilyen kalibrációnak az a legnagyobb hátránya, hogy nem számol az extrakció, a derivatizáció és a tisztítási lépések során fellépő veszteségekkel.

A derivatizációs módszerek esetén másik megoldás a módosítatlan mérendő kalibrálósorozatával történő kalibráció, melyet a mintával párhuzamosan, a szokásos derivatizációs lépéseket követve derivatizálunk. Bár ez a megoldás több munkát igényel, reprezentatívabb, mivel a kalibrálóoldatok ugyanazon a derivatizációs folyamaton mennek keresztül, mint a minták; optimális esetben a mintákkal egyidőben, így a folyamat okozta kis eltérésekkel nem kell számolnunk. A módosulatok derivatizálatlan formájához könnyebb a kereskedelemből hozzájutni, mint a derivatizált formákhoz. Nem szabad elfeledkezni arról, hogy stabilitási

problémák itt is jelentkezhetnek és arról sem, hogy tiszta oldatokból gyakran magasabb a derivatizáció hatásfoka, mint mintaextraktumból.

A következő kalibrációs megoldás még összetettebb. Vakpróba mátrixot ‘adalékolunk’ a mérendő derivatizálatlan formájával különböző koncentrációkban és az így kapott kalibrációs sort alávetjük a mintaelőkészítés teljes folyamatának. Ezzel a megoldással az összes veszteség ami a mintaelőkészítést terheli, egyformán jelentkezik a mintán és a kalibrációs soron, így nem kell vele számolni. Azonban, ugyanúgy, mint a standard addíció bármely formájánál, az addicionált anyag extrahálhatósága nagyobb, mint a mátrix által eredetileg tartalmazott komponensé. A kalibrációs sorra tehát nagyobb extrakciós hatásfok vonatkozhat, mint a mintákra. Vakpróba mátrixot azonban nehéz biztosítani, mert szintetikus előállítása körülményes és hosszadalmas; az extrakciós hatásfokban pedig látszólag kis mátrixkülönbségek is nagy különbségeket okozhatnak.

Meg kell említenünk a kalibrációnak a belső standard használatával összekötött módját. A belső standard egy olyan komponens, amely eredetileg nem található meg a mintában, és karaktere a lehető legjobban hasonlít a mérendő komponenséhez, így viselkedésével jellemezhető a mérendő viselkedése. Mind a mintához, mind a standardekhez mintaelőkészítés előtt adagoljuk meghatározott és egyenlő mennyiségben. A kalibrációs görbét a mérendő komponens és a belső standard hányadosaiból számoljuk. Mivel a mintában is jelen van a belső standard, így a mérendő koncentrációjának mennyiségi meghatározásához is a mérendő és a belső standard intenzitásának hányadosát használjuk. A módszer használatának előnye, hogy a teljes analitikai folyamat veszteségeivel számol a mintaelőkészítés első lépésétől a detektálásig. Őn speciációjánál gyakran használt belső standard a tripropil- és a triciklohexil ón, melyek fiziko-kémiai tulajdonságaikban nagyon hasonlítanak a tributil- és trifenil ónra. Metilhigany meghatározásnál gyakori az etilhigany használata, ha nem etilálást használunk származékképzésre.

A belső kalibráció a kalibráció harmadik megoldásától annyiban különbözik, hogy nem a vakpróba mátrixhoz, hanem a mintamátrixhoz addicionáljuk a mérendő komponenset különböző koncentrációkban. Miután elegendő időt hagytunk a minta és az addicionált komponens egyensúlyának kialakulására, az extrakciót a megszokott módon kivitelezük. Az ismert addicionált mennyiségekből és a mért jelekből felépíthetjük a kalibrációs görbét, melynek az Y-tengellyel való metszéspontja adja a minta eredeti koncentrációját.

A standard addíciónak szigorú szabályai vannak. A kalibrációs görbe felépítéséhez legalább három-négy addíciós pontra van szükség – közel azonos távolságra egymástól. A hozzáadott koncentrációkat a BCR [32,33] hitelesítési projektjeiben elfogadott gyakorlat a mért eredeti koncentráció egyszeres, kétszeres és négyszeres mennyiség adagolásában határozza meg. Ha a adagolt mennyiségek kicsik az eredeti koncentrációhoz képest, a kalibrációs görbe meredeksége

is túl kicsi lesz, a bizonytalansági tartomány pedig feltehetően túl nagy, mely használatra alkalmatlanná teszi. Ellenben ha a hozzáadott koncentráció túl nagy, a mátrixhatás nem érvényesül ugyanúgy, mint a mintákban. A mátrixhatás figyelembe vétele miatt a belső kalibráció eredményei kétségtelenül megbízhatóbbak.

Szót kell ejteni még az izotóphigitás (ID) lehetőségéről is, mint alternatív kalibrációs megoldás, mert a kvantitatív mérések helyességét jelentősen javítja [130]. Természetesen a speciális készülékigénye és az, hogy egyelőre nagyon kevés izotóppal jelölt szerves fémmódosulat kapható a kereskedelemben, még hátráltatja elterjedését a speciációs analitikában, bár egyre több az alkalmazásával született publikáció [131]. Gyakorlati alkalmazásánál pedig ugyanazok a gondok merülnek fel, mint minden 'adalékolásnál'. Ahhoz, hogy az alkalmazott speciációs technika szisztematikus hibáit a lehető legjobban ki tudjuk zárni, a módosított izotóparányú módosulatokat is a mintaelőkészítés előtt kell adagolni. Tehát a hozzáadott komponens és a minta által eredetileg tartalmazott komponens extrahálhatóságának különbsége itt is jelentkezik.

A bizonylatolt referencia anyagok is használhatók analitikai műszerek kalibrációjára [132]. A megoldás előnye, hogy CRM alkalmazásakor a mátrixhatások figyelembe vételével kalibrlunk. Hátránya az, hogy ritkán találunk a saját minta mátrixának teljes mértékben megfelelő CRM-t, különösen ha összetett mátrixról van szó; és mivel a mátrix CRM-k nem elérhetők a mérendő különböző koncentrációival, csak egy pontos kalibráció használatára van lehetőség. Az egy pontos kalibráció használata a alábbi hibákkal terheli az analitikai folyamatot. Az egy pontos görbe 0 ponthoz tartozó intenzitását vak minta hiányában nem lehet meghatározni, a 0 ponttal való összekötése pedig torzíthatja a valóságot. A mérendő koncentrációja jelentősen befolyásolhatja az extrakciós hatásfokot, mely a kalibrációs görbe módosulását okozhatja, ami egy pontos kalibráción nem érvényesülhet.

Az adott speciációs feladatnak megfelelő kalibráció kiválasztásához sok szempontot figyelembe kell venni: a mérendő minta jellegét, a mérendő komponens koncentráció tartományát, az rendelkezésre álló műszerállományt és nem utolsósorban mérlegelni kell, hogy milyen módon kivitelezhető a mérések minőségbiztosítása. Például, ha rendelkezésünkre áll célnak megfelelő bizonylatolt referencia anyag, melyet ha a mintával párhuzamosan elemzünk és az elért eredmény megfelelő, akkor a standard addíció bonyolult folyamatától eltekinthetünk. Ha egyszerű vizes mátrix speciációját végezzük, lehet, hogy külső kalibráció is elegendő. A döntés minden esetben a felsorolt paraméterek alapos mérlegelését igényli.

3.10 Az eredmények kiértékelése

A speciációs mérések kiértékelésénél és az eredmények megadásánál még körültekintőbben kell eljárunk, mint az analitikai kémia más területein. A speciációs módszerek bonyolultsága miatt, mely többnyire a mintaelőkészítések összetettségéből ered, lényegesen több a kiértékelési hibák elkövetésének esélye [28].

Sem a szerves, sem a szervetlen kémia területén nem fér kétség ahhoz, hogy az eredményeket mire vonatkozóan adjuk meg – a szerves kémiában vegyületre, a szervetlen kémiában elemre. Mivel a speciáció legtöbb esetben a két terület átfedése, az eredményt megadhatjuk vegyületként, mint pl.: tributilón kation, vagy pedig a központi fémre számolva, pl.: tributilón, mint ón. Nagyon gyakran előfordul, hogy a számolásokhoz a kalibrációs oldatok készítéséhez használt vegyület tömegét használják, ami az ellenion tömegét is magába foglalja, pl.: tributilón helyett tributilón klorid, ami számolásoknál jelentős különbséget eredményezhet. A derivatizálást alkalmazó technikák esetén az is zavart okozhat, hogy a mért komponens valójában a kalibráló oldat készítéséhez használt komponens származéka, pl.: metil higany mérésénél metil higany kloridot használunk a kalibrációban, de mérni etil-metil higanyt mérünk, ha etilezést választottuk derivatizációs megoldásként, tehát az eredményt akár három vegyület tömegével számolva is meg lehet adni.

Látható, hogy az eredmény megadásának sok lehetősége van, melyek gyakorlati előnyökön és hátrányokon kívül nem különböznek egymástól. A BCR speciációs gyakorlataiban mindig ellenion nélkül, vegyületre kérik és adják meg az adatokat [55]. Ennek elsődleges oka ma az, hogy hosszú évek óta ez a gyakorlat. Így az új termékek adatai is ugyanarra a skálára kerülnek fel és nincs szükség arra, hogy a választásánál konverziós faktorokkal számoljunk, ha egyáltalán észrevesszük, hogy számolnunk kell. Ezt az alábbi gyakorlati példán mutatom be. A tributilón koncentráció meghatározására tengeri eredetű, biológia bizonylatolt referencia mintát használunk. Ha a mérésünk mátrixának és a koncentrációtartományának megfelelőeket keressük és megszoktuk, hogy a koncentráció tributilón kationként ($M=237g$) van megadva, akkor az esetleg ónban ($M=118g$) kifejezett tributilón koncentráció a várt felét mutatja. Így automatikusan számításba sem vesszük a választásnál. Ez a gyakorlati indok. A leglényegesebb szempont azonban mégis az, hogy az értéket felreérthetetlen módon adjuk meg, nem az, hogy az eredményeket milyen egységben fejeztük ki.

A kinyerési hatásfok megadásának módja okoz még igen nagy kérdést az analitikusoknak. Az extrakciós módszerek szinte sosem eredményeznek 100%-os kinyerési hatásfokot. Ha azonban pontosan tudjuk a kinyerési százalékot, akkor vajon tanácsos-e korrigálni vele speciációs eredményeinket, vagy elegendő, ha a kapott eredményeket a hatásfokkal együtt adjuk meg?

Kizárólag akkor szabad vele korrigálni, ha a mért módosulatokra egyenként meghatároztuk a kinyerési hatásfokot. Az összkoncentrációra vonatkozó százalék nem alkalmazható a specieszek mennyiségének korrigálására. A következőket mérlegelnünk kell. A kinyerési hatásfok csak arra a mátrixra igaz, amelyből meghatároztuk. Ha standard addícióval határozzuk meg, akkor eredményünk hordozni fogja a standard addíció összes bizonytalansági tényezőjét. Ha CRM használatával határozzuk meg, akkor a mátrixból adódó különbségek áthidalására nincs mód. Tehát a korrigálással feltehetően jelentősen rontanánk eredményünk megbízhatóságán. Ellenben a kinyerési hatásfokkal való korrigálás teszi lehetővé azt, hogy különböző módszerekkel kapott mérési eredményeket összehasonlítsunk. Körelemzésekben és hitelesítési gyakorlatokban ezért a korrigálás az elfogadott gyakorlat, de szigorúan a korrekciós faktor feltüntetésével együtt [133].

3.11 A speciációs analitika minőségbiztosítása

Az előzőekben felsorolásra kerültek a speciációs analitika általános lépései és az egyes lépéseket általában terhelő problémák, melyeknek bekövetkezését a megfelelő minőségbiztosítási lépések bevezetésével igyekszünk kiküszöbölni.

Analitikai laboratóriumokban leggyakrabban az alkotók minőségi azonosítását és mennyiségi meghatározását végzik. Ha létezik a feladatnak megfelelő szabvány ill. módszer az alkotó meghatározására, akkor az analitikus azt használja. Ha nincs előírás, akkor módszert kell fejlesztenie. Az analitikai mérésnek megbízhatónak kell lennie és számos követelményt kell kielégítenie, hogy megbízható eredményt tudjunk szolgáltatni [134]. Mindez igaz a speciációs mérésekkel foglalkozó laboratóriumokra is, ahol az általános analitikai problémákon kívül mindennapos kihívást jelentenek az összetett mátrixok, a bonyolult mintaelőkészítési módszerek és a velük járó veszteség- és szennyezőforrások megfelelő kezelése, a mérendő komponensek beszerzése hiteles forrásokból, azok stabilitása és a mérendő kis koncentrációtartományok.

Ahogy általában az analitikai módszerek megbízhatóságának feltétele a validálás, úgy a speciációs feladatoknál is ajánlott, hogy validált módszereket alkalmazzunk. A EURACHEM készítette *Method Validation Guide* [20,134] által meghatározott analitikai tulajdonságokat itt is figyelembe kell venni. Ezek a következők:

1. Az analitikai méréseknek meg kell felelnie az felhasználó előzetes követelményeinek.
2. A mérések során olyan módszereket és műszert kell használni, amelyekről előzetesen meggyőződünk, hogy a célnak megfelelnek.
3. Az analitikusnak megfelelő képesítéssel és tudással kell rendelkeznie a feladat elvégzéséhez.

4. A laboratórium tevékenységét időközönként független szervezetnek kell megvizsgálnia.
5. Az egyik laboratóriumban végzett mérés eredményének összevethetőnek kell lennie a másikon végzett elemzési eredményekkel.
6. Az analízist végző szervezeteknek jól definiált minőségbiztosítási és minőségellenőrzési eljárásokkal kell rendelkezni.

Mivel az analitikai módszer validálása olyan tevékenységek összessége, melyek a működési paraméterek becslésére irányulnak és annak megerősítésére, hogy a kidolgozott módszer alkalmas egy egyedi feladat megoldására [20,135], a validálás folyamata magában foglalja a mérési módszer teljesítményjellemzőinek meghatározását, melyek a következők:

- szelektivitás és specificitás,
- méréstartomány,
- módszer linearitása,
- érzékenység,
- kimutatási határ,
- meghatározási határ,
- zavartűrés,
- pontosság,
- precizitás.

A speciációs analitikában a teljes validálást több ok miatt is nagyon nehéz teljesíteni. A speciációs módszerek teljesítőképessége sokszor olyannyira mátrixfüggő, hogy egy új mátrix gyakorlatilag a teljesítményjellemzők ismételt meghatározását és a módszer teljes újvalidálását is igényelheti. Ez sok esetben az idő- és költségigények miatt sem kivitelezhető úgy, hogy a módszer a definíció értelmében validált legyen.

Mégis számos eszköz áll az analitikus rendelkezésére, hogy a speciációs módszer minőségét a lehetőségek szerint a lehető legjobban biztosítsa. Ezek közé tartozik bizonyos paraméterek folyamatos ellenőrzése, ún. monitorozása, ilyen például a kalibrálószerek és derivatizáló reagensok stabilitása, a vak értékek állandósága és az analitikai készülék teljesítményjellemzői. A megfelelő referenciaanyagok használata, és ha lehetséges a körelemzésekben való részvétel mindenképp szükséges.

A kalibrálószerek, reagensok és a vak értékek stabilitásának ellenőrzésére a kontrollkártyák használata javasolt [136,137]. A kontrollkártyák a mérések eredményét az idő (dátum) függvényében ábrázolják. Jellemzi őket egy középvonal, melynek értéke ($\bar{X}$) általában az első tíz mérés eredményének átlagával egyelő; a középvonaltól ± 2 szórás távolságra ún. figyelmeztető

határ; és ± 3 szórás távolságra kontrol – beavatkozási – határ. Jól kézbentartott analitikai folyamatok esetén az eredmények a ± 2 szórás által meghatározott intervallumba esnek. Ha az eredmények ismétlődően a figyelmeztető- és beavatkozási határ közé, ill. a beavatkozási határon kívül esnek, az analitikai folyamatban olyan változás történt, mely megakadályozza az előírt követelmények teljesítését.

Például egy speciációs standard oldat stabilitásának ellenőrzését szolgáló kontrollkártyán többször egymás után a negatív beavatkozási határon túl eső értékek a standard oldat instabilitását – bomlását, így a továbbiakban a kalibrációra való alkalmatlanságát jelezhetik. Egy több módosulatot tartalmazó standard oldat egyik komponensének többször egymás után a pozitív beavatkozási határon túl eső értéke a módosulat keletkezését is jelentheti. A vak érték kontrollkártyáján a pozitív irányban való jelentős és konzekvens eltérés szennyeződés megjelenését közölheti. Az eltérés okait minden esetben körültekintően meg kell vizsgálni, lehetőség szerint ki kell zárni és az eredeti állapot visszaállítását kell biztosítani. Ha az eredeti állapot nem állítható vissza, új referenciaértéket kell meghatározni.

A kontrollkártyák elkészítéséhez referencia mintákat használunk. A referencia minták lehetnek referencia anyagok (RM), laboratóriumi referencia anyagok (LRM) és bizonylatolt referencia anyagok (CRM) [138]. A referencia mintáknak a alábbi alapvető jellemzőkkel kell rendelkezni:

- Stabilitás - meghatározott tárolási követelmények biztosítása mellett a minta összetétele ne változzon. Mivel a minta alkalmazásának célja módszerek ill. készülékek teljesítményének nyomon követése, az eredményeknek hosszútávon is összehasonlíthatónak kell lennie.
- Elérhetőség – a fent említett cél miatt megfelelő mennyiségű mintának kell rendelkezésre állni.
- Homogenitás – párhuzamos mérésekből határozzuk meg és a mérési bizonytalansághoz mérten kicsinek kell lenni.

A homogenitás, a mérendő komponens koncentrációja és a vizsgálati mintarészlet nagysága szorosan összefügg. Minél nagyobb a homogenitás foka, annál kisebb vizsgálati mintarészletre van szükség. Természetesen a mérendő koncentrációját figyelembe véve.

A fenti követelményeken kívül fontos, hogy alkalmazásuk előtt ismerjük a referencia értékeket. Ha a referencia értéket hitelesítési gyakorlat keretében egy elismert nemzetközi szervezet hagyta jóvá megbízhatósági intervallummal együtt, a mintát bizonylatolt referenciaanyagnak nevezzük. Ha referenciérték nem bizonylatolt, de egy körelemzés keretében a koncentrációt egy tájékoztató érték keretében a hozzátartozó szórással meghatározták, a mintát referenciamintának nevezzük. A laboratóriumi referencia minta ezzel szemben általában nem rendelkezik előre meghatározott

értékkel. A folyamatos ellenőrzésre referenciaként használandó értéket felhasználás előtt a laboratóriumban magunknak kell meghatározni.

A referenciamintákat alkalmazhatjuk mérőrendszerek és módszerek stabilitásának folyamatos megfigyelésére is. Erre a célra megfelel az LRM is, hiszen a mérési eredmény stabilitásának megfigyelése a cél - saját mérési eredményünk alakulását kísérjük figyelemmel egy módszer ill. egy mérőrendszer használatával. Új módszer teljesítményének meghatározásához is elegendő az LRM használata. Az új módszerrel kapott eredményt a bevezetett módszer eredményeivel hasonlítjuk össze.

Új módszerek optimalására az RM-ek bizonyulnak a legmegfelelőbbnek, mivel rendelkeznek egy tájékoztató referencia értékkel és a körelemzésben résztvevő laboratóriumok eredményeiből meghatározott koncentrációtartománnyal összehasonlíthatjuk saját eredményünket. Mielőtt az új módszert valódi mintára alkalmazzuk, alkalmasságát CRM használatával kell meghatároznunk.

Az analitikai módszerek helyességének meghatározására is mindenképpen CRM szükséges, mely referencia értékkel és a hozzátartozó bizonytalansági tartománnyal rendelkezik. A saját módszerrel kapott értéket összehasonlítjuk a bizonylatolt értékkel, így kiszámolhatjuk az alkalmazott módszer hatásfokát.

A CRM-ek analitikai műszerek kalibrációjára is alkalmazhatók. A megoldás előnye, hogy CRM alkalmazásakor a mártixhatások figyelembevételével kalibrálunk. Hátránya viszont az, azon kívül, hogy csak egy pontos kalibrációt tesz lehetővé, hogy ritkán találunk a saját minta mátrixának teljes mértékben megfelelő CRM-t.

Ha a referenciamintákat validált módszerek ill. készülékek teljesítményének ellenőrzésére alkalmazzuk, alapvető kérdés, hogy milyen gyakorisággal tegyük. Be kell látnunk, hogy bármennyire költséges is a referenciaminták használata, az költségesebb, ha mérések sorozatát kell megismételnünk azért, mert a későn vettük észre például a módszer teljesítményének jelentős megváltozását, mely rossz eredmények sorozatát adta.

Természetesen azt is figyelembe kell vennünk, hogy még a mai napig nem áll rendelkezésre a speciációs analitika igényeit kielégítő mennyiségű és minőségű bizonylatolt referencia anyag [132], melyekkel az analitikai módszerek teljesítőképességét a legegyszerűbben és megbízhatóan lehet meghatározni és ellenőrizni. Így számos esetben kell más minőségbiztosítási megoldáshoz folyamodni, mint például a független analitikai technikák alkalmazásához.

A CRM-ek használatának jó alternatívája a körelemzésekben való részvétel is, mely több jelentős előnnyel rendelkezik. Ellentétben a CRM-ekkel, a körelemzésekben használt minták stabilitásának nem szükséges évekre szóló garanciával rendelkezni, friss minták is megfelelnek a célnak. A friss minták előállítása nemcsak sokkal egyszerűbb és költségkímélőbb, de friss minták kezelésével járó problémák azonosítására is lehetőséget nyújt. A körelemzések kiértékelő

megbeszélésein pedig lehetőség nyílik még a terület kiemelkedő személyiségeivel való véleménycserére, mely segítséget nyújthat az analitikai problémák felderítésére és azok megoldására.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám célkitűzése az volt, hogy a speciációs rendszereket és módszereket fejlesszek és kidolgozzam a módszerek minőségbiztosítását.

Munkám során az alábbi speciációs analitikai részfolyamatok kérdéseivel foglalkoztam:

- Tervezés – elemspecifititás;
- Mintavétel, a minta tartósítása és tárolása – stabilitás, tárolási paraméterek meghatározása;
- Részminta vétele – homogenitás, vizsgálati mintarészlet;
- Extrakció

Szekvenciális extrakció – protokoll betartása, protokoll módosítása, módszerspecifikus CRM használata;

Statikus speciációhoz alkalmazott extrakció – extrahálószer választás, minta:extrahálószer arány, mátrixhatás, extraktum hígítása, elválasztástechnikához való illesztés;

- Elválasztás – mintabeviteli egység választása, kromatogramok minősége, gradiens elúció, standard addíció, két különböző elven működő kromatográfia együttes alkalmazása;
- Detektálás – elemspecifikus detektálás, zavaró hatások kiküszöbölése, AFS detektor multieleemes rendszerben;
- Kalibráció – hagyományos kalibráció, módosítatlan kalibrálósor és belső standard, belső kalibráció;
- Kontrollkártyák használata.

Mindvégig a specieszek integritásának ill. információtartalmának megőrzését tartva szem előtt az egyes lépésekben fellépő nehézségekre minta- és módszerspecifikusan kerestem megoldást, majd a módszerek egészének minőségbiztosítását oldottam meg.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kutatómunkám során több speciációs rendszer és módszer kidolgozásában vettem részt, majd az optimált módszereket különböző mátrixok speciációs elemzésére alkalmaztam. Kísérletes munkám a használt készülékek szerint három nagyobb részre osztható:

1. nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia és atomfluoreszcens detektor összekapcsolásával kialakított speciációs rendszerek felépítése, optimalása és alkalmazása különböző mátrixok arzén és szelén speciációjára;
2. a BCR három lépéses szekvenciális extrakciós módszer időtakarékos variációinak kidolgozása, optimalása és környezeti mintákra alkalmazása;
3. speciációs módszer kidolgozása környezeti minták metil higany és szerves ón meghatározására gázkromatográfia-tömegspektrométer készülékkel.

5.1 Arzén és szelén speciációja a HPLC-AFS rendszerekkel

Vegyszerek

Minden felhasznált vegyszer analitikai tisztaságú volt.

Standardek készítéséhez: az arzenit (As(III)) (FLUKA), arzenát (As(V)) (MERCK), dimetil-arzénessav (DMAs) (FLUKA), arzenobetén (AsBet) (BCR) és arzenokolin (AsCol) (Francesconi) 1000 mg L⁻¹-os, a monometil-arzénessav (MMAs) (CHINOIN) 5000 mg L⁻¹-os; a selenit (Se(IV)) (MERCK) és a szelenát (Se(VI)) törzsoldatát a mérések előtt megfelelő mértékben hígítottam ioncserélt vízzel. A szeleno-DL-metionin (SeMet), szeleno-DL-etionin (SeEt) és szeleno-DL-cisztin (SeCys) sóit feloldottuk ioncserélt vízben, a törzsoldatok szelénre nézve 100 mg L⁻¹ töménységűek voltak, és közvetlenül használat előtt a megfelelő mértékben tovább hígítottam.

Az arzén és szelén módosulatok elválasztásához különböző elven alapuló elválasztástechnikákat alkalmaztam, melyek mozgó fázisaihoz az alábbi vegyszereket használtam.

Ionpároképző kromatográfia: (1) nátrium-dihidrogén-foszfát - dinátrium-hidrogén-foszfát (FLUKA); (2) ammónium-acetát (MERCK) – ecetsav (MERCK); (1) és (2) is tartalmaz: didodecil-dimetil-ammónium bromid (DDAB) ionpároképző, metanol (CARLO ERBA); (3) ammónium-formiát (MERCK) – hangyasav (REANAL), tetrabutil-ammónium acetát (TBAA), metanol (CARLO ERBA).

Anioncserélő kromatográfia: diammonium-hidrogén-foszfát (REANAL) – foszforsav, metanol (CARLO ERBA).

Kationcserélő kromatográfia: ammónium-formiát (MERCK)

Oszlop utáni preredukció szelén speciációhoz: sósav (ANALAR), kénsav (ANALAR) és a bórsav (ANALAR); kálium-bromid (ALDRICH).

Elválasztás utáni oxidáció arzén speciációhoz: kálium-perszulfát (ALDRICH).

A hidridfejlesztéshez szükséges nátrium-tetrahidroborát (SIGMA) oldatot naponta készítettem NaBH_4 és a stabilizáláshoz szükséges nátrium- hidroxid (MERCK) feloldásával. Az évek során a rendszerfejlesztés következtében a kiindulási NaBH_4 -re nézve 4 m/v % és NaOH -ra nézve 2 m/v %-os oldat töménységét 1 m/v % - 0.7 m/v % -re csökkentettem. A rutinszerűen alkalmazott 10-20 v/v %-os sósavoldatot 37%-os koncentrált sósavból (MERCK) hígítottam.

A különböző minták összetételüktől függően más és más vegyszereket igényeltek mintaelőkészítéshez.

Arzén speciációs elemzés mintáihoz alkalmazott reagensek:

- természetes vizek: kálium-permanganát (MERCK), H_2O_2 (REANAL) és hipoklorit oldat;
- osztriga: ionmentes víz;
- talaj: H_3PO_4 ;
- kagyló: ionmentes víz;
- csirkehús: ionmentes víz, HNO_3 (MERCK), $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ (REANAL), lipáz;

Szelén speciációs elemzés mintáihoz alkalmazott reagensek:

- élesztő: NH_4HCO_3 (REANAL), tripszin (1645 U mg^{-1} szilárd) (FLUKA);
- csiperkegomba: NaOH , $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, Tris-HCl és H_2O_2 (REANAL); tripszin (1645 U mg^{-1} szilárd) (FLUKA); pepszin (452 U mg^{-1} szilárd) (SIGMA); cc. HNO_3 , HCl, pronáz (4000 U mg^{-1}) (MERCK);
- vizelet: a minta nem igényelt előkezelést, a hígításhoz ionmentes vizet használtunk;
- brazil dió: cyclohexane, $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, HNO_3 és H_2O_2 (REANAL); pronáz-E (11440 U mg^{-1}).

A hígításokhoz minden esetben Elgacan Ultra-Pure ioncserélt vizet ($R > 10 \text{ M}\Omega$) használtam.

Az összkoncentráció mérésekhez a szilárd mintákat H_2O_2 és HNO_3 keverékében roncsoltam, míg a természetes vizek összarszén koncentrációjának AFS-rel történő meghatározáshoz egy csepp HNO_3 -val biztosítottam a teljes oxidációt.

Eszközök

Az osztriga, kagyló, élesztő, csiperkegomba és brazil dió minták mintaelőkészítésekhez Realsonic RS-16F ultrahangos tisztítókádat, Hettich Micro 22R centrifugát és cellulóz-nitrát Wathman fecskendő filtert (CN; 0.45 μm) alkalmaztam; a vizsgált természetes vizek extrakciójához Model MDS-81D CEM mikrohullámú roncsolót használtam.

Munkáimban különböző mintabeviteli egységekkel és on-line oszlop utáni derivatizációhoz szükséges eszközökkel kapcsolt HPLC-AFS rendszereket alkalmaztam. A HPLC elválasztási rendszerben minden esetben egy négy szívócsonkkal ellátott MERCK (Hitachi) L-7100 típusú pumpa biztosította az eluensek áramlását és 6 állású RHEODYNE mintabejuttató egység segítségével juttatta a mintát a kromatográfiás oszlopra. Vizsgálataim során 20 – 200 μL térfogatú mintabejuttató hurkokat (loop) használtam.

Az ionpárpépző kromatográfiához BST Rutin C-18-as állófázissal töltött oszlopot (250 x 4 mm i.d., 10 μm) és Merck LiChrospher 100 RP-18 szilikagél állófázissal töltött LiChroCART 125-4 oszlopot; az anioncserélő kromatográfiához HAMILTON PRP X-100 (250 x 4 mm i.d., 5 μm) erős anioncserélővel töltött oszlopot, a kationcserélő kromatográfiához pedig Chrompack Ionosphere-C5 (100 x 3 mm i.d., 5 μm) és SuperCosil LC-SCX (250 x 4.6 mm i.d., 5 μm) kationcserélővel töltött oszlopokat használtam. Minden esetben az állófázissal megegyező töltetű előtétoszlopot alkalmaztam.

A speciációs rendszerekben atomfluoreszens detektálást alkalmaztam – emelt feszültségű vájtkatód lámpával (BDHCL) (PHOTRON) felszerelt PSA 10.003 Excalibur ill. PSA Millenium Excalibur készülékeket. A méréseket a szelén és az arzén jellemző rezonancia-hullámhosszán multi-reflektancia szűrővel ± 20 nm-es tartományban végeztem. A Millenium Excalibur rendelkezik a hidridfejlesztéshez szükséges folyadék-gáz szeparátorral (GLS) és a két perisztaltikus pumpával, melyek a savat és a borohidridet szállítják; míg a 10.003 Excalibur rendszert a fenti eszközökkel együtt használtam. A folyadék-gáz szeparátor és a detektor közé minden esetben egy Perma Pure higroszkópos hidrid-száritó membránt helyeztem, mely ellenáramú argonnal vízmentesíti a detektorba jutó gázt. A folyadék-gáz szeparátorból argon üzte ki a keletkezett hidrideket, mely gázáramhoz a szükség esetén a hidridszáritó után hidrogént is kevertem. A keletkezett és hozzáadott hidrogén biztosította az atomizáláshoz szükséges lángot. A 10.003 Excalibur rendszerben Cole-Palmer tűszeleppel és rotaméterrel szabályoztam és mértem. A Millenium Excalibur rendszerhez a laboratóriumban kiépített rendszer szolgáltatja az argont, hidrogén alkalmazására nem volt szükség.

A rendszerekben mintabevitelre nagy hatékonyságú mintabeviteli egységeket alkalmaztam:

- CETAC Model 5000 ultrahangos porlasztót CETAC Model 2050 deszolváló egységgel; fűtési hőmérséklet: 150 °C, hűtési hőmérséklet 5 °C; perisztaltikus pumpa a deszolváló egységben leválasztott folyadék elszállítására;
- Házi gyártmányú, 15 µm átmérőjű porlasztófejjel ellátott hidraulikus nagynyomású porlasztó; fűtési hőmérséklet: 150 °C, hűtési hőmérséklet 5 °C; perisztaltikus pumpa a deszolváló egységben leválasztott folyadék (drain) elszállítására;
- Hidridfejlesztéshez: PEEK reakciókamra és PSA gyártmányú folyadék-gáz szeparátor

Az on-line oszlop utáni roncsoláshoz kereskedelembe könnyen elérhető elektromos fűtő egységet és kis nyomású higanylámpát (TNN 15/32, 15W, HERAEUS) alkalmaztam.

A rendszerekben a fő áramban folyadék szállítására 0.8 mm i.d. PTFE csövet használtam, a perisztaltikus pumpákhoz pedig különböző átmérőjű Tygon csöveket alkalmaztam.

Az adatok gyűjtését potenciométerrel, feldolgozását Borwin kromatográfiás software-rel végeztem, a kromatográfiás csúcsokat csúcsterület alapján értékeltem ki.

Az összkoncentráció méréseket Termo Jarrell Ash ICAP-61 ICP-AES és LECO Renaissance ICP-MS készülékkel végeztem.

Az eredmények statisztikai kiértékelését minden esetben MINITAB software-rel végeztem.

A HPLC-USN/HHPN-AFS rendszer működése

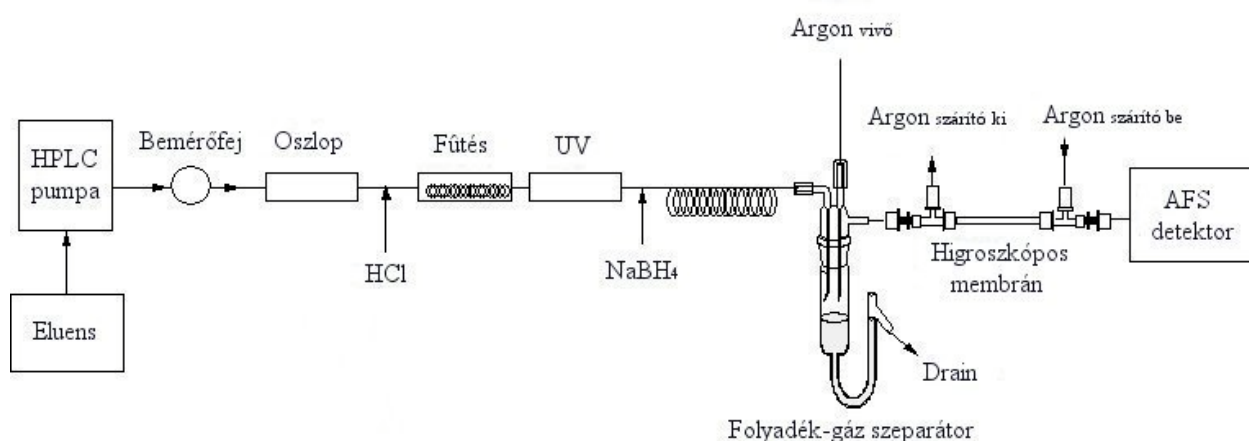
A 200 µL térfogatú mintát a mintabejuttató egység segítségével az eluensáramba juttatom, majd a megfelelő eluens és kromatográfiás program alkalmazásával a vizsgált módosulatok elválnak az állófázison. Az elválasztott alkotókat az eluensáram továbbszállítja a porlasztóba. Az ultrahangos porlasztó porlasztókamrájában egy ultrahang frekvenciával rezgő membrán porlasztja az oszlopról egy kapillárisban érkező eluensáramot és az argonáram juttatja a deszolváló rendszerbe, ahonnan a detektorba már csak a folyadékmentesített argonáram szállítja a mérendő alkotókat. A hidraulikus nagynyomású porlasztó porlasztókamrájába az eluensáram egy 15 µm átmérőjű nyíláson jut be egy üveggömb felületére, mely megfelelő apró szemcseeloszlású ködöt alkot, melyet argonáram juttat a deszolváló rendszerbe. Innen is száraz gáz juttatja tovább a mérendő alkotót a detektorba. A detektor előtt még T-elágazással hidrogént vezetünk a rendszerbe, mely biztosítja a detektor lángjának égését.

A HPLC-(fűtés -UV)-HG-AFS rendszer működése

A 20-200 µL térfogatú minta a mintabejuttató egység segítségével az eluensáramba jut és a megfelelő eluens és kromatográfiás program alkalmazásával a vizsgált módosulatok elválnak az

állófázison. Az oszlop után perisztaltikus pumpa segítségével nyomásálló PEEK reakciókamrában az eluensáramba kerül a savoldat és direkt hidridfejlesztést alkalmazásakor a borohidrid oldattal együtt. Ha a rendszerben oszlop utáni redukciót alkalmazunk, akkor a savoldat helyett sav-KBr keveréket használunk. Az eluens-sav-KBr keverék a 200 °C-ra állított elektromos fűtőegységbe, majd onnan a UV roncsolóba jut, ahol előzőleg összesen 12 méter 0.8 mm id hőálló tefloncsövet helyeztek el. Innen egy jégűtőn keresztül visszavezetjük az áramot a PEEK reakciókamrába és hozzávezetjük a borohidrid oldatot. Az oldat a folyadék-gáz szeparátorba jut, majd innen argonáram szállítja a Perma Pure folyadékmentesítőn keresztül a száraz gázt a detektor lángjába. Ezekben a rendszerekben nincs szükség hidrogén hozzáadására – a hidridfejlesztés elegendő hidrogént biztosít az égéshez. A HPLC-fűtés-UV-HG-AFS rendszer példaként a 2. ábrán látható.

2. Ábra A HPLC-fűtés-UV-HG-AFS rendszer sematikus ábrája



Az alábbi táblázatok a nyolc vizsgált minta speciációjához alkalmazott elválasztási és származékképzési paramétereket mutatják be.

1. Táblázat *Természetes víz minták – As(III)-As(V) meghatározás*

HPLC paraméterek	
Állófázis	LiChroCART 125-4, 5 µm LiChrospher 100 RP-18
Injektált térfogat	100 µL
Eluens	0.05 mol L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (pH=6), 0.5 v/v % MeOH, 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ DDAB; 1.5 mL min ⁻¹
Hidridfejlesztés	
Savkoncentráció	20 v/v % HCl
Redukálószer	1.5 m/v % NaBH ₄ – 0.75 m/v % NaOH
Argonáram	300 mL min ⁻¹

2. Táblázat *Osztriga minta – AsBet meghatározás*

HPLC paraméterek	
Állófázis	Chrompack Ionospher 5C kationcserélő (100 x 3 mm i.d.)
Injektált térfogat	20 µL
Eluens 1	ionmentes víz
Eluens 2	0.05 mol L ⁻¹ ammónium-formiát (pH=6)
Gradiens elúciós program	0-2 min: eluens 1 2.1-14 min: eluens 2 14.1-19 min: 'clean-up' eluens 1 1.5 mL min ⁻¹
Oxidáció	2 m/v % K ₂ S ₂ O ₈
Hidridfejlesztés	
Savkoncentráció	20 v/v % HCl
Redukálószer	2 m/v % NaBH ₄ – 1 m/v % NaOH
Argonáram	300 mL min ⁻¹

3. Táblázat *Talaj minták –As(III)-DMAs-MMAs-As(V) meghatározás*

HPLC paraméterek	
Állófázis	Hamilton PRP-X-100 (250 x 4.1 mm, 10 µm)
Injektált térfogat	100 µL
Eluens 1	0.005 mol L ⁻¹ (NH) ₂ HPO ₄ (pH=6), 3 v/v % MeOH
Eluens 2	0.015 mol L ⁻¹ (NH) ₂ HPO ₄ (pH=6), 3 v/v % MeOH
Gradiens elúciós program	0-7 min: eluens 1 7.1-15 min: eluens 2 15.1-25 min: 'clean-up' eluens 1 1.2 mL min ⁻¹
Hidridfejlesztés	
Savkoncentráció	20 v/v % HCl
Redukálószer	1.5 m/v % NaBH ₄ – 0.75 m/v % NaOH
Argonáram	300 mL min ⁻¹

4. Táblázat *Kagyló minta – AsBet; As(III)-DMAs-MMAs-As(V) meghatározás*

HPLC paraméterek	
Állófázis 1	Hamilton PRP-X-100 (250 x 4.1 mm, 10 µm)
Injektált térfogat	100 µL
Eluens 1	0.01 mol L ⁻¹ NH ₄ H ₂ PO ₄ (pH 6.0)
Eluens 2	0.05 mol L ⁻¹ NH ₄ H ₂ PO ₄ (pH 6.0)
Gradiens elúciós program	0-4 min: eluens 1 4.1 –12 min: eluens 2 12.1 –20 min: ‘clean-up’ eluens 1 1.6 mL min ⁻¹
Állófázis 2.	
Injektált térfogat	SuperCosil LC-SCX (250 x 4.6 mm, 5 µm)
Eluens 1	100 µL
Eluens 2	ionmentes víz
Gradiens elúciós program	0.03 mol L ⁻¹ ammónium-formiát (pH=6) 0-10 min: eluens 1 10.1-25 min: eluens 2 25.1 –30 min: ‘clean-up’ eluens 1 1.5 mL min ⁻¹
Oxidáció – Állófázis 2 után	2 m/v % K ₂ S ₂ O ₈
Hidridfejlesztés	
Savkoncentráció	20 v/v % HCl
Redukálószer	2 m/v % NaBH ₄ – 1 m/v % NaOH
Argonáram	300 mL min ⁻¹

5. Táblázat *Csirkeminta – As(III)-DMAs-MMAs-As(V) meghatározás*

HPLC paraméterek	
Állófázis	LiChroCART 125-4, 5 µm LiChrospher 100 RP-18
Injektált térfogat	100 µL
Eluens 1	0.1 v/v % DDAB oldat
Eluens 2	20mM Na ₂ HPO ₄ (pH=6.0), 0.5 v/v % MeOH, 0.1 v/v % mol L ⁻¹ DDAB
Eluens 3	0.5 v/v % DDAB oldat
Gradiens elúciós program	0-2 min: eluens 1 2.1-7.5 min: eluens 2 7.6-25 min: eluens 3
Hidridfejlesztés	
Savkoncentráció	20 v/v % HCl
Redukálószer	1.5 m/v % NaBH ₄ – 0.75 m/v % NaOH
Argonáram	300 mL min ⁻¹

6. Táblázat *Élesztő minta – SeCys-SeMet-SeEt-Se(IV)-Se(VI) meghatározás*

HPLC paraméterek	
Állófázis	LiChroCART 125-4, 5 µm LiChrospher 100 RP-18
Injektált térfogat	100 µL
Eluens	0.01 mol L ⁻¹ CH ₃ COONH ₄ (pH=4), 0.5 v/v % MeOH, 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ DDAB
Elúciós program	0-3.5: 0.5 mL min ⁻¹ 3.6-5 min: 1 mL min ⁻¹ 5.1-10 min: 1.5 mL min ⁻¹
Hidridfejlesztés	
Savkoncentráció	20 v/v % HCl
Redukálószer	1.5 m/v % NaBH ₄ – 0.75 m/v % NaOH
Argonáram	300 mL min ⁻¹

7. Táblázat *Csiperkegomba minta - SeCys-SeMet-SeEt-Se(IV)-Se(VI) meghatározás*

HPLC paraméterek	
Állófázis	LiChroCART 125-4, 5 µm LiChrospher 100 RP-18
Injektált térfogat	100 µL
Eluens 1	0.01 mol L ⁻¹ CH ₃ COONH ₄ (pH=4), 0.5 v/v % MeOH, 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ DDAB
Eluens 2	0.2 mol L ⁻¹ CH ₃ COONH ₄ (pH=6.5), 0.5 v/v % MeOH, 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ DDAB
Gradiens elúciós program	0-4 min: eluens 1 4.1-10 min: eluens 2 10.1-20 min: 'clean-up' eluens 1 1 mL min ⁻¹
I. HHPN	
Deszolvatóló fűtés:	125 °C
Deszolvatóló hűtés:	5 °C
Argonáram	300 mL min ⁻¹
II. Preredukció	
	50 v/v % HCl –5 m/v % KBr, 3 mL min ⁻¹ ; 200 °C
Hidridfejlesztés	
Savkoncentráció	50 v/v % HCl –5 m/v % KBr, 3 mL min ⁻¹
Redukálószer	1 m/v % NaBH ₄ – 1 m/v % NaOH, 3 mL min ⁻¹
Argonáram	300 mL min ⁻¹

8. Táblázat *Brazil dió minta – SeMet meghatározás*

HPLC paraméterek	
Állófázis 1	Hamilton PRP-X-100 (250 x 4.1 mm, 10 µm)
Injektált térfogat	200 µL
Eluens	0.02 mol L ⁻¹ NH ₄ H ₂ PO ₄ (pH 6.0); 1.5 mL min ⁻¹
Állófázis 2.	LiChroCART 250-4, 5 µm LiChrospher 100 RP-18
Injektált térfogat	100 µL
Eluens	0.03 mol L ⁻¹ ammónium-formiát (pH=6)
Elúciós program	0-10.5 min: 0.75 mL min ⁻¹ 10.5-30 min: 1.2 mL min ⁻¹
Preredukció – Oszlop 2 után	50 v/v % HCl –5 m/v % KBr, 3 mL min ⁻¹ ; 200 °C
Hidridfejlesztés	
Savkoncentráció	50 v/v % HCl –5 m/v % KBr, 3 mL min ⁻¹ ; 200 °C
Redukálószer	2 m/v % NaBH ₄ – 1 m/v % NaOH
Argonáram	300 mL min ⁻¹

9. Táblázat *Vizelet minta – SeCys-SeMet-SeEt-Se(IV)-Se(VI) meghatározás*

HPLC paraméterek	
Állófázis	LiChroCART 125-4, 5 µm LiChrospher 100 RP-18
Injektált térfogat	100 µL
Eluens 1	0.008 mol L ⁻¹ CH ₃ COONH ₄ (pH=4), 0.5 v/v % MeOH, 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ DDAB
Eluens 2	0.2 mol L ⁻¹ CH ₃ COONH ₄ (pH=6.5), 0.5 v/v % MeOH, 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ DDAB
Gradiens elúciós program	0-7.2 min: eluens 1 – 0.8 mL min ⁻¹ 7.3-15 min: eluens 2 – 1.5 mL min ⁻¹ 15.1-25 min: 'clean-up' eluens 1– 1.5 mL min ⁻¹
Preredukció	50 v/v % HCl –5 m/v % KBr, 3 mL min ⁻¹ ; 200 °C
Hidridfejlesztés	
Savkoncentráció	50 v/v % HCl –5 m/v % KBr, 3 mL min ⁻¹
Redukálószer	1 m/v % NaBH ₄ – 1 m/v % NaOH, 3 mL min ⁻¹
Argonáram	300 mL min ⁻¹

5.2 A BCR 3-lépéses szekvenciális extrakció időtakarékos változatainak kidolgozása

Vegyszerek

Az BCR protokolban felsorolt extrahálószerkehez szükséges vegyszereket a FLUKA-tól szereztem be, melyek mind analitikai tisztaságúak voltak, a hígításokat pedig ionmentesített vízzel (Milli-Q Millipore $18.3 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) végeztem.

A Cd, Cr, Cu, Ni, Zn és Rh 1000 mg L^{-1} -os ICP-MS törzsoldatokat (BHD Aristar) a megfelelő extrahálószerrel hígítottam standard oldatokká. A hígított oldatokat $+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam, használat előtt 1 órával hagytam szobahőmérsékletre felmelegedni és kéthetente friss oldatokat készítettem. A hydroxilammónium-klorid oldatot naponta frissen készítettem el az oldat nagymértékű instabilitása miatt. A pH beállításokhoz HNO_3 -t (trace select, FLUKA) használtam.

Minta

CRM 601

RM S7

Eszközök

A gyorsított szekvenciális extrakciós eljárás kidolgozása során a következő készülékeket alkalmaztam:

Model MDS-81D CEM mikrohullámú roncsoló - CEM teflon roncsolóedényzettel,
ultrahangos tisztító kád (Transsonic Digital, Elma),

Sorvall T6000B centrifuga (DuPont),

mechanikus rázóbetéttel felszerelt vízfürdő (Kotterman Labortechnik)

házi gyártmányú függőleges forgó rázógép.

Az extraktumok fémkoncentrációját Rytan 'cross-flow' porlasztóval ellátott Perkin-Elmer SCIEX Elan 6000 ICP-MS-el végeztem.

A hagyományos BCR 3-lépéses eljárás

Az előíráshoz alkalmazkodva a módszert szobahőmérsékleten kiviteleztem.

‘A’ lépés – cserélhető/karbonáthoz-kötött frakció

0.5 g mintához 20 mL 0.1 mol L⁻¹ ecetsavat adunk és a mintákat 50 mL-es polietilén centrifugacsőben 16 órán át rázatjuk végpontos rázógéppel 30 rpm fordulatszámon. Ezután az extraktumot 15 perces centrifugálással (1500 g) elválasztjuk a maradéktól és +4 °C-on polietilén konténerben tároljuk az analízisig. A maradékot 10 mL ionmentes vízzel 15 percig rázatjuk, 1500 g fordulatszámon centrifugáljuk és kiöntjük.

‘B’ lépés - könnyen redukálható frakció

Az ‘A’ lépés ioncserélt vízzel átmosott maradékához 20 mL 0.1 mol L⁻¹ hidroxilammónium kloridot adunk és az extrakciót a fent leírt módon kivitelezük.

‘C’ lépés – oxidálható frakció

A ‘B’ lépés átmosott maradékához 5 mL 30 %-os hidrogén peroxid (H₂O₂) (pH=2, melyet 69 %-os HNO₃-al állítottunk be) oldatot adunk cseppenként, majd a centrifugacsöveket tetejükkel letakarjuk és 1 órát szobahőmérsékleten, majd egy 1 órát 85 °C-on állni hagyjuk. Ezután 5 mL H₂O₂-ot adagolunk cseppenként a mintákhoz és a letakart mintákat még egy órán át 85 °C-on tartjuk. A csövek tetejét eltávolítjuk és mintákat majdnem teljesen bepároljuk. Végül a lehűtött maradékhoz 25 mL 1 mol L⁻¹ ammónium acetát oldatot (pH=2) adunk és az ‘A’ és ‘B’ lépésekhez hasonlóan járunk el.

A extrakciót 4 párhuzamos beméréssel és egy vakkal végeztem el.

Alternatív változat ultrahangos tisztító alkalmazásával

Az ultrahangos extrakció optimalizálását az alkalmazott ultrahangos tisztító teljesítményének és a kezelési időnek a változtatásával végeztem. A BCR háromlépéses extrakció összes többi paraméterét változatlanul megtartottam. Az optimalizálás paramétereit mindig lépésről lépésre választottam meg, mindig az előző lépés eredményeinek kiértékelése után. A kiindulási paramétereket egy fókuszált ultrahangot alkalmazó hasonló kísérlet paraméterei alapján választottam az irodalomból [139].

A extrakció optimalizálását hat lépésben, hat különböző paraméterpárral kiviteleztem. Az ‘A’ lépésben a minták kezelését a névleges (100 %-os) teljesítmény 70-100 %-án végeztem 7-60 percig. A ‘B’ lépésben szintén 70-100 %-os teljesítmény alkalmaztam 7-40 percig. A ‘C’ lépést úgy hajtottam végre az ultrahangos extrakcióra, hogy a szerves mátrix elroncsolására szolgáló 2x5 mL H₂O₂-t egyszerre adagoltam a mintához, összeráztam, 2 percig ultrahangoztuk, majd a 85 °C-os vízfürdőn az előírásnak megfelelően bepároltam. Az ammónium acetátos extrakciót

minden esetben 70%-on végeztem 7 percig. Az optimálás paraméterkombinációi az 10. Táblázatban láthatók. A előírt 15 perces ioncserélt vizes maradék mosást minden esetben 1 perces 50 %-on kivitelezett kezeléssel váltottam ki.

A kísérletet 3 párhuzamossal és egy vakkal végeztem.

10. Táblázat *Ultrahangos fürdőt alkalmazó BCR három lépéses extrakció optimálása; a kiemelt sor jelzi az optimális kombinációt*

Kísérlet	‘A’ lépés		‘B’lépés		‘C’lépés	
	Idő/min	Telj. (%)	Idő/min	Telj. (%)	Idő/min	Telj. (%)
US1	7	70	7	70	2+6	70
US2	7	100	7	100	2+6	70
US3	12	100	12	100	2+6	70
US4	20	100	20	100	2+6	70
US5	40	100	40	100	2+6	70
US6	60	100	60	100	2+6	70

Alternatív változat mikrohullámú roncsoló alkalmazásával

A mikrohullámú energiát már régóta sikerrel alkalmazzák mintaelőkészítési módszerek felgyorsítására. Míg a klasszikus BCR extrakciós procedúrának egyik meghatározott paramétere az, hogy szobahőmérsékleten kivitelezzék, addig a mikrohullámú roncsoló melegíti a mintát. Így a kísérletsorozat célja az volt, hogy meghatározzam a mikrohullámú energia alkalmazhatóságát a BCR három lépéses szekvenciális extrakcióban annak tudatában, hogy a szigorú hőmérséklet-előírások nem betarthatóak.

11. Táblázat *A mikrohullámot alkalmazó alternatív BCR három lépéses extrakció optimálásának hat paraméter kombinációja; a kiemelt sor jelzi az optimális kombinációt*

Kísérlet	‘A’lépés		‘B’lépés		‘C’lépés	
	Idő/sec	Telj./W	Idő/sec	Telj./W	Idő/sec	Telj./W
MW1	10	60	10	60	10	60
MW2	70	120	70	120	70	120
MW3	60	210	60	210	60	210
MW4	100	210	100	210	100	210
MW5	100	300	100	300	100	300
MW6	420	120	420	120	420	120

A extrakció optimálását hat lépésben, hat különböző paraméter párral kiviteleztem. A kicsatolt teljesítményt 60-300 Watt, a roncsolási időt pedig 10-420 másodperc között változtattam. Az

optimálás lépéseinek paraméterkombinációi a 11. Táblázatban találhatók. Az optimálás elve eltért az ultrahangos extrakció elvétől - az első három paraméterkombinációt az ún. 'kísérleti tervezés' elve szerint határoztam meg, melyhez a kiindulási pontot a Tessier öt-lépéses extrakció mikrohullámú roncsolót alkalmazó gyorsított változata szolgáltatta az irodalomból [140]. A további kombinációkat már itt is lépésről lépésre, az előző mérések eredményei alapján határoztam meg.

Az alkalmazott kísérleti paraméterekkel kapott hőmérsékletet mindvégig ellenőriztem. A minta hőmérséklete a 'C' lépésben minden esetben, és a MW1 és MW2 'A' és 'B' lépésben is 30 °C alatt maradt, minden más esetben 50-70 °C közé emelkedett.

A H₂O₂-s kezelést és a maradék ionmentes vízzel való átmosását az ultrahangos extrakcióval szemben a hagyományos módon kiviteleztem.

A kísérletet szintén 3 párhuzamossal és egy vakkal végeztem.

5.3 Környezeti minták metil higany és szerves ón tartalmának meghatározása GC-MC technikával

5.3.1 Metil higany meghatározás

Vegyszerek a metil higany meghatározásához

HgCl₂ (SIGMA) standard törzsoldatot a megfelelő mennyiségű só ioncserélt vízben oldásával, az etil-higany-klorid (ALFA) és metil-higany-klorid (ALFA) törzsoldatokat pedig a megfelelő mennyiségű só metanolban való feloldásával készítettem. Az analitikai mérőgörbe elkészítéséhez szükséges standard oldatokat naponta frissen hígítottam. A használt vegyszerek analitikai tisztaságúak voltak: hexán (BHD), toluol (BHD) metanol (BHD); 37% HCl (RUDI PONT) és 96% H₂SO₄ (Carlo Erba); cisztein (BHD), NaBPh₄ (ALDRICH), rézsulfát (BHD) és nátrium klorid (NaCl) (BHD). A reagensek vizes oldatait naponta ioncserélt víz felhasználásával frissen készítettem.

A fenilezett metil- és etil higany vegyületek standard oldatait a különböző mennyiségű standard törzsoldat és NaBPh₄ reakciójával állítottam elő pH=3-as oldatban. A derivatizálást úgy kiviteleztem, mint a minták esetén.

Eszközök a metilhigany meghatározásához

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

A GC-MS méréseket egy Hewlett-Packard HP 5890 GC/HP 5970 MSD rendszerrel végeztem SIM (selected ion monitoring) módban a 12. táblázatban bemutatott kísérleti körülmények között. Az összhigany meghatározásokhoz Milestone DMA 80 típusú közvetlen higany analizátort (DMA) alkalmaztam, mely készülék szilárd és folyadék minták elemzésére is alkalmas, előzetes mintaelőkészítés nélkül.

12. Táblázat A metilhigany meghatározásához alkalmazott GC-MS beállítások

GC paraméterek	
Oszlop	HP-5 (methyl-5% fenilszilikon, 0.25 mm i.d., 0.25 µm filmvastagság, 30 m, HP).
Injektált térfogat	1 µL
Injektor	Splitless, 200 °C
Transfer-line hőmérséklet	280 °C
Vivőgáz	Hélium, 80 KPa head pressure
Hőmérséklet program	60 °C x 1 min, 60 °C - 120°C; 25 °C min ⁻¹ , 120°C - 240°C-ra; 10 °C min ⁻¹
Ionizáció	Electron impact; 70 eV
SIM paraméterek	
MeHgPh	m/z: 279.00, 292.05, 294.00, dwell time: 150
EtHgPh	m/z: 279.00, 306.05, 308.10, dwell time: 150

Mintaelőkészítés a metilhigany meghatározásához

A mintákat –20 °C-on tároltam és analízis előtt egy órával elővettem, hogy szobahőmérsékletre melegedjenek. Majd megközelítőleg 0.5 g mintát bemértem és először 4 mL acetonnal, majd 4 mL toluollal átmostam. Mindkét esetben 3 perc rázás és 10 perc centrifugálás (2400 g) után a oldószereket elválasztottam és leöntöttem.

- *Roncsolás*

A megtisztított mintához hozzáadtam a belső standardet - 100 µL higanyra számolva 1 mg L⁻¹ koncentrációjú etilhigany törzsoldatot és 5 mL 6 mol L⁻¹-es sósavat és 30 perces ultrahangos kezelésnek vettem alá.

- *Extrakció*

A mintákat lehűtöttem, 10 mL 10 w/v %-os NaCl oldatot adtam hozzá és 3 percig kézzel ráztam. Ezután a 10 percig centrifugáltam (2400 g) és a felülúszót kétszer 4 mL toluollal extraháltam.

Majd az összegyűjtött 8 mL extraktumot kétszer 2 mL 1 v/w %-os cisztein oldattal vizes fázisba visszaextraháltam.

- *Derivatizálás*

A származékképzést az 4 mL cisztein extraktumból végeztem. Beállítottam az extraktum pH-ját 0.2 mL 0.1 mol L⁻¹ H₂SO₄-val, hozzáadtam 1 mL telített CuSO₄-ot és 1 mL hexánt, a hexán réteg alá adagoltam 0.2 mL 1 v/w %-os NaBPh₄ oldatot, majd 20 perces rázás után a szerves fázist elválasztottam és elemeztem. A kalibrációs standard sorozatot a mintákkal egy időben derivatizáltam CuSO₄ hozzáadása nélkül, mely a cisztein felesleg megkötésére szolgál.

- *Metilhigany meghatározás*

A metilhigany meghatározáshoz 1 µL-t injektáltam. Az alkalmazott GC-MS rendszer automata mintavevővel van felszerelve. A mennyiségi meghatározáshoz belső standardet és hagyományos kalibrációt használtam, mindkét komponens derivatizált származéka alapján.

- *Összhigany meghatározás*

A mérést kb. 0.1 g szilárd minta bemérésével végeztem. A készülék a 0.05 ng – 500 ng tartományban rendelkezik kalibrációs görbével.

5.3.2 Szerves ón meghatározás

Vegyszerek a szerves ón meghatározásához

A használt vegyszerek mind analitikai tisztaságúak (pesticide analysis grade) voltak: hexán (BHD), toluol (BHD), metanol (BHD), diklór-metán (Carlo Erba), izo-oktán (Merck); HCl 37 % (RUDI PONT). A 0.3 g L⁻¹ tropolone (2- hydroxycycloheptatrienone) (Fluka) oldat metanolban készült. A pentilmagnézium-klorid oldat (2 mol L⁻¹ dietil-éterben oldva) Aldrich termék. Az 5 % m/v NaCl (Carlo Erba) oldatot ionmentes vízzel készítettem. A vízmentes Na₂SO₄ -t (Merck) használat előtt 12 órán át 450 °C-on tartottam. Az extraktum tisztításra (clean-up) használt Florisil állófázissal töltött oszlopot előzőleg 3 órán át 180 °C-on tartott Florisil (60-100 mesh size) (BHD) 3 g-jából készítettem.

A szerves ón komponensek (TPrT, TBT, DBT, MBT) pentilezett formáját – standard oldatokat (University of Amsterdam Környezetkémiai csoportja szintetizálta) hexánban tartottam. A pentil-tripropil ónt belső standardként alkalmaztam.

Eszközök a szerves ón meghatározásához

A GC-MS méréseket egy Hewlett-Packard HP 5890 GC/HP 5970 MSD rendszerrel végeztem SIM (selected ion monitoring) módban a 13. táblázatban bemutatott kísérleti körülmények között. A minták savas roncsolását ultrahangos tisztítókáddal (Transonic Digital, Elma), az extraktum végtérfogatra bepárlását Buchi Rotavap készülékkel, centrifugálását Sorvall T6000B centrifugával (DuPont) végeztem.

13. Táblázat A szerves ón meghatározásához alkalmazott GC-MS beállítások

GC paraméterek	
Oszlop	HP-5 (methyl-5% fenilszilikon, 0.20 mm i.d., 0.11 μ m filmvastagság, 25 m, HP).
Injektált térfogat	1 μ L
Injektor	Splitless, 240 °C
Transfer-line hőmérséklet	280 °C
Vivőgáz	Hélium, 120 KPa head pressure
Hőmérséklet program	80 °C x 2 perc, 80 °C - 280°C; 10 °C perc ⁻¹
Ionizáció	Electron impact; 70 eV
SIM paraméterek	
TPrT	m/z: 277, 275, 273, start time: 8 perc, dwell time: 100
TBT	m/z: 305, 303, 301, start time: 10 perc, dwell time: 100
DBT	m/z: 319, 317, 315, start time: 12 perc, dwell time: 100
MBT	m/z: 319, 317, 315, start time: 12.9 perc, dwell time: 100

Mintaelőkészítés a szerves ón meghatározásához

A mintákat –20 °C-on tároltam és analízis előtt egy órával elővettem, hogy szobahőmérsékletre melegedjenek. Majd megközelítőleg 0.5 g mintát bemértem és hozzáadtam 50 μ L 2 mg L⁻¹ (ónra) töménységű pentil-tripropil ón belső standard oldatot. 10 perc után a mintát extraháltam.

- *Extrakció*

A mintához 15 mL 0.03 % w/v –os metanolban oldott tropolont és 1 mL cc. HCl-t adtam, 15 perces ultrahangos kezelésnek vetettem alá, majd 10 perc centrifugálás (3000 g) után a felülúszót elválasztottam és rázótlcsérbe helyeztem. A maradékon a kezelést még egyszer elvégeztem. Ezután az összegyűjtött extraktumhoz 100 mL 5 % w/v NaCl oldatot és 15 mL diklór-metánt adtam. A szerves ón komponenseket pár perces rázással a diklór-metánba extraháltam, amit a vizes fázistól elválasztottam és tlcsérbe helyezett Na₂SO₄-on keresztülengedtem a maradék víztartalom eltávolítására. Az extrakciót 15 mL diklór-metánnal megismételtem és az extraktumot ismét víztelenítettem. Ezután az összegyűjtött szerves fázist a Rotavap készülékkel, 25 °C-on 2 mL végtérfogatra pároltam be. A bepárolt mennyiséghez 2 mL hexánt és 1 mL izo-oktánt adtam és nitrogénárammal közel szárazra újra bepároltam.

- *Derivatizálás*

A bepárolt mintához 2 mL éterben oldott pentilmagnézium-bromidot adtam (Grignard-reagens), a keveréket összeráztam, hozzáadtam 1 mL hexánt, pár csepp vízzel a Grignard-reagens feleslegét elroncsoltam, megint összeráztam, végül még 5 mL 1 mol L⁻¹ kénsavval egészítettem ki. A hexánt elválasztottam és az extrakciót még 1 mL hexánnal megismételtem. Végül nitrogénáramban az összegyűjtött hexánt ~1 mL-re koncentráltam.

- *'Clean-up'*

A ~1 mL hexánt a Florisil oszlop (3 g) tetejére öntöttem, a derivatizált komponenseket 7 mL hexán-toluol (1:1) keverékkel eluáltam és az elutumot ~1 mL-re bepároltam.

- *Szerves ón meghatározás*

A meghatározás a bepárolt hexán-toluol keverék 1 µL befecskendezett mintamennyiségén alapult. A mennyiségi meghatározáshoz belső standarddel korrigált kalibrációt használtam.

6. EREDMÉNYEK

6.1 Tervezés

A tervezés jelentőségét a speciációs analitikában a Mytilus edulis kagyló minták arzén és ón speciációjának példájával mutatom be.

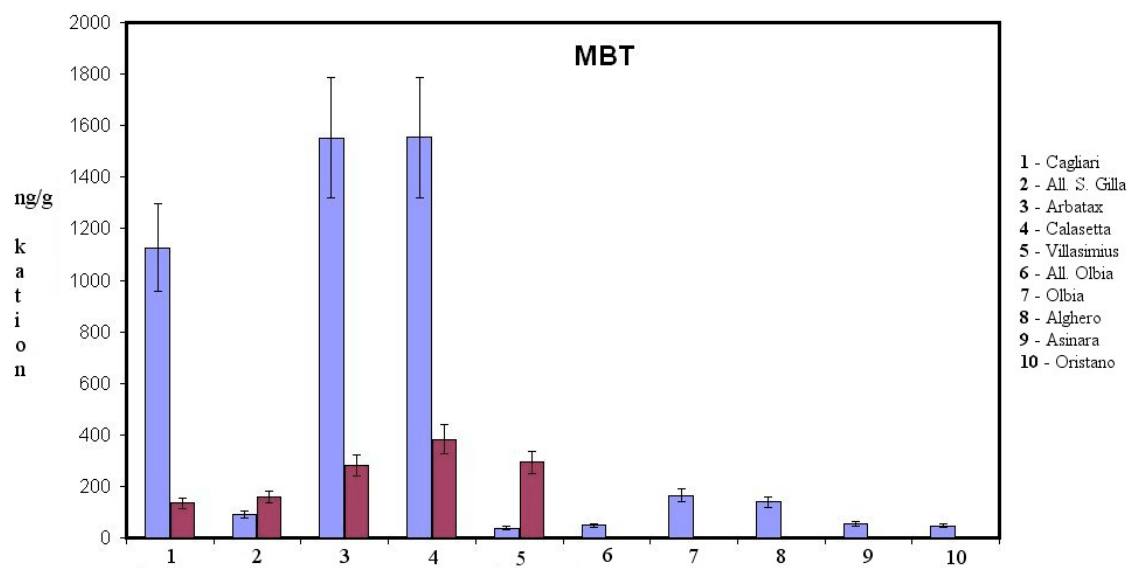
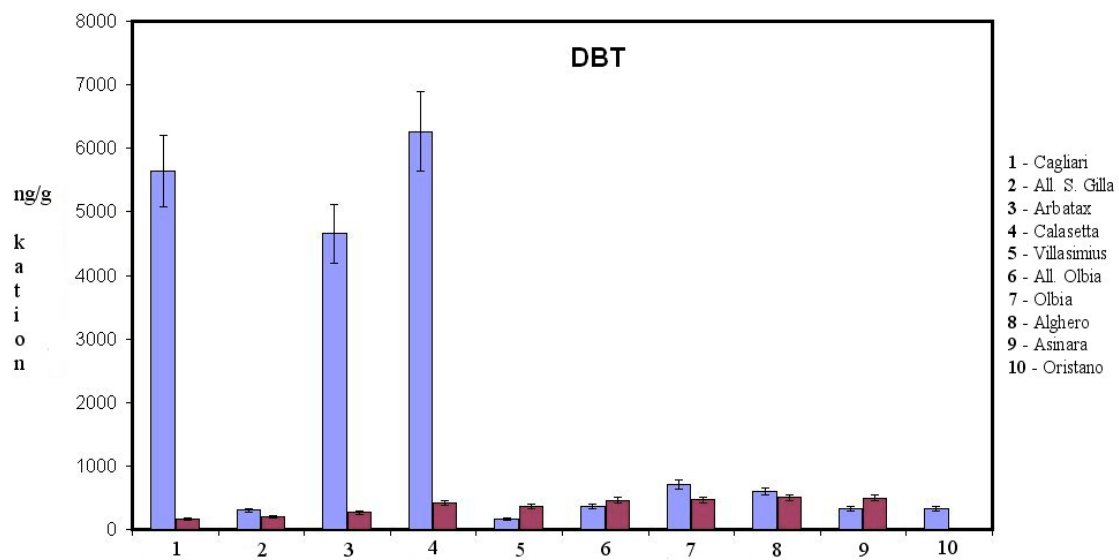
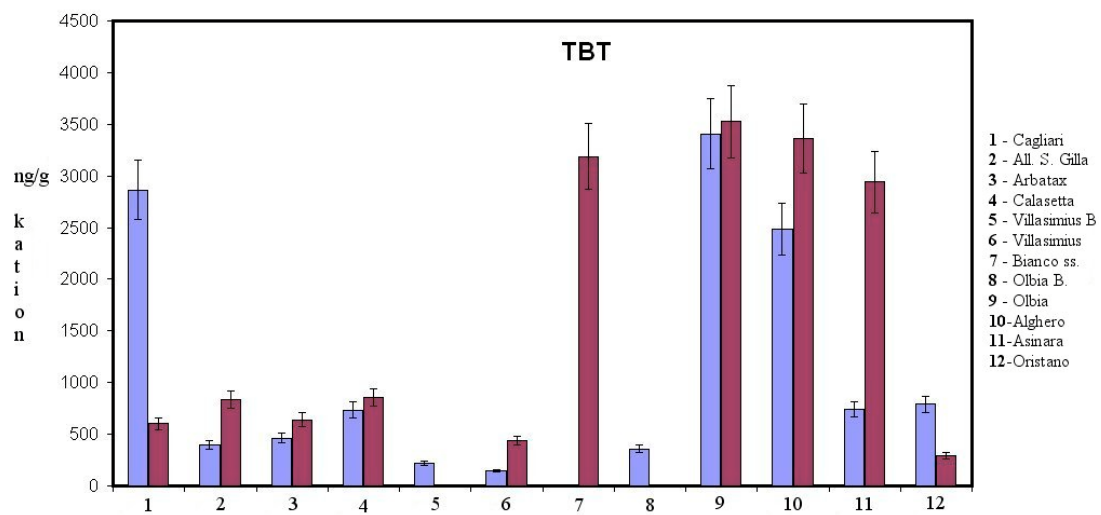
A különböző kagylókat már évek óta sikerrel alkalmazzák a környezet állapotának jellemzésére kialakított biológiai megfigyelési rendszerek ('biomonitoring') eszközeként [141,142]. Erre az a helyhez kötöttségükből és sajátos táplálékszerzési módjukból eredő biológiai sajátosságuk teszi alkalmassá őket, hogy képesek a számos szerves és szervetlen potenciális toxikus komponens akkumulálására [143], melyek egyike a tributil ón.

A vizsgált kagylómintákat eredetileg abból a célból helyezték ki Szardínia sziget (Olaszország) partvonalának több pontjára, hogy felmérjék a szerves ón szennyezettség mértékét, mely megközelítőleg 40 éve aktív komponense a hajók algamentesítésére alkalmazott festékanyagoknak [144]. A megfigyelési pontokat úgy választották meg, hogy azok az antropogén eredetű szennyezést a legjobban reprezentálják. Tehát kikötőkbe ill. kikötők közelébe helyezték a kagyló kolóniákat három éven keresztül, évente kétszer egy hónapos időtartamra.

A minták szerves ón speciációs meghatározásából bizonyítékot kaptunk arra, hogy azoknak a kikötőknek ill. környéküknek a szerves ón szennyezettsége meglehetősen nagy, ahol az elmúlt 20-40 év alatt széles körű hajókarbantartási munkálatok folytak. A TBT és bomlástermékei, a DBT és a MBT arányából a bomlás felezési idejének ismeretében [145], arra is következtetünk, hogy a megfigyelt időszak alatt folyamatos volt-e a kagylók TBT felvétele.

A 3. ábra a felmérés 1. és 2. mintavételi kampány mintáinak szerves ón koncentrációit tartalmazza komponensenként. Annak figyelembevételével, hogy a TBT a kagylófesték aktív komponense és ez az a forma, melyet a kagyló felvesz; a DBT és az MBT pedig az előszervezetten belül bomlási folyamatok eredményeképpen alakul ki, az eredmények a következőket mutatják.

3. Ábra *A felmérés 1. és 2. mintavételi kampányában gyűjtött minták szerves ón koncentrációi komponensenként – TBT, DBT, MBT. 1. oszlop - 1. kampány eredményei; 2 oszlop a 2.kampány eredményei*



Az első mintavétel során a Cagliarii mintának egymással egy nagyságrendben levő TBT, DBT és MBT tartalma a TBT folyamatos és nagy felvételét reprezentálja az egy hónapos megfigyelési idő alatt. Az eredmény nem meglepő, hiszen Cagliari, a főváros rendelkezik a sziget legnagyobb kikötőjével, ahol egész éven át üzemelnek hajófelújításra szolgáló dokkok. A Bianco SS, Olbia, Alghero és Asinara minták olyan kikötők környezetéből származnak, melyekben nyáron intenzív a forgalom, de használatuk leginkább szezonális. A TBT tartalom mellett nagyon kis koncentrációban találtam a mintákban DBT- és MBT-t, melyből arra következtettem, hogy a szennyezés az egy hónap alatt nem volt egyenletes, hanem feltehetően nem sokkal a mintavétel előtt történt. Ennek oka a friss TBT szennyezés volt vagy a tengeri üledékkel az idő folyamán lerakódott és a mintavétel előtt nem sokkal a tenger mozgásával felkeveredett TBT vált a kagylók számára elérhetővé. Az arbataxi és calasettai mintáknál az előzőek ellenkezője áll fenn. A mért TBT tartalom kicsi, míg a DBT és MBT koncentrációk jelentősek, mely azt jelzi, hogy a mintavétel idejére a TBT felvétel csökkent és a kagylók az előzőekben felvett TBT bomlástermékeit tartalmazzák.

A minták arzénspeciációjának ötlete jóval a kísérlet tervezése után született, így a mintakihelyezésnél és a mintavételnél az As megfigyelés célját, a specieszek jellegéből és felvételéből adódó különbségeket már nem lehetett figyelembe venni. Arzént alkalmazó ipari és más antropogén As-forrás a szigeten nem ismert, ahogy működő vulkán sem, amely a környezeti As terhelés egyik fő forrása lehetne. Ezen kívül a kagylók az As-t szerves formában veszik fel, mely meglehetősen gyorsan, 48-72 órán belül biokémiai detoxifikáló folyamatok alapján kevésbé toxikus szerves formává alakulnak, legnagyobb százalékban az emberi szervezet számára ártalmatlan arzenobeténé [146].

A négy hetes megfigyelési idő alatt a tengervíz össz arzén koncentrációjának meghatározásával és a kagyló arzén koncentrációjának meghatározásával következtethetünk a kagyló, mint élő szervezet As-felhalmozó képességére, és a különböző arzénformák jelenlétéből az As átalakulásának folyamataira, de a kagylóminták szerves ón tartalmának meghatározásához hasonló arzén speciációval nem kaphatunk a környezetre jellemző információt.

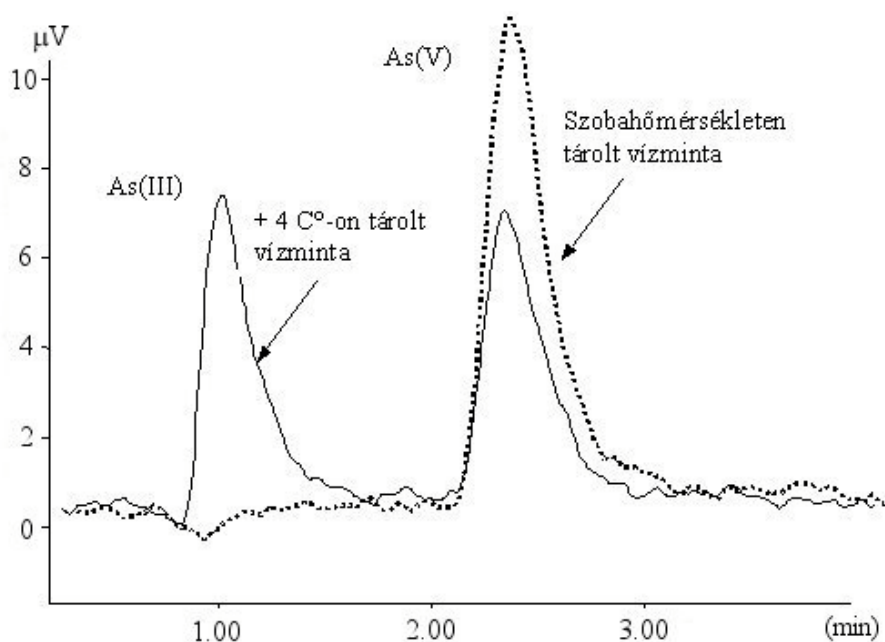
A példa bemutatja, hogy a speciációs elemzések a mérés ill. méréssorozat célkitűzésének megfelelő, pontos tervezést igényelnek. Megállapítható, a tervezésnek nem multielemesenek, hanem elemspecifikusnak kell lennie mivel a mobilitás, a biológiai elérhetőség és a beépülés mechanizmusa elemről elemre és speciesről speciesre változik. A kísérleti eredmények alapján elmondható, hogy a környezet ón szennyezettségének felmérésére végzett tervezés a környezet arzén speciációjának meghatározására az eltérő biológiai beépülés mechanizmusai miatt nem alkalmas. A két elem környezeti megfigyelést szolgáló speciációja független és eltérő tervezést igényel.

6.2 Mintavétel, minta tartósítása és tárolása

A kísérletek során a mintavételt minden esetben külső személy ill. szervezet végezte saját tervezés alapján, így erre vonatkozóan információval nem rendelkezem. A mintatartósítás és -tárolás jelentősége azonban több minta esetén is bebizonyosodott.

Irodalmi adatok alapján ismeretes, hogy a szervesetlen arzén módosulatok különösen kis koncentrációkban nem stabilak – pH, redoxipotenciál, hőmérséklet stb. hatására szabadon egymásba alakulhatnak. Munkám során az EU határértékeket kielégítő arzénmentesítési technológia kidolgozásához szükséges méréseket, alföldi természetes vizek As(III) és As(V) speciációs elemzését végeztem. Ahhoz, hogy a mérés pillanatában meghatározott As(III):As(V) arány a természetes állapotot tükrözze, előkíséletek során meg kellett határozni, hogy milyen tárolási körülményekkel és mennyi ideig tarthatók el a minták változás nélkül.

4. Ábra Az 1. vízminta As módosulat eloszlását az 5. napon jellemző kromatogram +4 °C-on és szobahőmérsékleten



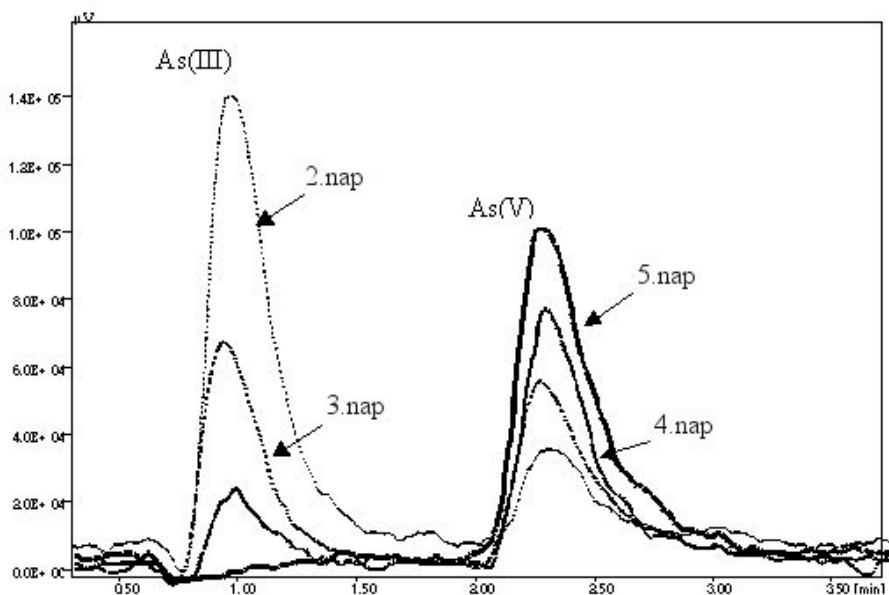
Ismeretes, hogy az alkotók stabilitását jelentősen befolyásolhatja a környezeti paramétereken kívül a mátrix is. A vizsgált alföldi vizek pH értéke, szervesanyag tartalma és kémiai oxigénigénye mintáról mintára közel azonos volt, ezért az előkísérlet során három, As(III)-t a kimutatási határ alatt tartalmazó mintát kiválasztottunk, mindháromból 2x10 mL kivettünk és As(III) oldattal addicionáltunk. Az így kapott 200 μg L⁻¹ As(III) koncentrációjú természetes vizek egyik sorozatát +4 °C-on hűtőszekrényben, másik sorozatát szobahőmérsékleten tároltuk sötét polietilén tartályban, hogy a fény lehetséges oxidációs hatását kizárjuk. Mélyhűtést az

irodalomban leírt lehetséges irreverzibilis változások bekövetkezésének elkerülése érdekében nem alkalmaztunk [42]. A több esetben javasolt savazás pedig, saját tapasztalat szerint, pillanatreakcióval arzenáttá alakította a teljes arzenit tartalmat, tehát a minta eredeti információtartalma elveszett.

A minták specieseloszlását egy héten át minden nap a 3. fejezetben leírt HPLC-HG-AFS rendszerrel és az 1. táblázatban felsorolt paraméterekkel meghatároztuk. A 4. ábrán az 1. minta szobahőmérsékleten ill. +4°C-on tárolt részletét az 5. napon jellemző két kromatogramot mutatom be. Míg +4°C-on az 1. napon mért As(III) tartalom 40% még megmaradt az 5. napra, szobahőmérsékleten már a teljes As(III) tartalom As(V) formává alakult.

A 5. ábrán a 2. minta szobahőmérsékleten tárolt részét jellemző 2., 3., 4. és 5. napon kapott kromatogramja látható, ahol az első nap a mintavétel napját jelenti. Az As(III) koncentráció csökkenésének jellegéből arra következtethetünk, hogy a 1. napon, azaz a mintavétel napján As(V) nem vagy nagyon kis koncentrációban volt jelen a mintában, tehát a természetes As szennyezés As(III) formában jutott a vízbázisba a vizsgált területen. Szobahőmérsékleten az 5. napra a teljes As(III) tartalom átalakult As(V) formává.

5. Ábra A 2.minta szobahőmérsékleten tárolt részét jellemző 2., 3., 4. és 5. napon kapott kromatogramok



A kísérletsorozat és a bemutatott két ábra alapján arra következtettem, hogy ugyan a +4°C-on történő tárolással az vizekben az oxidáció folyamata lassult, az 5. napon még jelentős, 40 %-nyi

As(III) tartalom volt jelen, de az átalakulás annyira gyors, hogy a minta eredeti állapotát csak a mintavétel napján végzett elemzéssel jellemezhetjük.

Ez azt bizonyítja, hogy a mintavétel, a mintatartósítás és a mérés kivitelezésének összehangolása elengedhetetlen feltétele a speciációs információ megőrzésének. A vízmintákban jelen levő arzén specieszek tartósítása komplexképződési eljárásokkal ugyan biztosítható, de az eredeti állapotot visszaállítani nem lehet és a komplexált formák a HPLC-HG-AFS rendszerrel nem mutathatók ki. Ezért jelen esetben a minta tartósítása nem volt megoldható, csak hűtéssel lassítható. Megállapítható, hogy a mintavétel és a mérés kivitelezésének időbeli összehangolása alapvető a módosulatok eredeti állapotban való megőrzésére.

Az 'Irodalmi bevezetőben' már szó esett arról, hogy még nem áll rendelkezésre megfelelő számú és minőségű bizonylatolt referencia minta (CRM) a speciációs analitika minőségbiztosítására. A mérések megbízható minőségét azonban mindenképp biztosítani kell, melynek egyik alternatív megoldása a laboratóriumi referencia minta házilag előállítása. Ahhoz, hogy egy referencia anyag minőségbiztosítási eszközként alkalmazható legyen, mindenekelőtt meg kell bizonyosodni eltarthatóságáról, az ellenőrizendő komponens hosszútávú stabilitásáról és arról, hogy az alkalmazott tartósítási mód nem változtat-e a mintában lévő kémiai módosulatok eredeti állapotán.

Kutatási munkám során a szelén tartalmú módosulatok meghatározásának minőségbiztosítása mindig gondot jelentett, mert a szelén speciáció meglehetősen új és intenzíven fejlődő kutatási terület, így még nincs CRM, mely bármely szerves szelén módosulatra bizonylatolt értéket ad. Így munkám része volt egy biológiai LRM előállítása a szelén speciációs mérések minőségbiztosítására. Mintának a nagy természetes szelén tartalmú brazil diót (*Bertholletia excelsa*) választottuk, melynek össz szelén tartalma eléri a 600 mg kg⁻¹-ot is, kereskedelemből könnyen beszerezhető és az irodalmi adatok alapján szerves szelén tartalma akár az össz szelén tartalom 98 %-át is kiteszi [147,148].

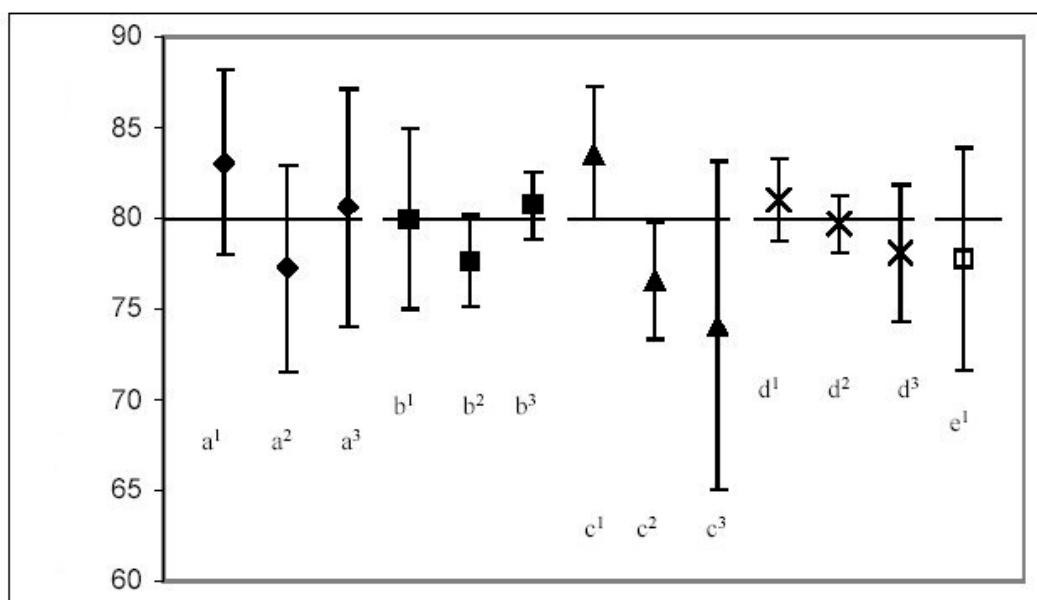
Az előkísérletek bizonyították az irodalmi adatokat, a SeMet a brazil dióban legnagyobb mennyiségben található szelén módosulat [149]. Az LRM gyártás és a hozzátartozó stabilitásvizsgálat célja a SeMet vizsgálata volt.

Miután a mintát megőröltük, Soxlet-extrakcióval zsírtalanítottuk, homogenizáltuk, tovább őröltük; a < 125 µm frakciót szitálással összegyűjtöttük, majd a BCR előírásoknak megfelelően kivitelettük a stabilitás vizsgálatot. Két kísérleti elrendezést alkalmaztunk, az ún. klasszikus és az izokrón kísérleti elrendezést.

1.5 g mintát 5x5 (minden kísérletet 5 párhuzamos méréssel végeztünk) polietilén tégllybe mértük. 4x5 téglly tartalmát γ-sugárzással kezeltünk a mikrobiológiai aktivitás és az ebből

esetleg bekövetkező bomlás elkerülése érdekében, majd ebből 3x5 mintát 3 hőmérsékleten (-18°C, +4 °C és +24 °C) sötétben tároltunk és három hónapon át minden hónapban elvégeztük a szelén vegyületek meghatározását (klasszikus kísérleti elrendezés). 1x5 mintát elkülönítettünk a stabilitás vizsgálat izokrón elrendezés szerinti elvégzésére. A fennmaradó 1x5 mintát a besugárzás hatásának ellenőrzésére használtuk – γ -sugárzás nélkül, -18 °C-on tároltuk és 1 hónap után a többi mintával együtt mértük.

7. Ábra A brazil dió LRM stabilitás vizsgálatának eredménye. A vízszintes vonal a várható középértéket jelöli, ami $\text{SeMet}=79.9 \mu\text{g g}^{-1}$, mint Se. (a) -18 °C, (b) +4 °C (c) +24 °C tárolás eredményeit jelöli, (d) izokrón elrendezés eredményeit, (e) γ -sugárzás kontrol eredményét. A számok: 1,2 és 3, a 1,2 és 3 hónapos tárolást jelölik



A stabilitás vizsgálat eredménye a 6. ábrán látható. A statisztikai kiértékelés szerint (variancia analízis, egyoldalú ANOVA) a SeMet koncentrációja a három hónap alatt mind a három hőmérsékleten tárolt mintában azonos maradt. A szobahőmérsékleten (+24 °C) tárolt minta esetén a statisztikai azonosság ellenére szemmel látható csökkenés észlelhető, mely a SeMet koncentráció további ellenőrzésével igazolható és mely jelenleg folyamatban van. Az izokrón elrendezés szerinti méréssorozat ($P=0.87$) és a besugárzás kontrollmintája is statisztikai azonosságot mutat a $79.9 \mu\text{g g}^{-1}$ SeMet (mint Se) átlagértékkel.

A három hónapos vizsgálat tapasztalatai a következők voltak. A brazil dió SeMet tartalmának stabilitása alapján a minta az előállítást követő három hónap folyamán alkalmazható laboratóriumi referencia mintának. A -18 °C és +4 °C-on sötétben való tárolással további

változatlan stabilitás feltételezhető, de erről megbizonyosodni csak több hónapos vizsgálat alapján lehet. A γ -sugárzás alkalmazása nem okozott a minta specieszeloszlásában változást, tehát alkalmazható a minta mélyhűtést és hűtést kiegészítő tartósítási eljárásaként.

A brazil dió LRM-nek való alkalmasságát vizsgáló kísérletsorozat, amely követte a BCR hiteles anyagminta gyártás folyamatának előírásait, bizonyítja, hogy házilag is elő lehet állítani speciációs mérések minőségbiztosítására alkalmas referencia anyagot. A vizsgált módosulat stabilitásának biztosítása érdekében azonban a tárolási körülményeket előkísérletek eredményeire alapozva pontosan kell meghatározni és betartani.

A mérésre előkészített minták eltarthatóságáról külön említést kell tenni. Az arzenit és arzenát instabilitása egyszerű vizes mátrixban is nyilvánvaló, amit a fenti kísérletek is bizonyítanak. Egy biológiai minta extraktuma, amely a mérendő arzén módosulatokon kívül számos más szerves és szervetlen alkotót is tartalmaz, méginkább elősegítheti a mérendő módosulatok átalakulását, esetleg komplexképződését. A hűtve tárolás az átalakulási folyamatokat lassítja, de az eredmény annál jobban tükrözi az eredeti állapotot, minél hamarabb végezzük el a módosulatok meghatározását.

Az enzimes kezeléssel nyert extraktumok jó táptalajok mikroorganizmusok elszaporodására, +4 °C-on is 3-4 nap után észrevehetőek a mikrobiológiai aktivitás jelei, mely könnyen okozhatja a szerves módosulatok bomlását ill. átalakulását és így megváltoztatja az extraktum mintát jellemző, eredeti módosulateloszlását. Ezek a jelenségek azzal okozzák a legnagyobb problémát, hogy a módosulatok esetleges átalakulását nem lehet ellenőrizni. Ha a mérést az előkészítés után 2-3 nappal kivitelezük, könnyen hihetjük, hogy az eredmény az eredeti állapotot tükrözi, miközben már egy átalakulás utáni állapotról ad képet. Mindezen jelenségek elkerülése érdekében az extraktum mielőbbi, optimális esetben a extrakció napján való elemzése a legjobb minőségbiztosítási megoldás. Mindenképpen hangsúlyozni kell, hogy az átalakulás és az átalakulást befolyásoló tényezők specieszenként és mátrixonként különbözőek, meghatározásuk ezért nehéz és sok esetben a megoldást csak a 'in-situ' elemzés jelentené. A jelenlegi műszeres analitikai berendezések azonban nem ebben az irányban fejlődnek. Leginkább az egyre jobb kimutatási határokkal rendelkező, de egyre nagyobb tisztaságot igénylő laboratóriumi berendezések fejlődése került előtérbe, így olyan tartósítási megoldásokra mindig szükség lesz, melyek a minták eredeti speciesz eloszlását ill. azt reprezentáló információt biztosítják a laboratóriumi elemzés alkalmazásához.

Összefoglalóan megállapítható, hogy módosulatok eredeti koncentrációjának meghatározása a minták mielőbbi elemzésével és/vagy a tárolási paraméterek (idő, hőmérséklet stb.) hatására bekövetkező változások felmérésével megbízhatóan elvégezhető. A stabilitást biztosító tárolási

körülmények nemcsak elem- és speciesz-specifikus jellemzők, de a mátrixfüggők is. A vizes oldatban szabadon jelenlevő alkotók stabilitás kisebb, mint a mátrix szerves molekuláihoz kötött alkotóké.

6.3 Részminta vétele – homogenitási vizsgálatok

Az speciációs méréseknél különösen fontos megbizonyosodni a minta homogenitásának mértékéről. A homogenitás befolyásolja a vizsgálati mintarészlet méretének meghatározását. Minél homogénebb a minta, annál kisebb bemérés is elegendő, ha a mérendő komponens koncentrációja és kimutathatósága is megengedi. Azonban, ha a minta inhomogén, a vizsgálati mintarészlet növelésével az eredmények reprodukálhatósága javítható. Ezt különösen fontos a speciációs analitikában az ismeretlen homogenitású minták elemzésekor figyelembe venni, mert a kémiai módosulatok jellegükből adódóan sokszor nem egyenletesen oszlanak el a mintákban, hanem annak egy-egy részében feldúsulnak.

A referencia anyagok hitelesítését ill. a laboratóriumi referencia minták előállítását szigorú előírások szabályozzák, többek között a homogenitás biztosítása érdekében. El kell távolítani a minta olyan részeit, melyben a mérendő alkotó, előkísérletek vagy más forrású információ alapján nem található meg, majd a BCR előírás szerint $< 125 \mu\text{m}$ szemcseméretet kell biztosítani. Ezek után párhuzamos méréseket kell végezni a homogenitás fokának ellenőrzésére.

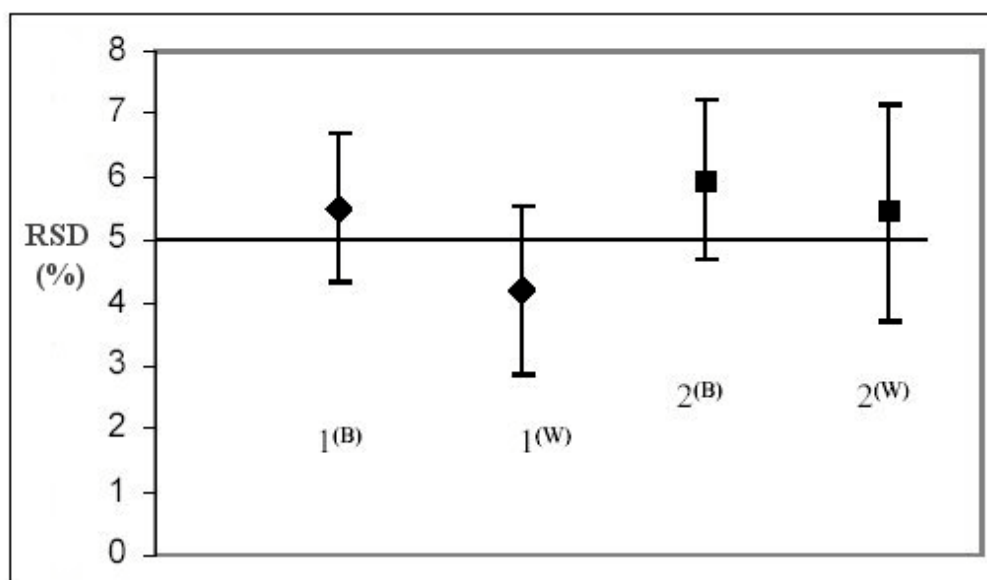
Munkám során az előző részben említett brazil dió laboratóriumi referencia minta előállítási folyamatának részeként homogenitás vizsgálatra is sor került.

A mintát megtisztítottuk, megdaráltuk, Soxlet-extrakcióval zsírtalanítottuk, tovább aprítottuk a $< 125 \mu\text{m}$ szemcseméret eléréséig, majd 1.5 g-os adagokban polietilén tégelyekbe osztottuk és így tároltuk. A BCR előírás szerint a minta megfelelő jellemzéséhez meg kell határozni az egy tégelyben levő minta homogenitását 'within vial homogeneity' és a tégelyek közötti homogenitást 'between vial homogeneity'. Az első jellemző meghatározására véletlen elrendezés szerint kiválasztottunk 2 tégelyt és 9-9 párhuzamos méréssel 150 mg-os vizsgálati mintarészlet alkalmazásával meghatároztuk a SeMet és az össz Se koncentrációt (mérési paraméterek lásd: 'Anyag és módszer' 8. Táblázat). A tégelyek közötti homogenitást szintén 9-9 párhuzamos méréssel, 9 különböző tégelyből származó 150 mg méretű mintán végeztük el.

Az 7. ábrán látható a homogenitás vizsgálat eredménye. Mind a össz Se-re, mind a SeMet-ra jellemző CV% értékek az előállított brazil dió por homogenitását bizonyítják. Megfelelően kicsik

és a tégelyen belüli homogenitás CV% értéke mindkét esetben kisebb, mint a tégelyek közötti homogenitásra vonatkozó érték.

7. Ábra A brazil dió minta homogenitás vizsgálatának eredménye. (1) össz Se meghatározást jellemző CV % érték, (2) SeMet koncentrációt jellemző CV % érték. Az index (W) és (B) a tégelyen belüli ill. a tégelyek közötti értékeket jelzi. Az átlag eredmények 1 szórás értékkel vannak feltüntetve.



A homogenitás vizsgálat eredménye alapján elmondható, hogy az előállított brazil dió minta alkalmas SeMet és össz Se koncentráció meghatározás laboratóriumi referencia mintájának. A mérési sorozat eredményei bizonyították, hogy a minta előkezelésével sikerült olyan homogenitást elérni, hogy viszonylag kis, 150 mg –os vizsgálati mintarészlet alkalmazásával is homogénnek tekinthető a minta. Mivel a minta SeMet koncentrációja (mint Se, $79.9 \mu\text{g g}^{-1}$) viszonylag nagy, 150 mg –os vizsgálati mintarészlet alkalmazása a nem kiemelkedően jó kimutatási határral rendelkező módszerek Se speciációs módszerek alkalmazásakor is elegendő.

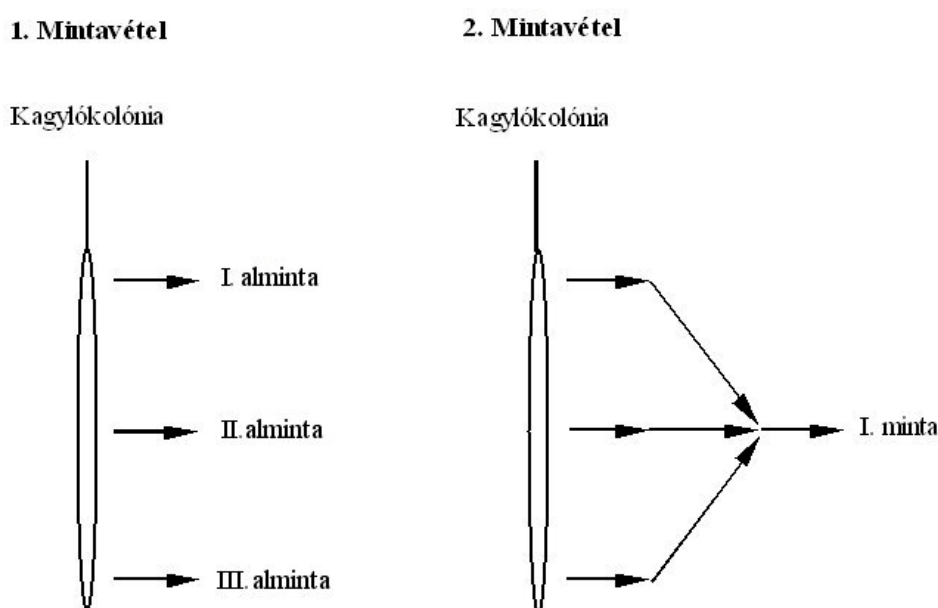
A rutin speciációs elemzéseknél sem lehetőség, sem szükség nincs arra, hogy a minta homogenitását a brazil dió mintához hasonlóan biztosítsuk. Ezért mindenképpen tanácsos nagyobb vizsgálati mintarészlettel és több párhuzamos beméréssel jellemezni a mintát.

A szardíniai kagylóminták össz- és metilhigany tartalmának meghatározásával a rutin minták homogenitását befolyásoló tényezőkből mutatok be néhányat. A minták beszerzése két mintavételi kampány keretében 8 város kikötőjének összesen tíz mintavételi pontjáról történt. Minden mintavételi ponton egy kísérleti kagylókolónia volt és mindkét kampány keretében minden helyről 3 mintát vettek, a kolónia aljáról, közepéről és tetejéről. A laboratóriumban az

első kampány mintavételi pontjainak 3-3 mintáját külön dolgoztuk fel, tehát egy mintavételi pontról 3 homogenizált és liofilizált minta volt. Ugyan a második mintavételnél is a kolóniák három pontjáról vettek mintát, de rögtön a mintavételt követően az almintákat összeöntötték és a laboratóriumban együtt kerültek feldolgozásra, ezért minden mintavételi pontot csak egy homogenizált és liofilizált minta jellemzett. A mintavételi elrendezés a 8. ábrán látható.

A vizsgálati mintarészlet vétele a következőképpen történt az össz- és metil higany tartalom meghatározásához. Az első kampányban egy mintavételi pont 3 almintájából 1-1 mérést végeztem és a minta össz- és metil higany tartalmát a 3 alminták eredményéből számolt átlaggal és szórással jellemeztem. Mivel a második kampány mintavételi pontjait a laboratóriumban már egy minta jellemezte, minden mintából 3 párhuzamos mérést végeztem. Mindkét esetben egy véletlenszerűen kiválasztott, már mérésre előkészített mintát ötször elemeztem metil higany tartalomra, mely a GC-MS analitikai módszer ismételhetőségét (1.4 %) jellemezte, és egy véletlenszerűen kiválasztott mintát ötször elemeztünk összhigany tartalomra, mely a DMA módszer ismételhetőségét (0.5 %) adta meg.

8. Ábra A 1. és a 2. mintavételi kampány mintavételi elrendezése

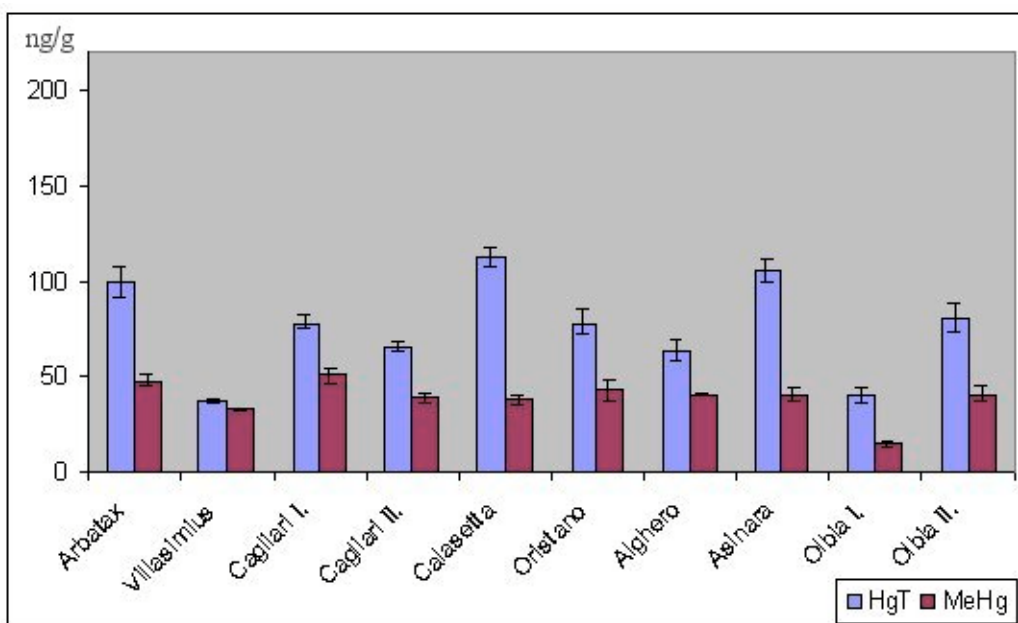


A 9. és 10. ábrán az 1. és a 2. mintavételi kampány eredménye láthatók. Minden mintavételi pontnál az első oszlop jelöli az össz-, a második a metil higany koncentrációt, és az oszlopok tetején jelölt tartomány jelzi az eredmény szórását.

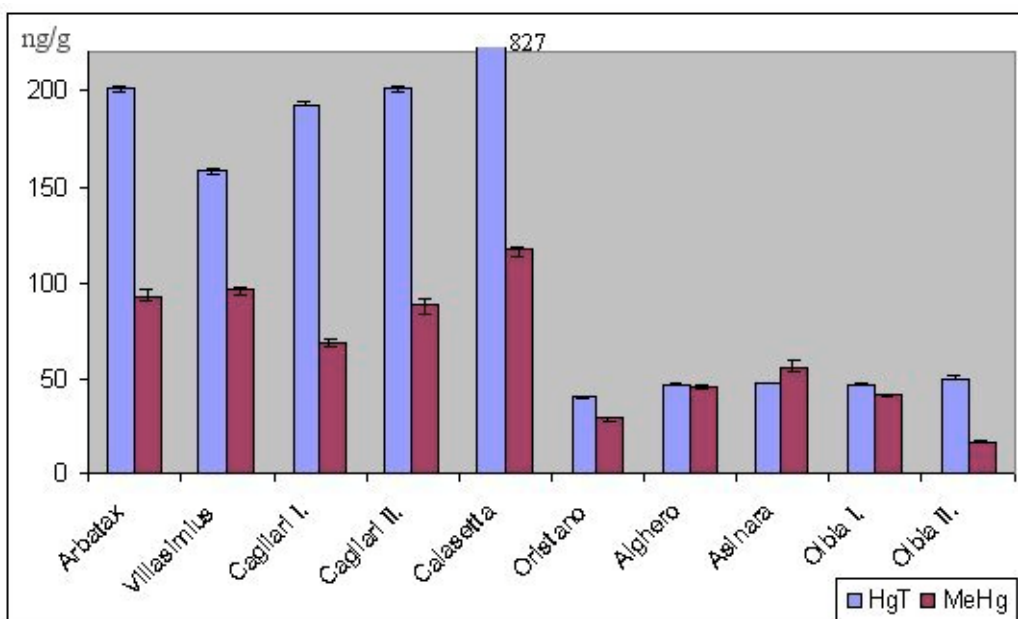
A két mintavételi kampány eredményeit összehasonlítva elmondhatjuk, hogy az 1. mintavétel eredményeinek szórása jelentősen nagyobb a 2. mintavétel eredményeinek szórásánál. Mivel a jelenség minden mintára és mind az össz-, mind a metil higany tartalomra igaz, ezért

feltételezhető, hogy a különbség a homogenizáltság mértékéből ered. A 2. kampánynál a három almintát együtt homogenizáltuk, és így az alminták koncentráció különbsége eltűnt, míg az 1. kampány mintáinál a szórás növekedésében mutatkozott meg.

9. Ábra Az első mintavételi kampány eredményei ng g^{-1} -ban kifejezve. Az első oszlop jelöli az ΣHg , a második a MeHg koncentrációt



10. Ábra A második mintavételi kampány eredményei ng g^{-1} -ban kifejezve. Az első oszlop jelöli az ΣHg , a második a MeHg koncentrációt



A kagylóminták homogenizáltságának foka nem érte el a brazil dióét. A metilhigany koncentráció meghatározásához 0.4-0.5 g-os bemérésekkel dolgoztam. A vizsgálati mintarészlet méretének csökkentését a komponens kis koncentrációja nem tette lehetővé, így a csökkentés szórásra való hatását nem tudtam vizsgálni. A párhuzamos mérések számát sem tudtam tovább emelni, mert nem állt rendelkezésemre elegendő minta. Az összhigany meghatározásnál 0.1 g-os beméréseket alkalmaztam, mely kis mintatömegnek számít, mégis megfelelő megbízhatóságot (RSD=0.5 – 1.2 %) eredményezett.

A brazil dió laboratóriumi referenciaminta előállítására és a szardíniai kagylóminták elemzése egyértelműen bizonyítja a minta homogenitásának fontosságát az analitikában. Ahhoz, hogy referenciamintaként alkalmazható mintát állítsunk elő a laboratóriumban, gondosan megválasztott lépések sorozatát kell betartanunk a kellő homogenitás biztosításához. A homogenitás megvalósulásáról pedig előírás szerint kell megbizonyosodnunk. Az előállított LRM minta célnak való megfelelőségét a stabilitás és homogenitás vizsgálattal megállapíthatjuk.

A kagylóminták elemzése bemutatta, hogy bár rutin elemzéseknél a minta nagyfokú homogenitásának biztosítására nincs lehetőség, de párhuzamos bemérések, megfelelő méretű vizsgálati mintarészlet és a minta gyors homogenizálásának alkalmazása biztosítja az eredmények megbízhatóságát.

14. Táblázat A szardíniai I. mintavételi kampány eredményei. (I).jelöli a kolónia felső részéből, (II) a kolónia közepéről és (III) a kolónia aljából vett mintát jellemző MeHg ill. ΣHg koncentrációt

	MeHg (ng Hg g ⁻¹)			ΣHg (ng Hg g ⁻¹)		
	I.	II.	III.	I.	II.	III.
Arbatax	39.4	31.4	39	110.1	81.9	108.0
Villasimius	27.3	25.1	25.0	38.3	37.5	34.7
Cagliari I.	35.6	37.1	46.0	70.1	83.7	82.2
Cagliari II.	32.7	32.2	24.8	61.9	71.5	64.0
Calasetta	26.9	34.0	26.6	114.4	121.9	102.4
Oristano	37.3	23.4	39.5	70.4	71.2	96.7
Alghero	30.7	33.0	30.6	54.8	72.3	70.1
Asinara	27.2	37.6	30.2	119.9	97.4	99.8
Olbia I.	30.2	37.6	26.1	72.9	98.9	71.8
Olbia II.	8.0	11.9	13.8	31.8	39.9	46.8

Arról azonban nem szabad elfeledkezni, hogy a felsorolt paraméterek mintáról mintára és komponensről komponensre változhatnak; és arról sem, hogy az alminták együttes homogenizálása ugyan javítja a homogenitást, ez akár információvesztéshez is vezethet. A kagylókolóniák három magasságából vett minta arra is lehetőséget nyújtott, hogy megvizsgáljam, hogy a vizsgált területen észlelhető-e összefüggés a kagylóminták Hg és MeHg koncentrációja és a vízmélység között. A 14. táblázat az 1. mintavételi kampány eredményeit részletezi, minden mintavételi pont mindhárom almintájának Hg és MeHg koncentrációját mutatja be. Az adatok alapján megállapítható, hogy a vízmélység és a higanykoncentráció között nincs korreláció. A koncentrációk minden mintavételi pont esetén azonos nagyságrendben vannak és a különbségek is csak szórásjellegűek.

A kísérletek azt bizonyítják, hogy a mintavétel után elvégzett homogenizálás jelentősen befolyásolhatja az analitikai mérések megbízhatóságát. A vizsgált esetben az eredmények információtartalmát az egy pontról vett alminták együtt homogenizálása nem változtatta, de bizonyos esetekben akár információvesztéshez is vezethet. A bemutatott mintavételi elrendezés a bemutatott esetben nem mutatott a vízmélység és a higanykoncentráció között összefüggést, de alkalmas ilyen jellegű környezeti információ felderítésére is.

6.4 Extrakció

Szekvenciális extrakció

Az szekvenciális extrakció minőségbiztosítását a egy három lépéses szekvenciális extrakciós technika és a BCR 601 bizonylatolt referenciaminta, melyet a BCR három lépéses szekvenciális extrakció alapján hitelesítettek, segítségével vizsgáltam.

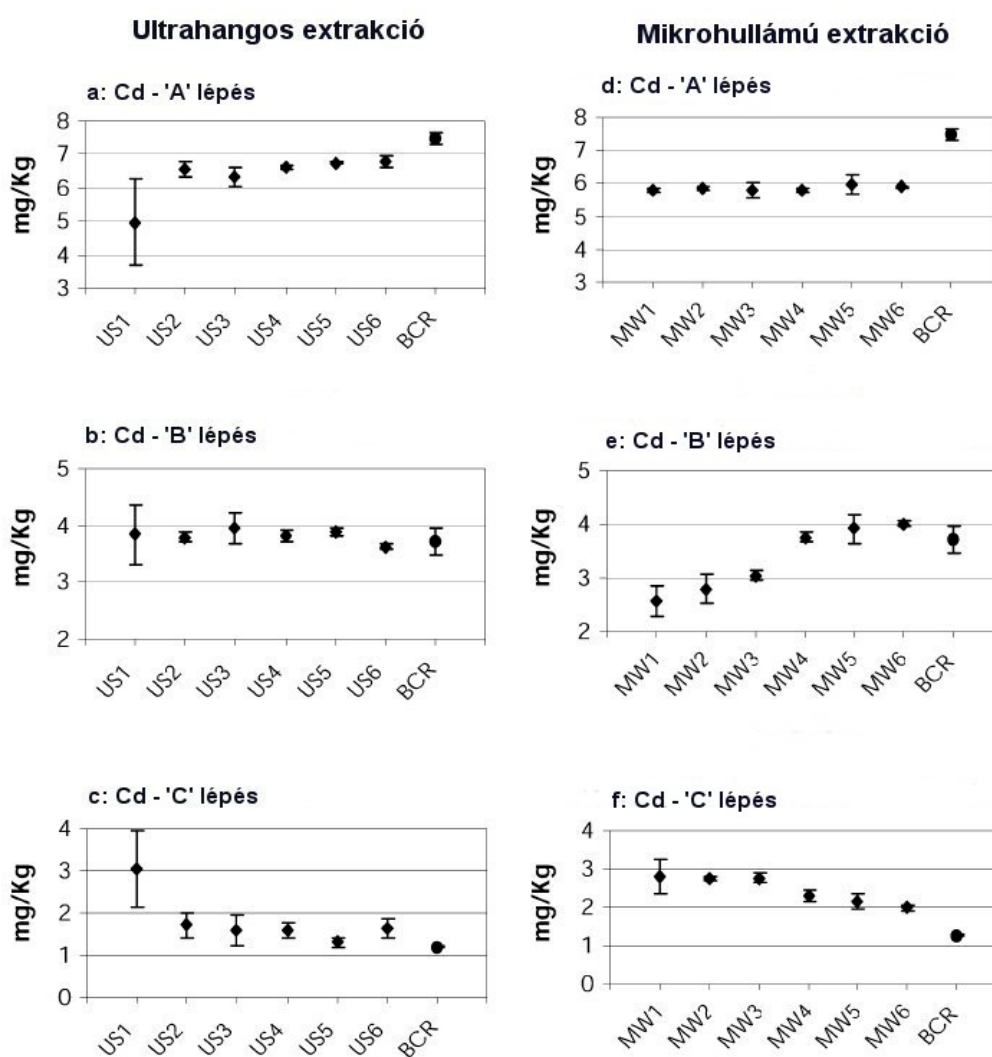
Az extrakció és a CRM együttes alkalmazásával, minden felhasználó a bizonylatolt és a saját kivitelezésnél kapott értékek összehasonlításával megbizonyosodhat arról, hogy felkészült-e arra, hogy a technikát ismeretlen minták jellemzésére is megbízhatóan alkalmazza. Ha a bizonylatolt és a kapott értékek azonossága megfelelő, a laboratórium az extrakciót megfelelő megbízhatósággal tudja alkalmazni. Tehát a továbbiakban a CRM 601-t ismeretlen minták mellett párhuzamos mintaként annak ellenőrzésére alkalmazhatja, hogy a folyamat napi kivitelezésében felmerülő ingadozásokat, hibákat nyomon tudja követni, és így az ismeretlen mintát jellemző adatokat megbízhatóvá tegye.

A BCR három lépéses szekvenciális extrakció több egymásra épülő lépésből álló összetett folyamat, ahol egy lépés nem megfelelő végrehajtása, az összes azt követő lépést és a

végeredmény alakulását is meghatározza. A eredmények minőségét mindenekelőtt azzal tudjuk biztosítani, hogy az előírt lépéseket pontosan betartjuk.

Rutin laboratóriumok számára meglehetősen nagy gondot jelent, hogy a klasszikus BCR eljárás négy napot igénylő munkafolyamat. Kutatási munkám részeként kidolgoztam a BCR három lépéses szekvenciális extrakció két időtakarékos változatát, mely a folyamat időigényét négy napról egy napra csökkentette.

11. Ábra Az extrakció A, B és C lépésében kapott eredmények az ultrahangos (a-c) és mikrohullámú (d-f) módszer optimálásában alkalmazott 6-6 paramétersereggel és a klasszikus BCR módszer alkalmazásával.



A munkát az alábbi módon kiviteleztem. Az időtakarékos változatok kifejlesztéséhez rutin ultrahangos tisztítókádat és mikrohullámú roncsolót alkalmaztam, és az optimálást RM S7 referencia mintán végeztem, melynek tájékoztató értékeit nemzetközi összemérés során

allapították meg. Az optimalás célja az tájékoztató értékek elérése volt az új paraméterekkel. Az optimalás paramétereit és lépéseit az ‘Anyag és módszer fejezet’ részletesen tárgyalja.

Első lépésként a BCR extrakciót a CRM 601-en kiviteleztem és megbizonyosodtam arról, hogy a bizonylatolt értékeket visszakaptam. Majd a klasszikus BCR extrakcióval meghatároztam az RM S7 hat elemre vonatkozó értékeit és összehasonlítottam a nemzetközi összemérés tájékoztató értékeivel. Az értékek statisztikailag azonosak voltak. Következő lépésként azt vizsgáltam, hogy mely paramétersereggel kapom vissza a legjobban a minta BCR extrakcióval kapott értékeit. A 11. ábrán az ultrahangos és a mikrohullámú extrakció Cd-ra vonatkozó eredményei láthatók a klasszikus extrakcióval kapott eredményekkel összehasonlítva.

Az öt elem együttes statisztikai kiértékelése alapján az ultrahangos US4 és a mikrohullámú MW5 alternatív extrakciók bizonyultak a legjobbnak. A kiértékelés a bizonylatolt hat elem (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb és Zn) közül öt (Cd, Cr, Cu, Ni és Zn) három frakcióban levő koncentrációját vette figyelembe, ezeknek az értékeknek kellett a lehető legjobban megközelíteni a BCR extrakcióval kapott eredményeket és kielégíteni a statisztikai azonosság követelményeit.

15. Táblázat A BCR, az optimált ultrahangos (US4) és optimált mikrohullámú extrakcióval (MW5) a CRM 601-re kapott eredmények összehasonlítása; * jelöli azokat az értékeket, melyek a BCR 601-ben nem hitelesítettek (ún. indikatív értékek); a statisztikailag nem egyenlő értékeket ‘kövér’ betű jelzi

BCR 601	Cd	Cr	Cu	Ni	Zn
‘A’ lépés (mg kg⁻¹)					
BCR	4.65 ± 0.04	0.34 ± 0.06	11.4 ± 0.3	10.1 ± 1.7	250 ± 6
US4	3.87 ± 0.88	0.57 ± 0.29	9.8 ± 1.9	5.0 ± 1.5	174 ± 42
MW5	2.98 ± 0.17	0.80 ± 0.03	8.60 ± 0.62	3.50 ± 0.21	78.3 ± 1.5
‘B’ lépés (mg kg⁻¹)					
BCR	3.12 ± 0.03	0.35 ± 0.01*	2.33 ± 0.05*	5.32 ± 0.86	159 ± 1
US4	3.53 ± 0.05	0.31 ± 0.06	3.57 ± 0.42	4.12 ± 0.37	142 ± 3
MW5	1.74 ± 0.21	0.30 ± 0.01	2.73 ± 0.20	3.30 ± 0.05	108 ± 4
‘C’ lépés (mg kg⁻¹)					
BCR	2.49 ± 0.04	23.9 ± 0.6*	153 ± 2*	10.9 ± 0.2	215 ± 4*
US4	2.34 ± 0.02	20.5 ± 0.01	114 ± 2	10.3 ± 0.5	208 ± 4
MW5	2.13 ± 0.10	23.3 ± 1.6	75.5 ± 2.2	8.2 ± 3.2	99 ± 8

Végül a statisztikai kiértékelés eredményeképp kiválasztott US4 és MW5 alternatív extrakciót a CRM 601-re is alkalmaztam és a kapott eredményeket a összehasonlítottam a BCR hitelesített extrakció eredményeivel (15. Táblázat).

A statisztikai kiértékelést minden esetben F-teszt, majd egyenlő varianciák esetén Student t-teszt ill. nem egyenlő varianciák esetén Cochran-teszt alkalmazásával végeztem. A kiértékelés részletesen a 2. melléklet 6. cikkében található.

A kísérletsorozat tanulságai a következők. Saját tapasztalatom azt mutatja, hogy a BCR három lépéses szekvenciális extrakció megbízható és jó eredményét a protokoll pontos betartása biztosítja. Az extrakció végrehajtás pontosságának ellenőrzése és a kapott eredmények minőségbiztosítása a BCR extrakcióval hitelesített CRM 601 használatával megoldható. Ha a folyamatban bármilyen paramétert módosítunk, a CRM használatával a hitelesített folyamattal biztosított hatásfoktól való eltérés meghatározható.

A klasszikus BCR extrakció kidolgozott gyorsított változatait csak több lépéses optimálás és az eredmények statisztikai kiértékelése után javasolhatók alternatívaként rutin analitikai mérésekhez. Mivel a CRM 601-t a BCR technikával hitelesítették, így más szekvenciális extrakciós procedúrák minőségbiztosítására csak abban az esetben alkalmas, ha a hatásfok kiértékelését a BCR technikával való összehasonlításra alapozzuk.

Meg kell azonban jegyezni, hogy bár a CRM alkalmazása megfelelő minőségbiztosítási eszköz, szekvenciális extrakcióknál is számolni kell a mátrixhatással. A mátrixból eredő különbségek miatt akár mintáról mintára is változhat az extrakció hatásfoka, melyet a BCR 601 CRM használatával sem tudunk kiküszöbölni. Tehát a CRM alkalmazásával csak arra kapunk bizonyítékot, hogy az extrakciós folyamatot megfelelően kiviteleztük-e, és nem arra, hogy az ismeretlen mintára kapott eredmény a valóságot tükrözi. A mátrixok azonosságának kérdése a bizonylatolt és ismeretlen anyagminták használatának egyik kulcskérdése akkor is, ha ez nem bonyolult és egymásra épülő lépésekből álló szekvenciális extrakció. Azonban optimálás során elérhető olyan paramétersereg, mely az eredeti BCR metodikával összemérhető eredményeket ad és a kivitelezés gyorsítható.

Összefoglalóan megállapítható, hogy bár a BCR 3-lépéses szekvenciális extrakció rendkívül időigényes folyamat és minden paraméter (oldószer, oldószerarány, extrakciós idő, hőmérséklet stb.) nagy mértékben befolyásolja hatékonyságát, a 'BCR 601' bizonylatolt referencia anyaggal együtt alkalmazva kidolgozott minőségbiztosítási rendszert alkot és a paraméterek változtatása esetén a folyamat újra validálására is lehetőséget nyújt.

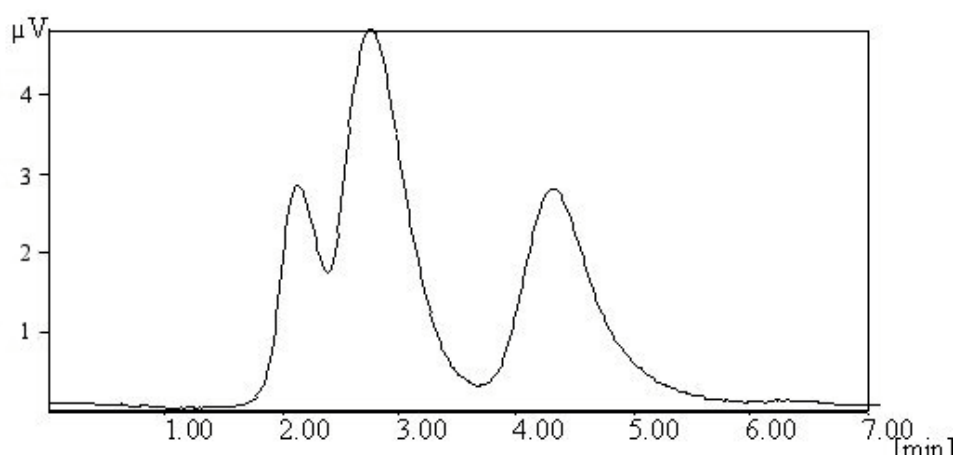
Statikus speciációhoz alkalmazott extrakció

Három példával szemléltetem azt, hogy az extrahálószer választás, az extrakciós paraméterek optimalizálása és az kromatográfiás elválasztás extrakcióval való összehangolása nagyon fontos ahhoz, hogy a módosulatok a speciációs analízis végéig megőrizték eredeti kémiai formájukat.

Az első példa a standard oldatokon szemlélteti, hogy a tetrametil ammónium hidroxid (TMAH) extrahálószer alkalmazása hogyan változtatja meg a három szeleno aminosav – SeCys, SeMet és SeEt – kromatogramját ionpárképző kromatográfia használatánál. A 12. ábrán a három vegyület mennyiségi meghatározása csak csúcsmagasság alapján alkalmas – az eluálódás sorrendje SeCys, SeMet és SeEt az. A 13. ábrán azt a kromatogramot mutatom be, melyet a standard keverék TMAH-val való kezelése után kaptam. Itt a három speciesz nem azonosítható. Egyetlen csúcs jelent meg a kromatogramon, melynek retenciója az eredeti módosulatok egyikével sem azonos.

A tetrametilammonium-hidroxid az alkalmazható lúgok közül a legelőnyösebb, mert ellentétben a erősebb alkáli lúgokkal, nem terheli a mérőrendszert alkálifém koncentrációval, és nagy az extrakciós hatások. A TMAH Se speciációra való alkalmasságának vizsgálata egyike volt az első extrakciós kísérletsorozataimnak. A három módosulat összemosódásának jelenségét akkor úgy magyaráztam, hogy az extrakció során feltehetően egy negyedik, ismeretlen módosulat keletkezett. Mivel az irodalomban hasonló megfigyeléseket találtam, az elméletet elfogadtam.

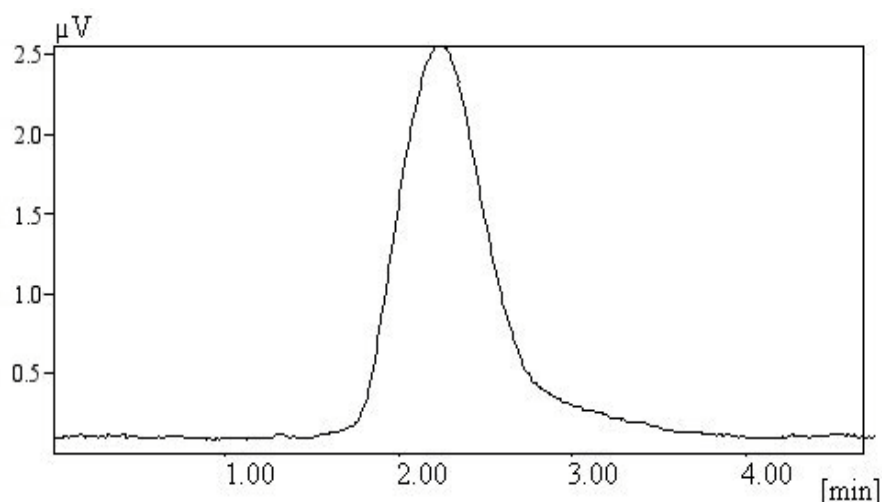
12. Ábra A SeCys, SeMet és SeEt kromatogramja ionpárképző kromatográfiával minőségi azonosításra



Ismeretes, hogy egy különböző elvű kromatográfiás módszer alkalmazása alátámaszthatja az ismeretlen alkotó jelenlétét, de az ellenkezőjét is. Ha speciációs rendszerünk kimutatási képessége megengedi, akkor az extraktum több lépcsős hígításával megállapíthatjuk, hogy a

kémiai forma alakult át, vagy az extrahálószer jelenléte módosította az elválasztás minőségét. Ha mátrixhatással állunk szemben, azt hígítással csökkenteni, de akár kiküszöbölni is lehet.

13. Ábra A SeCys, SeMet és SeEt kromatogramja a TMAH-s kezelés után



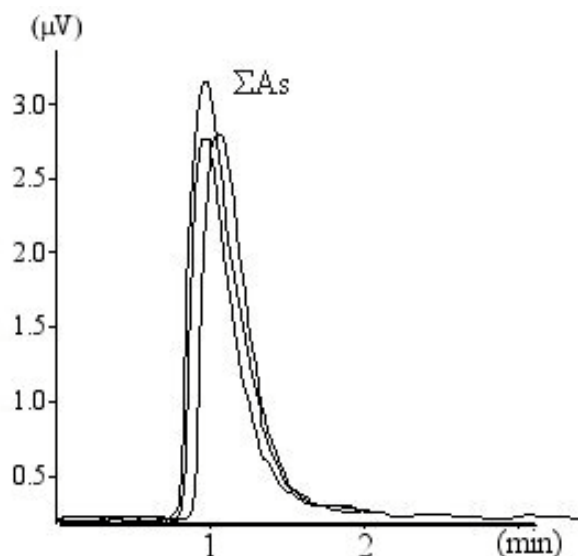
A második példa azt szemlélteti, hogy az extraktum koncentrációjának változtatásával meg lehet határozni, hogy a mintaelőkészítés során megváltozik-e a specieszek koncentrációja vagy csak a kémiai formák retenciós ideje módosul az extrakció és mintamátrix együttes hatására. Majd példa mutatja be, hogy ha az extrakció paramétereinek változtatásával nem oldható meg a minta koncentráció-viszonyainak megfelelő elválasztás, akkor az elválasztási paraméterek módosításával lehet elősegíteni az extrakció okozta mátrixhatások kiküszöbölését.

Csirkehús minták HPLC-HG-AFS rendszerrel történő arzén speciációjához extrakciós technikát választottam. Irodalmi adatok alapján savas, vizes és enzimikus extrakció alkalmazását vettem számításba, majd előkísérletekkel vizsgáltam alkalmasságukat.

Az első lépésében kromatográfiás elválasztás nélkül vizsgáltam azt, hogy a négy mérendő arzénmódosulat, As(III), MMAs, DMAs, As(V), hidridképzési hatásfokát befolyásolja-e a sav ill. az enzimikus médium jelenléte.

A 14. ábra a négy As módosulatot tartalmazó standard oldat állófázis nélküli Σ As koncentráció meghatározásának eredményét mutatja. A négy görbe alatti területben nem mutatkozott szignifikáns különbség, a koncentrációkban talált eltérés csekély - szórásjellegű - volt. A vizes standard oldat integrált területéhez hasonlítva a savas mátrixnál jelentkezett a legnagyobb különbség, mely ebben az esetben sem volt több, mint 5%.

14. Ábra A négy arzénmódosulatot tartalmazó standard összarszén meghatározása vizes extrakciós mátrix, enzimes extrakciós mátrix, savasan roncsolt közegben és ioncserélt vízben

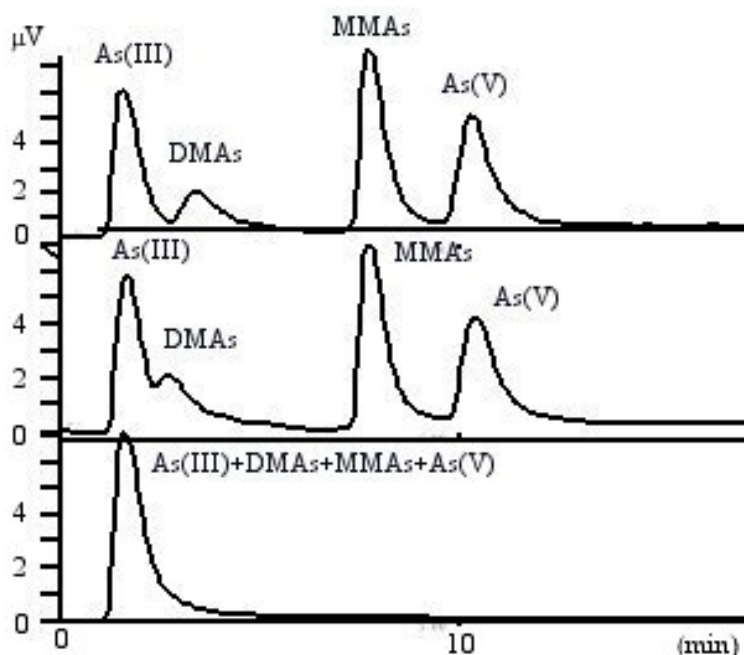


Az elválasztásról sajnos már nem mondható el ugyanez. HNO_3 -al végzett savas roncsolás savkoncentrációját modellezve a standard oldat mind a négy komponense egy csúcsban már a holt idővel eluálódott. Ezért a kísérlet következő lépésében azt vizsgáltam, hogy a savkoncentráció milyen hatással van az elválasztásra, majd meghatároztam, hogy mekkora hígítási faktor szükséges a négy módosulat mennyiségi meghatározást lehetővé tevő elválasztásához. A 15. ábrán látható, hogy már 1 v/v % savtartalom sem teszi lehetővé a hasonlóan gyenge ionos karakterű As(III) és a DMA-s elválasztását, 5 v/v % savtartalomnál pedig a négy módosulat már nem válik el. A megfelelő elválasztáshoz olyan nagymértékben kellene hígítani az extraktumot, hogy a módszer kimutatási határa nem tenné lehetővé a módosulatok azonosítását és mennyiségi meghatározását, így ez az extrakciós technika nem bizonyult alkalmasnak a vizsgált csirkehús minták kezelésére a kis összarszén koncentráció miatt.

A vizes és az enzimes extrakció modellezésekor azonban a DMA-s csúcsa vált meghatározhatatlanná az alkalmazott állófázissal. A jelenség okának vizsgálatára modellmátrixokat készítettem egy előzőleg ICP-AES-rel elemzett csirke-vizes mátrixrendszer mintájára.

A modellmátrixok az extraktum szerves iontartalmát jellemezték különböző hígításokban, mivel az ionpárpépző kromatográfia lényegét tekintve ezek az ionok jelenthetnek zavaró hatást, ugyanis a szerves makromolekulákat a mintaelőkészítésben alkalmazott szűrő és az elválasztáshoz használt előtétkolonna feltehetően kiszűri.

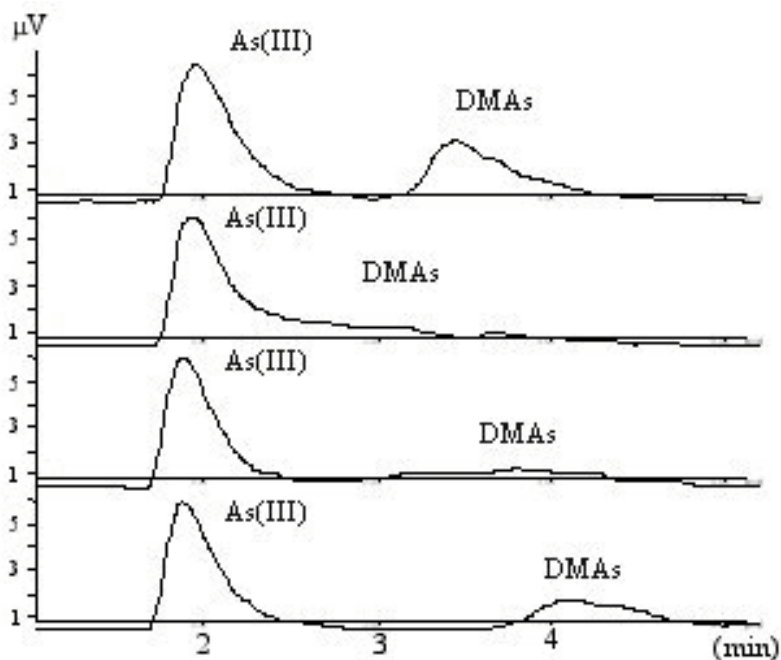
15. Ábra Növekvő HNO_3 koncentráció (fentről lefelé: 0 v/v %, 1 v/v %, 5 v/v %) hatása a négy módosulat elválasztására



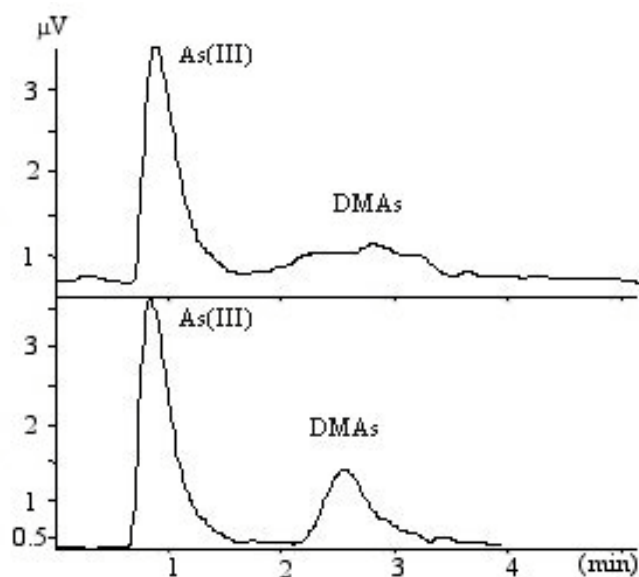
Az egyik a modelloldatok közül a 3.8 m/m %-os NaCl volt, mellyel 100 ng mL^{-1} As(III) és DMA₅ oldatot készítettem és a két hasonló karakterű As módosulat kromatográfiás viselkedését vizsgáltam. Majd az oldatot két lépcsőben tovább hígítottam. A 16. ábrán látható, hogy szelektív elválasztást csak a 2. hígítással kaptam, tehát az eredeti NaCl koncentráció negyedénél, de a csúcs még itt sem volt mennyiségileg meghatározható. A további hígítást a csirke extraktum koncentrációi és a speciációs rendszer ('Anyag és módszer' fejezet 5. Táblázat) kimutatási határai sem tették lehetővé.

Hasonló eredményeket kaptam $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - és KBr-modelloldat vizsgálatokor is. Mivel a mátrixalkotók külön vizsgálva is kromatográfiás problémákat okoztak és a minta kívánt mértékű hígítását nem tudtam kivitelezni, a következő lépésben egy kromatográfiás paraméter módosítása mellett döntöttem. A DDAB ionpároképző koncentrációját növeltem - 0.1 v/v %-ról 2 v/v %-ra. A 17. ábrán látható a 0.1 és 2 v/v % DDAB koncentrációval kapott kromatogram 1.9 m/m % NaCl-ot tartalmazó oldatból. Megállapítottam, hogy mind a vizes, mind az enzim extrakció esetében a 2 v/v % DDAB koncentráció alkalmazása kiküszöbölte a mátrix okozta problémákat, megfelelő elválasztást és megfelelő csúcsintenzitást is biztosított. A jelenség magyarázatának azt feltételeztem, hogy nagyobb mennyiségű ionpároképző jelenléte az eluensben képes arra, hogy micellákat alakítson ki és magába zárja a mátrix különböző ionjainak nagy részét és így módon kiküszöböli az elválasztás módosulását.

16. ábra A NaCl koncentrációjának hatása az As (III) és a DMA elúciójára – fentről lefelé ioncserélt vízben, 3.8 m/m % NaCl oldatban, 1.9 m/m % NaCl oldatba és 0.95 m/m % NaCl oldatban.



17. Ábra As (III) és DMA 0.1 v/v %-os, majd 2 v/v %-os DDAB eluenssel 1.9 m/m % NaCl oldatban



A példa azt mutatja be, hogy olyan esetekben, amikor a mérendő módosulat koncentrációja megengedi, az extraktum hígításával megbizonyosodhatunk arról, hogy az adott kémiai forma koncentrációja változik-e meg az előkészítési folyamat során vagy mátrixhatás változtatja meg az információt. Ezen kívül azt is látható, hogy abban az esetben, ha a szükséges hígítás a

módszerünk kimutatási határa alá vinné a mérendő módosulat koncentrációját, a kromatográfiás módszert kell módosítani.

A harmadik példával azt a fenti állítást szeretném alátámasztani, hogy ha a minta mérendő koncentrációja megengedi, akkor az extraktum egyszerű hígítása is megfelelő megoldás lehet a mennyiségi meghatározást lehetővé tevő elválasztásra.

Iparilag szennyezett talajok arzén speciációját határoztam meg egy EU projekt keretében, melyhez a Thomas és munkatársai [150] által kidolgozott foszforsavas mikrohullámú extrakciót vettem alapul. A módosulatok meghatározásához HPLC-HG-AFS technikát alkalmaztam az 'Anyag és módszer' fejezet 3. táblázatában leírt kromatográfiás paraméterekkel. A szerző munkájában nyitott fókuszált mikrohullámú roncsolót alkalmazott, mely nem állt rendelkezésemre. Tehát a kísérlet első lépéseként azt kellett megvizsgálnom, hogy a kutatás során optimált mikrohullámú extrakció azonos hatékonysággal alkalmazható-e a más kicsatolású és energia eloszlású mikrohullámú rendszerben.

Ismeretes, hogy a metilezett arzén formák, a DMAs és az MMAs stabilak, savas roncsolás során sem bomlanak [25], míg az As(III) savas környezetben könnyen As(V)-té alakul. Ezért 3-3 párhuzamos méréssel megvizsgáltam, hogy 15 perces-10% (60W)-os roncsolás folyamán, 1 és 2 mol L⁻¹ H₃PO₄ alkalmazásakor mennyire őrzi meg a két instabil módosulat, az As(III) és az As(V) kémiai formáját. Mivel mindkét savkoncentráció mind a két módosulatra 95-100 % közötti visszanyerést eredményezett, megállapítottam, hogy a zárt mikrohullámú roncsoló a fenti programmal nem eredményezte a kémiai formák módosulását, tehát alkalmazható talajminták speciációs extrakciójára.

A minta tájékoztató As módosulat koncentrációit figyelembe véve az alkalmazott módszer kimutatási határai nem engedték a 0.3 g-os vizsgálati mintarészlet 50 mL foszforsavval való extrakcióját. A mintamennyiséget 0.5 g -ra növeltem, az extrahálószer térfogatát pedig 25 mL-re csökkentettem, mellyel a 3.3-szoros relatív dúsítást értem el.

A következő lépésben az új minta/extrahálószer arány extrakciós hatékonyságának vizsgálatát végeztem el mind az 1, mind a 2 mol L⁻¹ koncentrációjú H₃PO₄ -val, 3-3 párhuzamos mintával, extrahált összarszen koncentrációt tekintve. Mindkét talaj esetén, mindkét savkoncentrációval megfelelően kis eltéréssel visszakaptam az tájékoztató értékeket - az eredmények a 14. táblázatban láthatók. Mivel az előkísérletek alapján a vizsgált savkoncentráció sem a módosulatok integritását, sem az extrakciós hatékonyságot nem befolyásolta, a talajminták arzén speciációjához a hígabb, így a kromatográfiás elválasztás kevésbé befolyásoló 1 mol L⁻¹ töménységű H₃PO₄-at választottam.

Annak ellenére, hogy a lehető leghígabb H_3PO_4 koncentrációt alkalmaztam, a minták elemzése előtt még azt is megvizsgáltam, hogyan befolyásolja az extraktum foszfát koncentrációja a módosulatok elválasztását. Az As(III) és DMAs elválasztása a két módosulat hasonló ionos karaktere miatt mindig limitáló tényező; az As(V) csúcs pedig, amely a négy vizsgált speciesz közül utoljára eluálódik, a savkoncentráció és a mátrixhatás növekedésével ill. az elválasztási program növekedésével általában kenődik. Ezen kívül azt is figyelembe kellett venni, hogy az elválasztáshoz 0.005 és 0.015 mol L⁻¹ –es, tehát híg, foszfát eluenst alkalmaztam, míg az extraktum nagyságrendekkel nagyobb, 1-2 mol L⁻¹ foszfátot tartalmazott. Ez a töménység már könnyen befolyásolhatja a komponensek elúciós sajátosságait az oszlop lokális egyensúlyának megváltoztatásával.

16. Táblázat Az új minta/extrahálószer aránnyal kapott extrakciós hatások a vizsgált két talajminta ΣAs tartalmát tekintve

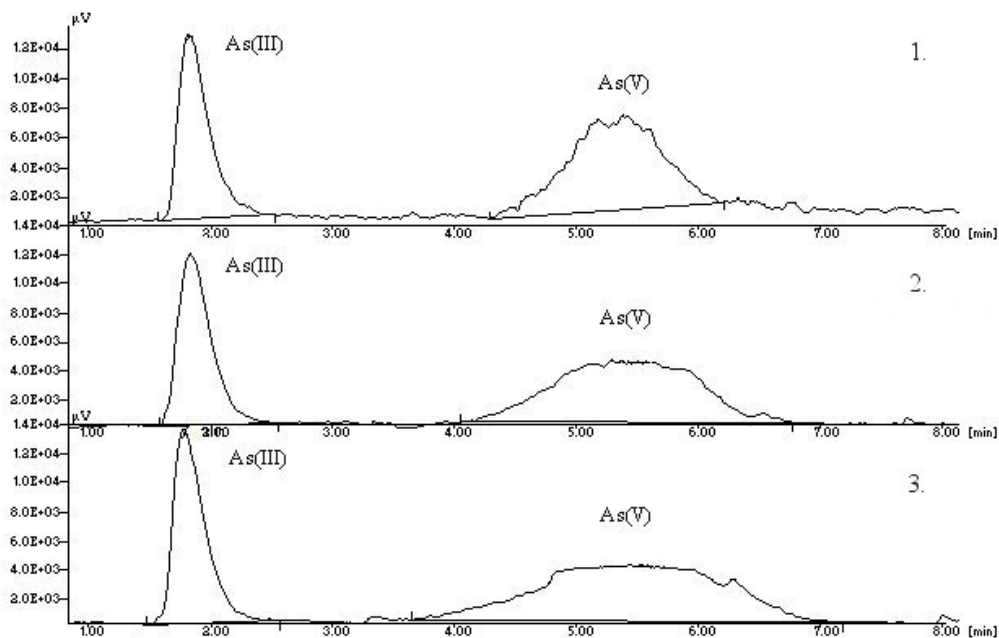
Minta	Tájékoztató érték	Mért érték (mg kg ⁻¹)	Különbség (%)
IPL-1	~1730		
1 mol L ⁻¹ H ₃ PO ₄		1635	5.5
2 mol L ⁻¹ H ₃ PO ₄		1619	6.4
MIX-2	~600		
1 mol L ⁻¹ H ₃ PO ₄		616	2.7
2 mol L ⁻¹ H ₃ PO ₄		609	1.5

Az As(III) és a DMAs elválasztása során az a jelenség volt megfigyelhető, amely a csirke minták salétromsavas kezelésénél. A két módosulat elválasztása az extrahálószer koncentrációjának csökkentését igényelte. Mennyiségi meghatározásra alkalmas elválasztást csak kisebb, mint 0.2 mol L⁻¹ H₃PO₄-val tudtam elérni.

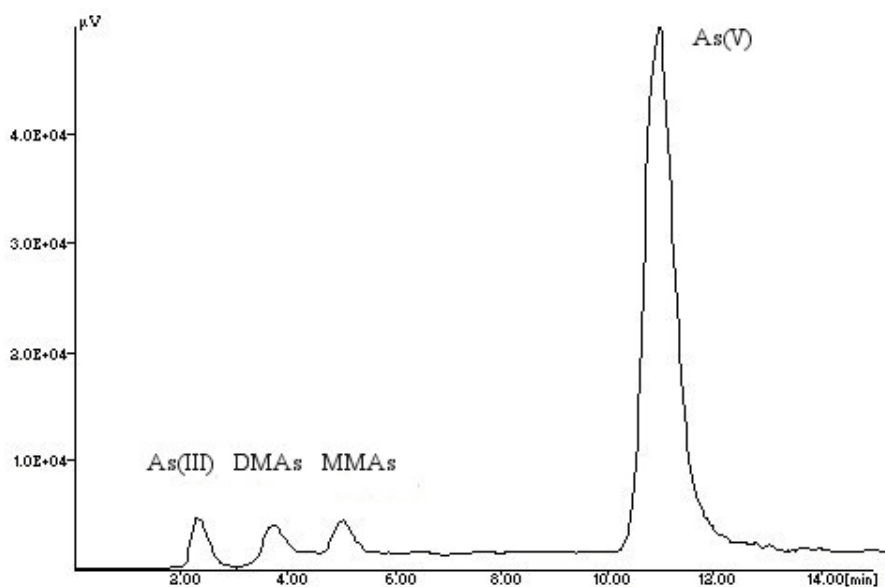
A 18. ábra azt szemlélteti, hogy az As(V) csúcsának minőségét is jelentősen befolyásolja a foszforsav koncentrációja és bizonyítja, hogy ha a speciesz koncentrációja megengedi, akkor extraktum hígítására van szükség. 0.1-0.2 mol L⁻¹ H₃PO₄ koncentráció már megfelelő elválasztást eredményezett.

A 19. ábra az IPL-1 jelű talajminta extraktumának tízszeres, tehát foszforsavra nézve 0.1 mol L⁻¹ koncentrációjú, hígításával nyert kromatogramot mutatja be. Látható, hogy az As(III) és a DMAs mennyiségi meghatározást lehetővé tevő módon szétváltak, és bár az As(V) koncentrációja egy nagyságrenddel nagyobb volt, mint a másik három módosulaté, a 0.1-0.2 mol L⁻¹ foszforsav jelenléte már nem okozott jelentő adszorpciót. Tehát megfelelő mértékű hígítással az As meghatározást befolyásoló mátrixhatások kiküszöbölhetővé váltak.

18. Ábra *A minta foszfáttartalmának hatása az As(V)-re jellemző csúcs minőségére. 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ koncentrációjú As(III) és As(V) kromatogramja (1) 0.5 mol L^{-1} H_3PO_4 -ból, (2) 1 mol L^{-1} H_3PO_4 -ból és (3) 2 mol L^{-1} H_3PO_4 -ból anioncserélő kromatográfiával*



19. Ábra *Az IPL-1 es talajminta kromatogramja a 10x-esen hígított extraktumból, anioncserélő kromatográfiával*



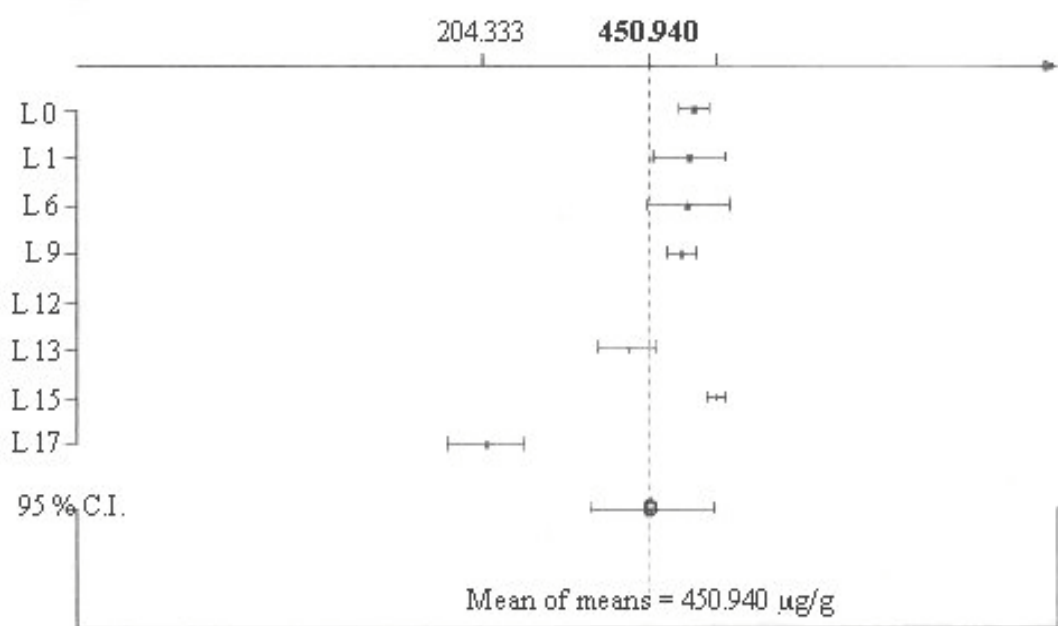
Meg kell azonban említeni, hogy a vizsgált talajok arzénnel mesterségesen erősen szennyezett minták voltak. A 16. táblázatban látható, hogy az egyik minta ΣAs tartalma ~ 600 , míg a másiké $\sim 1700 \text{ mg kg}^{-1}$. Míg ezek a koncentrációk lehetővé tették az extraktum tízszeres hígítását és így a

zavaró hatások kiküszöbölését, a talajokban természetesen előforduló As koncentrációjának meghatározásánál, mely az irodalmi adatok alapján átlagosan $30\text{--}50\text{ mg kg}^{-1}$, az eljárás nem megengedhető. Ilyen esetekben az extrakció és az alkalmazott elválasztás ismételt optimalizálását kell elvégezni.

Azt sem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy az As tartalom, mely szennyezés útján kerül a mintába, feltehetően könnyebben extrahálható, mint a geológiai eredetű As. Ennek megfelelően, a természetes As tartalom extrakciója többnyire erélyesebb extrakciós körülményeket kíván, mely az extrakciós paraméterek további módosítását igényelheti.

A vizsgált minták koncentrációtartományban bizonylatolt referenciaminta még össz arzén koncentráció meghatározására sem áll rendelkezésre a kereskedelembe, így a mérések minőségét CRM-val nem tudtam ellenőrizni. A mérés pontosságának becslésére a hitelesítési vizsgálatokban résztvevő laboratóriumok eredményeivel való összehasonlítás adott lehetőséget. A 20. ábrán a résztvevő laboratóriumok által mért As(V) koncentrációk láthatók, L 6 jelöli a saját mérési eredményt.

20. Ábra A hitelesítési gyakorlatban résztvevő laboratóriumok As(V) tartalomra vonatkozó eredményei a szennyezett talajmintából



A módosulatanalitika lépései nem kezelhetők egymástól független lépésekként. Az extrakciós módszer használata alapjaiban határozza meg az elválasztástechnika alkalmazhatóságát és optimális paramétereit. Ha az extrakciós paraméterek elválasztás érdekében tett módosítása a mennyiségi meghatározást befolyásolná, akkor az elválasztási paraméterek adott feladatra való módosítását kell alternatívaként számításba venni. Ezen kívül a vizsgálandó minta jellege és

speciesz koncentrációja is nagymértékben meghatározza az extrakció körülményeinek megválasztását.

6.5 Derivatizáció

Munkám során környezeti minták metilhigany, és szerves ón meghatározásához derivatizálást végeztem. Mindkét esetben alkilálást alkalmaztam, a metilhigany GC-MS meghatározásához tetrafenil-boráttal, a szerves ón módosulatokhoz Grignard-reagenssel. Mivel a derivatizációs technikákat már előző munkák során optimálták, így munkámnak nem volt része a származékképzést befolyásoló paraméterek és folyamat minőségbiztosítását meghatározó tényezők vizsgálata.

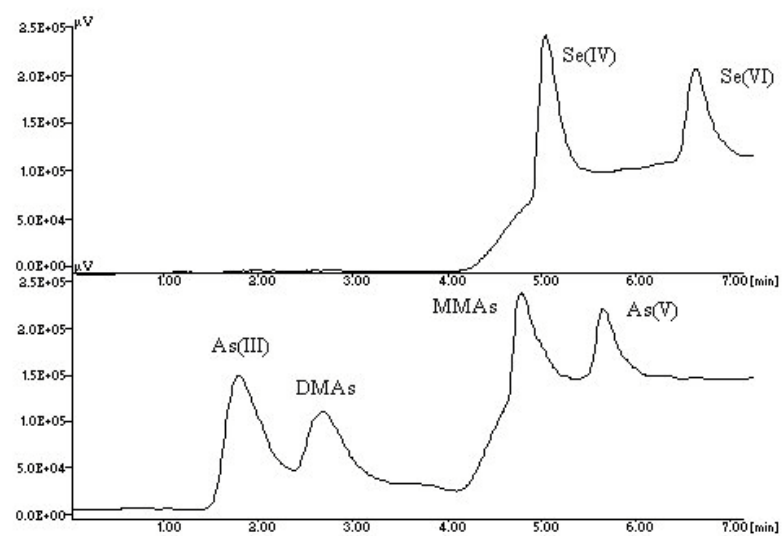
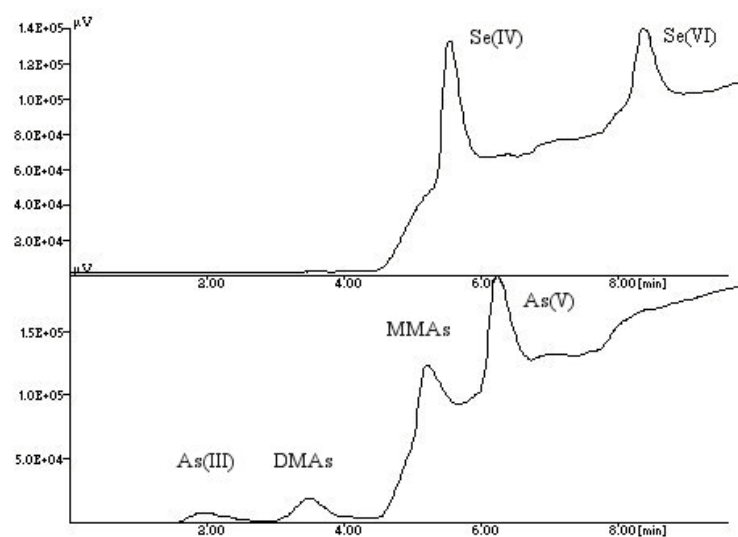
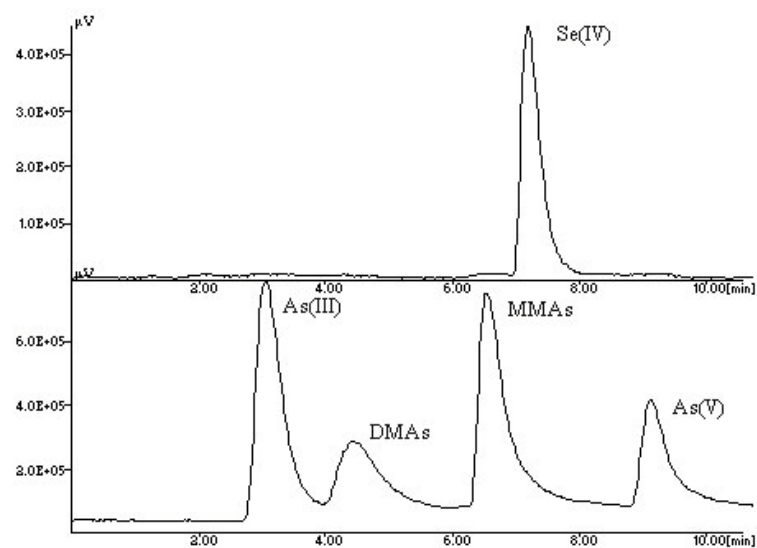
Jelentős része volt azonban munkámnak a szerves szelén módosulatok, (Se(IV) és Se(VI)), és szeleno-aminosavak (SeCys, SeMet, SeEt) mind direkt, mind preredukció utáni hidridfejlesztésének vizsgálata, melyet az 'Elválasztás utáni derivatizálás' rész tárgyal.

6.6 Elválasztás

Kutatásaim során az HPLC-AFS műszerkombinációt különböző mintabeviteli egységekkel csatoló As és Se speciációs módszerek fejlesztésénél, majd azok alkalmazásánál szembesültem a speciációs analitika kromatográfiával kapcsolatos gondjaival.

Az első példával azt mutatom be, hogy a speciációs elemzés eredményeképpen kapott kromatogramon jelentkező kiértékelési nehézségeknek nem minden esetben kromatográfiás eredetű okai vannak. Arzén és szelén módosultatok szimultán meghatározására úgy fejlesztettem ki módszereket, hogy különböző nagy hatékonyságú mintabeviteli egységekkel, ultrahangos és nagy hatékonyságú hidraulikus porlasztóval, valamint hidridfejlesztéssel kapcsoltam össze az elválasztástechnikát és a detektálást.

21. Ábra *Fentről lefelé: A HPLC-HG-(AFS)₂ , HPLC-HHPN-(AFS)₂ , HPLC-USN-(AFS)₂ rendszerekkel kapott szimultán As-Se kromatogramok*



A 21. ábra szemlélteti, hogy a bár mindhárom kombinációnál ugyanazt a kromatográfiás módszert alkalmaztam (standard koncentráció, mintaméret, oszlop, eluens, gradiens elúciós program), a kapott kromatogramok jelentősen különböznek.

A kromatogram-párokban a felső rész mutatja a Se módosulatokra, az alsó rész pedig a négy As módosulatra kapott jeleket. A három kromatogramot összehasonlítva elmondható, hogy a hidridfejlesztéssel kapott csúcsok intenzitása jelentősen nagyobb, mint a porlasztással kapott csúcsoké, mely a hidridfejlesztés közel 100 %-os mintabeviteli hatásfokával magyarázható szemben a nagy hatékonyságú porlasztók 40-50 %-os mintabeviteli hatásfokával.

A másik tényező, amely befolyásolja a kromatogram minőségét, az a gradiens program eluensváltásának jelensége. A gradiens elúciós program alkalmazásakor egyre erősebb eluensek alkalmazásával oldjuk meg az meghatározandó komponensek szelektív elválasztását. Az állófázishoz leggyengébben kötött komponensek könnyen eltávolíthatóak az oszlopról, míg az erősen kötött komponensek meghatározásához koncentráltabb mozgó fázisra van szükség. A hidridfejlesztéssel kapott kromatogramon az eluensváltás nem látható, mert ez a mintabeviteli technika 100 %-ban elválasztja a mérendő gázfázist a háttérrel okozó folyadékfázistól, míg a porlasztós technikánál a deszolvatáló egység alkalmazása ellenére sem tökéletes a két fázis elválasztása. Ez jelentősen megnehezíti a kromatogramok kiértékelését. Különösen az MMAs mennyiségi meghatározásánál okoz gondot, mert a töményebb eluens megjelenése eluálja a speciest és a 4. perc után kezdődő alapvonal emelkedés miatt nehéz meghatározni a csúcs kezdetét. A DMAs jelét, bár kisebb mértékben, szintén befolyásolja az alapvonal emelkedés.

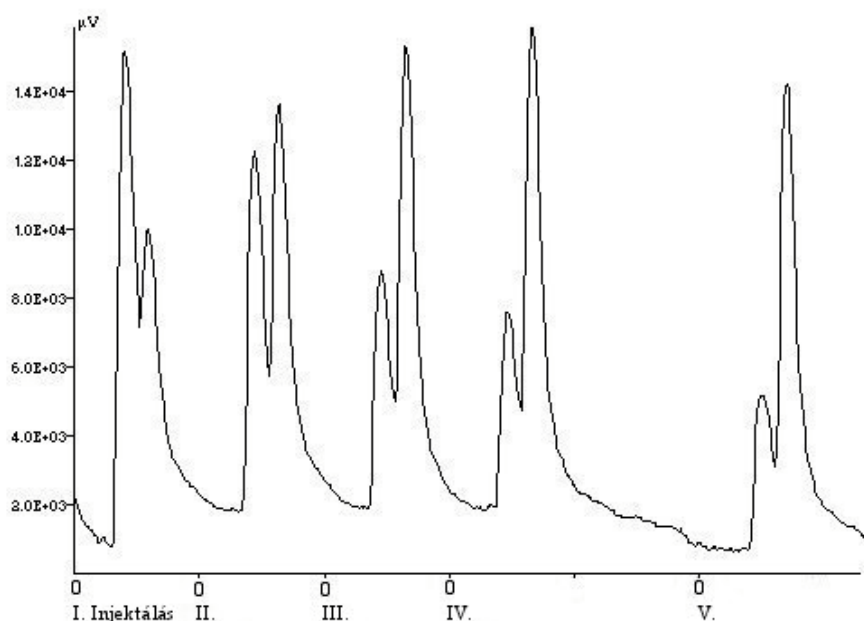
Az ábra alapján elmondható, hogy a porlasztók alkalmazása jelentősen rontott a kromatogramok minőségén. A jelenség okának azt találtam, hogy a két porlasztó deszolvatáló egység ellenére sem eredményez olyan tökéletes fázisválasztást, mint a hidridfejlesztés. A gáz nedvességtartalma pedig nemcsak a detektor kis és hideg lángját terheli jelentősen, hanem jelentős foszfát koncentrációja a kromatogram alapvonalának emelkedését is okozza, és így csökkenti a technika kimutatási képességét.

A speciációs analitikában, ahhoz, hogy egy elem különböző jellegű módosulatait jelentős csúcscsúszélesedés nélkül el lehessen választani, gradiens elúciós program alkalmazására van szükség. A második példával egy, a gradiens elúció alkalmazásánál megfigyelt jelenséget mutatok be, melynek fel nem ismerése könnyen meghamisíthatja eredményeinket.

A kromatográfiás programok és elsősorban a gradiens elúció alkalmazásakor a mérések ismételhetőségének biztosításához a gradiens program utolsó lépésében vissza kell állítani az elválasztás elején fennálló kromatográfiás kondíciókat. Ehhez egy úgynevezett 'clean-up', tehát mosási lépés beiktatására van szükség, melynek időszükségletét elsősorban az utolsó és az első

lépésben alkalmazott eluens koncentrációkülönbsége határozza meg. A nagyon hasonló karakterű As(III) és a DMAs elválasztásánál, különösen ionpárpépző kromatográfia, C-18-as oszlop és foszfát puffer használatánál az oszlopnak a két módosulatra nincs visszatartása. Nagyon kis foszfátkoncentráció is összemosza őket, így az As(III), DMAs, MMAs, As(V) speciációjára fejlesztett gradiens elúciós program 'A' eluenseként ioncserélt vizet alkalmaztam. Ahhoz, hogy az As(V) oszlopon való elkenődését elkerüljem, B eluensnek 0.2 mol L⁻¹ koncentrációjú foszfát puffer volt szükséges.

22. Ábra Az As(III) és a DMAs elválásának módosulása vízzel való mosás után 5 lépésben

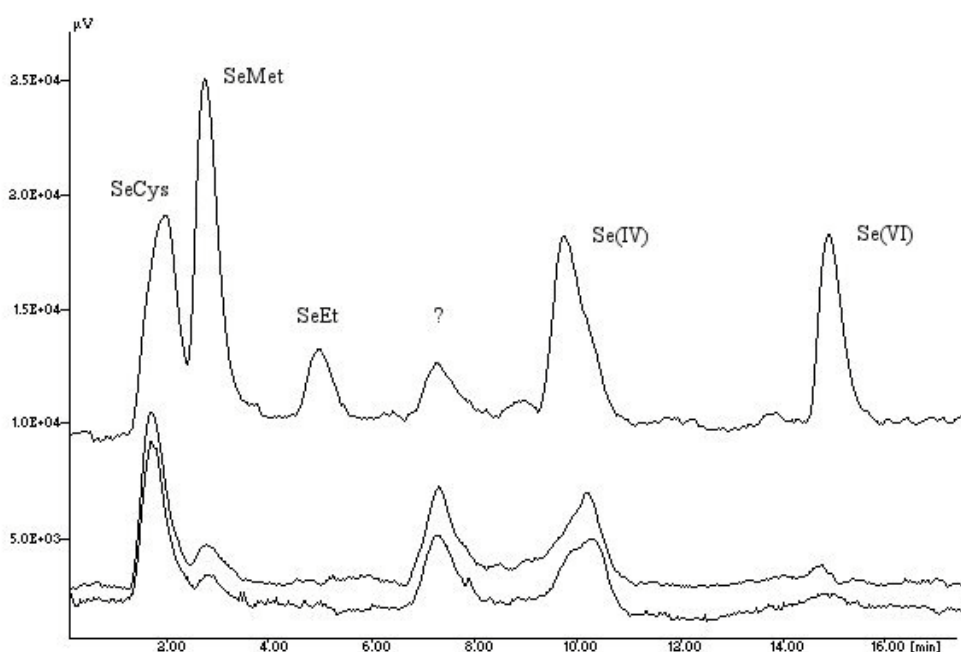


A mosási idő meghatározásához az eluensváltástól kezdve 5 alkalommal injektáltam As(III)-at és DMAs-at tartalmazó standard oldatot. A 22. ábrán a két alkotó elválásának módosulása látható a vízzel való mosás kezdetétől öt lépésben. Megfigyelhető, hogy a foszfát jelenléte nemcsak összemosza, de fel is cserélte a két csúcs jelét. Az első injektálásnál még a nagyobb koncentrációban jelen levő DMAs eluálódott először, a második injektálásnál még úgy összemosódtak, hogy koncentrációjuk azonosnak tűnt, majd a harmadiknál már közel visszakaptam a valós koncentrációkülönbséget, de az eredeti kromatogrammal azonosat csak az 5. injektálással értem el. Tehát ebben az esetben 25 perc mosásra volt szükség a következő injektálás előtt.

Ennek alapján elmondható, hogy a gradiens elúció alkalmazása különös figyelmet igényel. A ismételhetőség biztosításához a legjobb megoldás az, ha a mosási lépést a a gradiens program lépéseként kezeljük. A 'clean-up' idő nem pontos betartása a ismételhetőség romlásához, a mosási lépés elhagyása pedig könnyen szisztematikus és nehezen felismerhető hibát, s rossz eredményhez okozhat.

Az alábbi Se speciációs példával a két tapasztalatot mutatok be. A fenti példa demonstrálta, hogy bár a hidraulikus nagynyomású porlasztó deszolvatáló egységgel üzemel, a gradiens elúció eluensváltása mégis háttéremelkedés megjelenését okozhatja a HPLC-HHPN-AFS rendszerrel kapott kromatogramon. A 23. ábrán bemutatott kromatogramot nem foszfát, hanem ammónium-acetát eluenssel kaptam, ugyancsak egy négy lépéses gradiens elúciót alkalmazva (A: 0-4 perc - ionmentes víz, B: 4.1-12 perc - 0.01 mol L⁻¹ ammónium acetát, C: 12.1-24 perc - 0.1 mol L⁻¹ ammónium acetát, 24.1-35 perc – ‘clean-up’ ionmentes víz), alapvonalemelkedés mégsem jelentkezett. Ebből arra következtettem, hogy a háttérváltozást a foszfátpuffer alkalmazásakor AFS detektor hideg lángjában megjelenő jelentős foszfátkoncentráció okozta. Ennek alapján pedig elmondható, hogy a speciációs analitika lépései oly mértékben összefüggnek, hogy a kromatográfiás eluens választása akár a mintabeviteli egység alkalmasságát is befolyásolhatja.

23. Ábra A standard oldat és a gombaminta vizes extraktumának kromatogramja

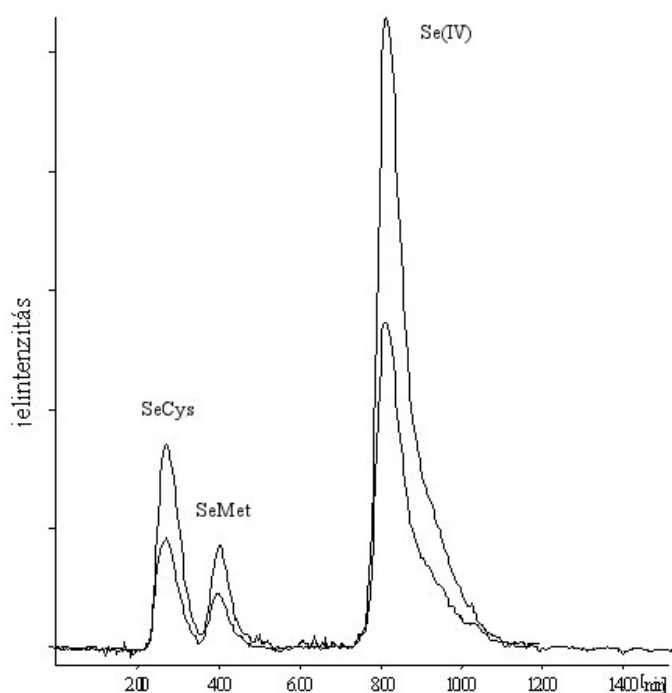


A 23. ábra, melyen az alsó két kromatogramot az Agaricus bisporus gombaminta vizes extraktumának két ismételt injektálásával kaptam, a felső pedig az öt Se módosulatot tartalmazó standard oldatot jellemzi, olyan esetet mutat be, amikor a mintamátrix nem eredményezi a módosulatok elúciós idejének módosulását. A mintában megjelenő csúcsok a standard oldat csúcsaival egybeesnek, retenciójuk megegyezik, tehát a csúcsok azonosítása standard oldat futtatásával megoldható. Látható, hogy a minta kromatogramján megjelenik egy harmadik, azonosíthatatlan csúcs. Mivel ugyanezzel a retencióval a frissen készített standard oldat kromatogramján is megfigyelhető egy csúcs, nem ismeretlen komponenst, hanem feltehetően egy

eluens okozta háttérjelet láthatunk. A minta kromatogramján a Se(VI) elúciós idejénél is észlelhető egy, minőségileg a retenciós idő alapján Se(VI)-nak azonosítható, de mennyiségileg nem kiértékelhető jel. Ennek az AFS detektorral való mennyiségi meghatározására előredukcióval kapcsolt hidridfejlesztés lett volna alkalmas, de mivel a HPLC-TO-UV-HG-AFS rendszer fejlesztésére csak később került sor, a csúcs mennyiségi kiértékelésére nem került sor.

A táplálékkiegészítőként alkalmazott szeléntartalmú élesztő elemzésének leírásával a standard addíció, mint minőségbiztosítási eszköz, alkalmazását mutatom be. Elvégeztem a minta vizes extraktumának a szelén speciációját az 'Anyag és módszer' fejezet 6. táblázatában feltüntetett paraméterek mellett. A kromatogram 3 speciesz, SeCys, Se Met és Se(IV), jelenlétét mutatta. A több specieszt együttesen tartalmazó standard oldat elemzésével a minta specieszeinek koncentrációját megbecsültem, majd az extraktumot a standard oldattal addicionáltam és elemeztem.

24. Ábra A táplálékkiegészítő vizes extraktumának kromatogramja standard addíció előtt és után



A 24. ábra a minta vizes extraktumának kromatogramját mutatja standard addíció előtt és után. Az ábra bizonyítja, hogy az addicionálással megbizonyosodhattam a jelenlevő szelén specieszek azonosságáról, mert a retenciós idők megegyeznek.

17. Táblázat *Az addicionált komponensek visszanyerési hatásfoka a táplálékkiegészítő vizes extraktumából*

Szelén speciesz	Mért konc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hozzáadott konc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Visszanyerés hatásfoka (%)
SeCys	122 ± 12	125	91.7 ± 3.1
SeMet	106 ± 7	100	90.2 ± 4.6
Se(IV)	248 ± 11	250	104.9 ± 5.3

A két kromatogram kiértékelésével kiszámoltam a visszanyerés hatásfokát, melynek eredményét a 17. táblázat tartalmazza. A hozzáadott mennyiségeket jó hatásfokkal visszakaptam, amelynek alapján az adatok bizonyítják, hogy a mintamátrix jelenléte nem változtatja a mért Se módosulatok HPLC-HG-AFS rendszerrel kapott jelét. Így a specieszek mennyiségi kiértékelésére a kalibráció egyszerű formája is megfelelt, nem volt szükség a több lépéses standard addícióra, amely jelentősen több munkával járt volna.

Végül egy olyan kísérletet mutatok be, melyben két különböző elven működő kromatográfiás módszert alkalmaztam a mérési eredmények minőségbiztosítására a HPLC-TO-UV-HG-AFS rendszerben. A két különböző elven működő kromatográfia használatakor az egyik elválasztástechnikával esetleg koeluálódó komponensek egy más elven működővel elválaszthatók. Így a csúcsok tisztasága ellenőrizhető és bizonylatolt anyagminták és szerkezetazonosításra alkalmas detektorok hiányában a komponensek nagyobb bizonyossággal azonosíthatók.

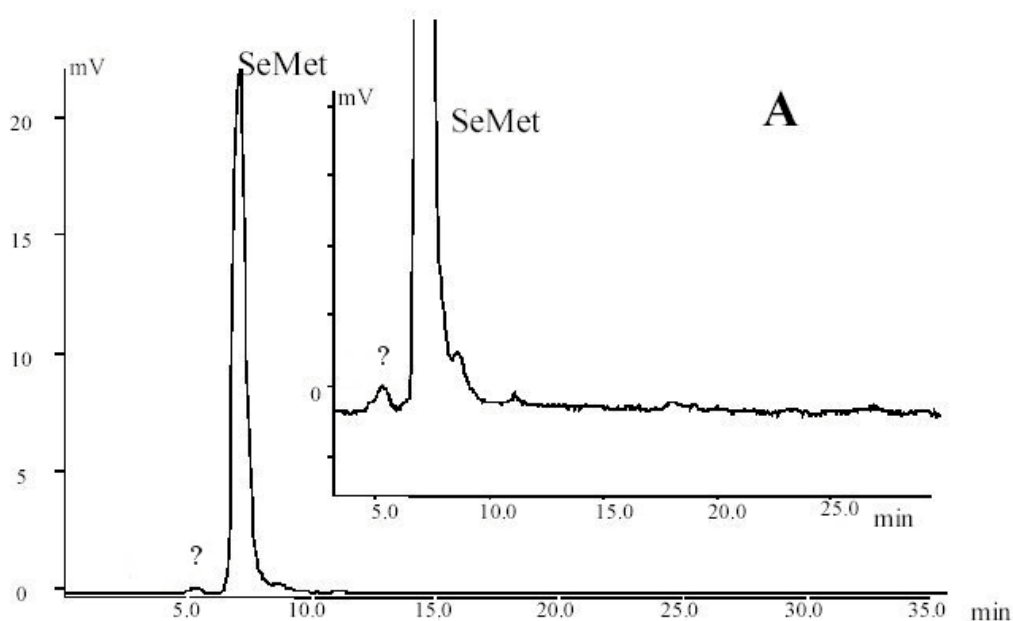
Az előző részekben már említett brazil dió minta elemzésére anioncserélő és ionpárhépző kromatográfiát használtam az 'Anyag és módszer' 8. táblázatában felsorolt paraméterekkel.

Az anioncserével kapott kromatogramot a 25., míg az ionpárhépzéssel kapott kromatogramot a 26. ábra szemlélteti. Az ionpárhépző elválasztástechnikával kapott eredmények megerősítették az anioncserével kapott eredményeket nemcsak minőségileg, de mennyiségileg is. Mindkét kromatográfia esetén a retenciós idő alapján azonosított SeMet a brazil dió legnagyobb mennyiségű Se-komponense - az össz szelén tartalom ~98%-át teszi ki. A kalibráció alapján számolt SeMet koncentráció pedig szórásjellegű különbséggel azonos eredményt adott. Három párhuzamos injektálás alapján anioncserével 79.9 mg kg^{-1} -ot, ionpárhépzéssel 80.4 mg kg^{-1} kaptam.

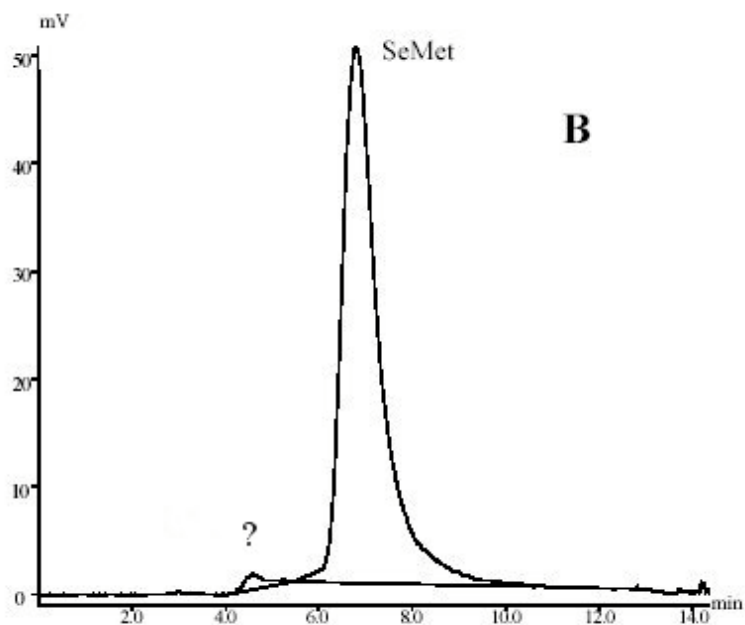
Mindkét kromatogramon látható egy, a SeMet előtt megjelenő csúcs. A specieszek szerkezetazonosítására alkalmas technika hiányában, a rendelkezésre álló rendszerrel és

standardekkel a csúcsot azonosítani nem tudtam, de az irodalmi adatok alapján feltételezhető volt, hogy SeCys₂ megjelenéséről van szó. Időközben azonban, egy EU projekt kiértékelő megbeszélésén olyan Se speciációs tapasztalatról számoltak be, mely szerint ebben a retenciós időben a SeMet oxidja jelenik meg a szerkezetazonosítással kapott eredmények alapján.

25. Ábra A brazil dió enzimes extraktumának anioncserélő kromatográfiával kapott kromatogramja



26. Ábra A brazil dió enzimes extraktumának ionpárképző kromatográfiával kapott kromatogramja



A példa alapján elmondható, hogy a két kromatográfiás technika alkalmazása megfelelő arra, hogy standarddel azonosítható módosulat jelenlétét, csúcstisztaságát és számolt koncentrációnak valóságát alátámassza. Standardek hiányában az ismeretlen csúcsok azonosításában azonban nem ad előrelépést, ennek megoldásához szerkezetazonosításra van szükség. Alternatívát jelenthetne a mátrix-azonos CRM használata is, de a speciációs analitika területén, főleg a Se esetén még nem állnak rendelkezésre megfelelő bizonylatolt anyagminták.

A speciációban alkalmazott elválasztási technikák területén gyűjtött tapasztalatok alapján összefoglalóan a következők állapíthatók meg. Olyan összetett, sok paraméter összehangolását igénylő kapcsolt speciációs rendszerek alkalmazása esetén, mint a HPLC-HG-AFS és a HPLC-TO-UV-HG-AFS a kromatogramokon jelentkező problémáknak nem feltétlenül kromatográfiás okai vannak, az elválasztás előtti lépések is nagy mértékben befolyásolhatják a kromatogram minőségét. A speciációban leggyakrabban jelentkező kromatográfiás kérdés – a speciesazonosítás és –tisztaság – szerkezetazonosításra alkalmas detektálással és CRM használatával válaszolható meg legegyszerűbben, ezek hiányában számos minta esetén az ‘adalékolás’ és a két különböző elven működő kromatográfia alkalmazása is megbízható minőségbiztosítási alternatívát nyújt.

6.6 Elválasztás utáni derivatizálás

A HPLC-AFS rendszerrel a minták szelén speciációs elemzését két különböző mintabevitel, a hidraulikus nagynyomású porlasztó és a hidridfejlesztés alkalmazásával végeztem.

Igazoltam, hogy ellentétben számos publikáció állításával a szerves szelén módosulatokból közvetlenül, előredukció nélkül is fejleszthető hidrid, és bár a hidridfejlesztés hatásfoka nem 100 %-os és módosulatonként változik, a nagy hatékonyságú porlasztóhoz képest is jelentősen javítja a speciációs rendszer kimutatási képességét. A 18. táblázat, mely a HPLC-HHPN-AFS és a HPLC-HG-AFS rendszer kimutatási határait és megbízhatóságát mutatja be a Se(IV)-re és a három szelén-aminosavra, jól szemlélteti a két rendszer érzékenységbeli különbségét.

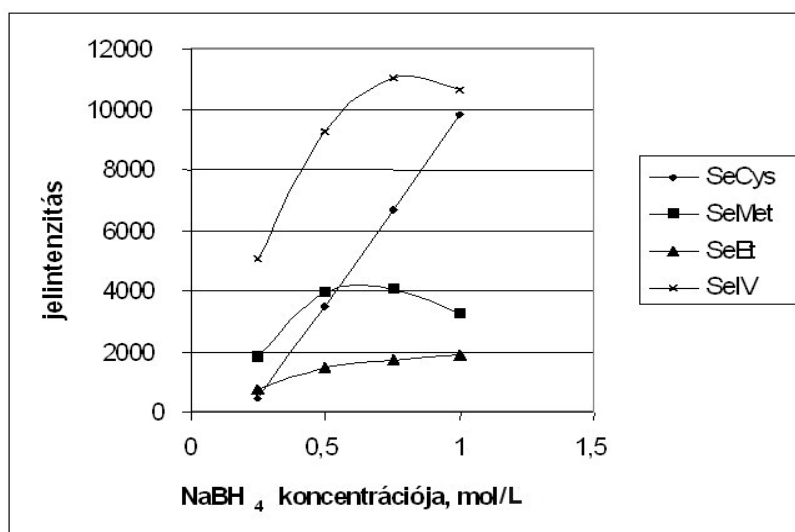
Az szelén módosulatok meghatározására elválasztás utáni derivatizációt, tehát hidridfejlesztést alkalmazó módszerek fejlesztésével két részben foglalkozom.

18. Táblázat A HPLC-HHPN-AFS és a HPLC-HG-AFS rendszerrel kapott kimutatási határok Se(IV), SeCys, SeMet és SeEt módosulatokra

Se módosulat	Kimutatási határ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	HPLC-HHPN-AFS	HPLC-HG-AFS
SeCys	300 ± 25	18 ± 0.5
SeMet	320 ± 38	70 ± 2.5
SeEt	270 ± 20	96 ± 3.5
Se(IV)	960 ± 65	16 ± 0.5

A munka első része azon az új megállapításon alapul, hogy a szerves szelén módosulatok közvetlenül is hidridképzőek, tehát derivatizálhatók. Mivel a szeleno- aminosavak közvetlen hidridfejlesztésével az irodalomban nem találkoztam, elsősorban a hidridfejlesztés kémiai paramétereit optimaltam, mely a hidridfejlesztéshez szükséges pH értéket biztosító HCl és a derivatizálószer, a NaBH_4 , koncentrációjának és áramlási sebességének meghatározását foglalta magába. Az optimalás során a reagensek áramlási sebességét állandó, 2.5 ml min^{-1} értéken tartottam, a reagens koncentrációkat szisztematikusan változtattam. A NaBH_4 koncentrációt a $0.25\text{-}1.0 \text{ mol L}^{-1}$ tartományban változtattam négy pontban és a négy módosulatra kapott eredmények alapján a 0.75 mol L^{-1} bizonyult optimálisnak (27. ábra)

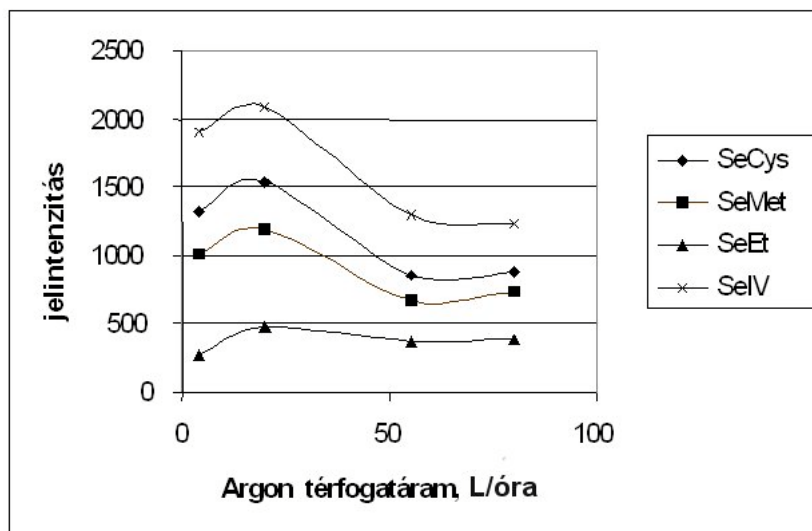
27. Ábra A NaBH_4 mennyiségének hatása a szelén specieszek fluoreszcens jelének nagyságára. A szelén specieszek koncentrációja 1 mg L^{-1} .



A HCl koncentrációját a 1-3 mol L⁻¹ tartományban hat különböző koncentrációban változtattam 0.5 mol L⁻¹-s részletekkel és a 2 mol L⁻¹ bizonyult optimálisnak. Az 1 mol L⁻¹ koncentrációnál a hidridképzés hatásfoka a 2 mol L⁻¹-el kapott jel 60 %-ával csökkent, 3 mol L⁻¹ koncentrációnál pedig 30-35 %-ával.

A 27. ábrán látható, hogy a vizsgált specieszek többsége hasonlóan reagált a derivatizálószer koncentrációváltozására. Az optimalizációs tartomány mindkét reagens esetén szűk volt, a négy speciesz eredőjele maximumon átmenő görbe szerint változott, így a kompromisszumos optimum meghatározása egyértelmű volt. Ahhoz, hogy a fejlesztett hidrid a legnagyobb hatékonysággal jusson el a detektorba, a rendszerben szállítógáz funkcióját betöltő argon optimális áramlási sebességét is meg kellett határozni. A optimalizációs tartománya 4-80 L h⁻¹ volt és ahogy a 28. ábrán is látszik a 20 L h⁻¹ bizonyult mind a négy módosulatot tekintve a legmegfelelőbbnek. A rendszerben az argon kettős szerepet tölt be, a hidrid szállításán kívül a detektor lángjának geometriáját és megfigyelési magasságát is befolyásolja. Mivel a két szerep egyenkénti hatását nem tudom vizsgálni, mert az égőfej magassága a detektorban nem változtatható, csak feltételezni tudom, hogy az optimálisnál kisebb áramlási sebességnél a hidridszállítás hatékonysága csökken, míg nagyobbánál a láng hígul és a hidridek lokális koncentrációja csökken ill. a megfigyelési magasság kedvezőtlenül változik.

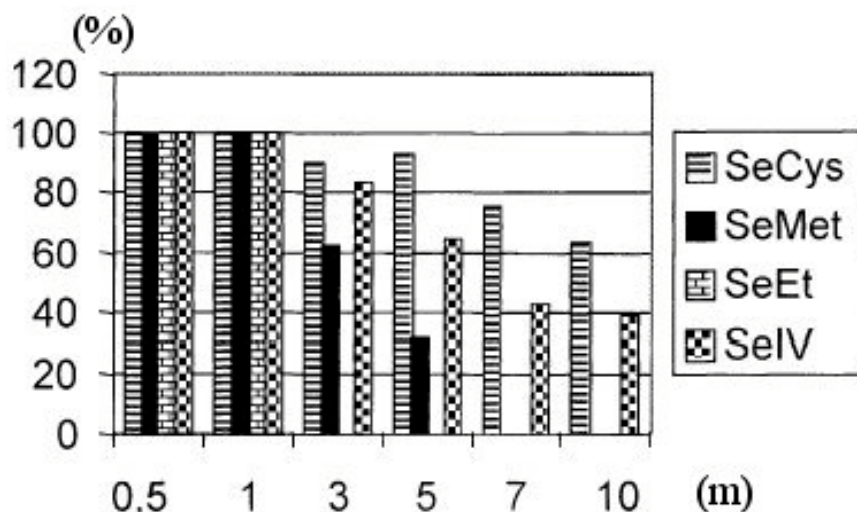
28. Ábra Az argon térfogatáramának hatása a fluorescens jel nagyságára



Ezután a 2. mellékletben található 2. közleményben leírt módon meghatároztam a szerves szelén módosulatok hidridfejlesztési hatásfokát és azt kaptam, hogy a Se(VI) 92, a SeCys 25, a SeMet 18, a SeEt pedig 6 %-ban képez közvetlenül hidridet. A folyadék-gáz szeparátor és a detektor között jelentős utat kell megtenni a képzett hidridnek egy szárító membránon keresztül, hogy

hidridképzés hevessége eredményeképpen le nem választott folyadékcseppecskék ne jussanak a detektor lángjába.

29. Ábra A csőhossz hatása a közvetlen hidridfejlesztéssel képzett szelénhidridek fluorescens jelének változására a HPLC-HG-AFS rendszerben



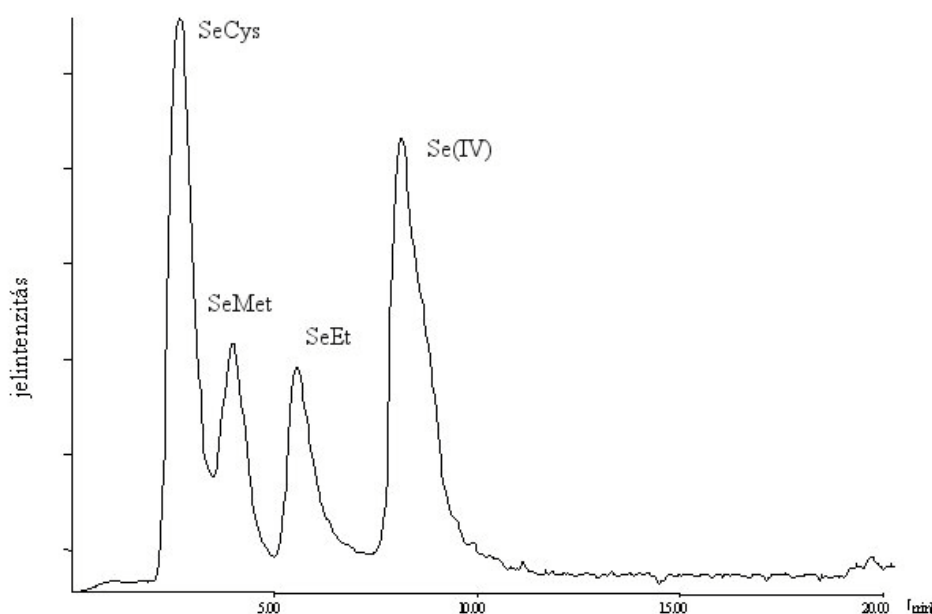
Mivel a szelénhidrid instabil vegyület, megvizsgáltam, hogy mekkora lehet a hidrid által maximálisan megtett út úgy, hogy a jelintenzitás ne csökkenjen. A rendszerben 4 mm belső átmérőjű szilikon csövet használtam a GLS és a detektor között, s mértem a négy specieszre kapott jelintenzitást 0.5, 1, 3, 5, 7 és 10 méteres cső felhasználásával. A kapott eredményeket a 29. ábra foglalja össze. A 0.5 és az 1 m-es cső felhasználásával ugyanazt az intenzitást kaptam, de 3 métertől már a specieszek különböző mértékű intenzitáscsökkenését észleltem. A SeEt 3 méternél, a SeMet pedig 7 métertől már nem érzékelhető, míg a SeCys és a Se(IV) még 10 méternél is az eredeti koncentráció közel 50%-át mutatja. Mivel a különböző szelén specieszekből képződő hidridek szerkezete azonos, SeH_2 [151] és a fluorescens jel csökkenése azoknál az specieszeknél (SeEt és SeMet) mutatkozott gyorsabbnak, melyek kisebb mértékben képeztek közvetlenül hidridet, a különbség feltehetően a képzett hidrid koncentrációjával függ össze. A jelenség oka pedig feltehetően a hidrid adszorpciója a szilikoncső falán ill. a szabadba diffundálása.

A csőhosszúság növelésével a kromatogramokon a csúcsszélesedés és retenciós idő változás is megfigyelhető volt, így a lehető legrövidebb, 0.5 méteres csőhosszúság alkalmazása mellett döntöttem.

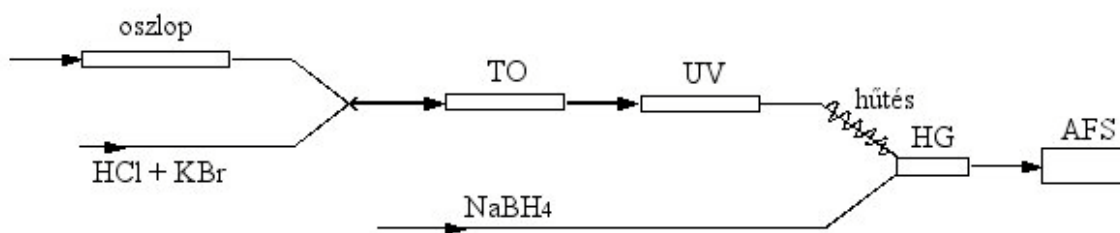
A optimált közvetlen hidridképzési paraméterekkel a 16. táblázatban bemutatott kimutatási határokat értem el, mely a HHPN alkalmazásával kapott kimutatási határokhoz képest lényeges javulás jelentett és a rendszert kisebb szelén tartalmú minták speciációjára is alkalmassá tette. A

30. ábra a HPLC-HG-AFS rendszerrel kapott kromatogramot mutatja a négy Se módosulat különböző koncentrációjára kapott fluoreszcens jelével. Így a jelintenzitások közötti különbség a közvetlen hidridképző képesség különbségeit nem reprezentálja.

30. Ábra A HPLC-HG-AFS rendszerrel kapott kromatogram a négy vizsgált Se speciesre izokratikus elúcióval

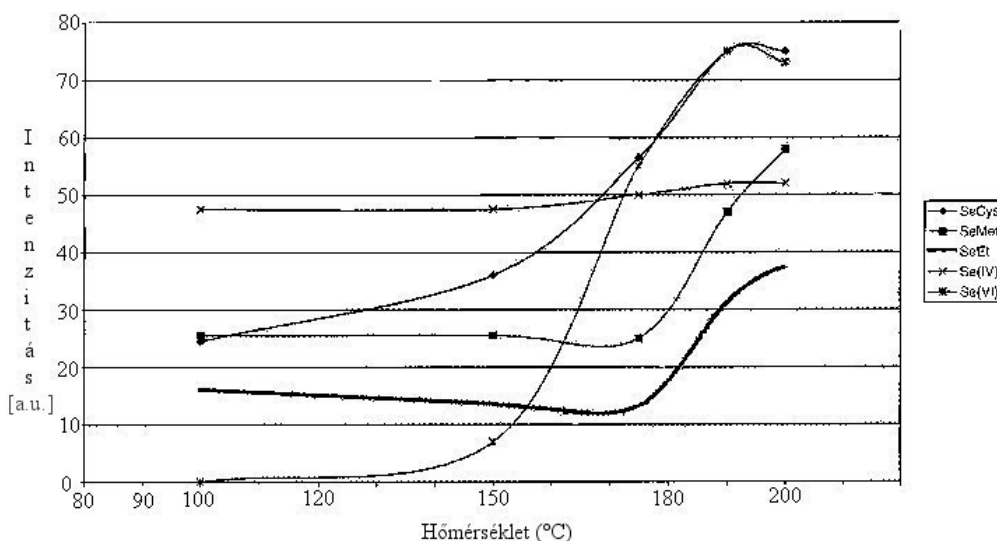


31. Ábra A HPLC-TO-UV-HG-AFS rendszer optimális felépítése



A munka második részében az volt a célom, hogy egy előredukciós lépés beiktatásával a szerves szelén módosulatokat 100 %-ban hidriddé alakítsam és az analitikai rendszert Se(VI) meghatározására is alkalmassá tegyem. Ennek biztosítására több lépés beiktatása után a rendszer teljes újraoptimalására volt szükség, mely a következő részekből állt. Meghatároztam a rendszer optimális felépítését; mely végül az 31. ábrán bemutatott összeállításban nyújtotta a legjobb teljesítményt. Abban az esetben, ha az UV megelőzte a melegítőegységet, a szelenoaminosavak fluoreszcens jelének intenzitása egyharmadára csökkent, míg a Se(VI)-ra ez nem volt hatással.

32. Ábra A melegítőegység hőmérsékletének hatása a specieszek fluorescens intenzitására



Irodalmi adatokból kiindulva több savat (H_2SO_4 , HBr , HCl), savkeveréket különböző koncentrációkban kipróbálva, 50 % v/v HCl - 5 % m/v KBr –ben állapítottam meg az optimális redukálószer összetételét és 3 ml min^{-1} –ben az áramlási sebességét. Ezt annak a vizsgálata követte, hogy az UV-lámpa elé beiktatott melegítőegység hőmérséklete milyen hatással van a specieszek fluoreszcens jelére (32. ábra). Az optimálási tartomány felső határát a melegítőegység teljesítmény maximuma határozta meg $200 \text{ }^\circ\text{C}$ -ban, és kompromisszumos optimumnak a $190 \text{ }^\circ\text{C}$ –ot találtam. Végül, mivel a Se(VI) jelenléte miatt a HPLC-HG-AFS rendszerben alkalmazott izokratikus elúció nem volt többé megfelelő, gradiens elúciós program fejlesztésére volt szükség, melynek eredményét az 'Anyag és módszer' fejezet 9. táblázata tartalmazza.

19. Táblázat A HPLC-HG-AFS és a HPLC-TO-UV-HG-AFS rendszer kimutatási határai

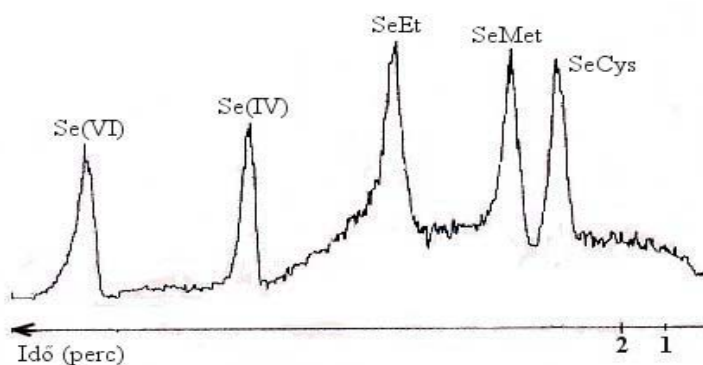
Se módosulat	Kimutatási határ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	HPLC-HG-AFS	HPLC-TO-UV-HG-AFS
SeCys	18	0.3
SeMet	70	0.4
SeEt	96	0.7
Se(IV)	16	0.4
Se(VI)	-	0.3

Mindezen paraméterek beállítása után még az a probléma jelentkezett a rendszer folyamatos, több órás használatakor, hogy a hidridfejlesztési reakció hevességének eredményeképpen a rendszerbe épített speciális gázsűrítő egység emelt ellenáramú argonnal sem tudta a detektor felé áramló

gázt vízmentesíteni, mely a mért jel/háttér viszony jelentős csökkenését eredményezte. Ennek kiküszöbölésére az UV roncsoló után és a NaBH_4 rendszerbe vezetése előtt egy 0°C -os hűtőegységet alkalmaztam, mely a tapasztalat szerint nagy mértékben csökkentette a rendszer zaját.

A rendszer kimutatási határait az öt szelén specieszre a 19. táblázat tartalmazza a HPLC-közvetlen HG-AFS rendszer kimutatási határaival összehasonlítva. Az öt vizsgált Se speciesz HPLC-TO-UV-HG-AFS rendszerrel kapott kromatogramja pedig a 33. ábrán látható.

33. Ábra A HPLC-TO-UV-HG-AFS rendszerrel kapott kromatogram az öt vizsgált Se speciesz $10\ \mu\text{g L}^{-1}$ -jénál ($\text{SeEt} - 15\ \mu\text{g L}^{-1}$), gradiens elúcióval



A szelén hidridképzése kémiaiilag egyszerűbb reakció, mint a tetra-alkilborátokkal és a Grignard-reagensekkel való alkilálás, mely az ón ill. higany módosulatokat gázkromatográfiás elválasztásra alkalmassá teszi. A szelén módosulatok derivatizálását a HPLC-AFS folyamatos rendszerben az nehezíti, hogy zárt rendszerben kell mind a közvetlen, mind a preredukciót alkalmazó hidridképzést megoldani úgy, hogy se az elválasztás, se a detektálás minőségét ne befolyásolja kedvezőtlenül. Az optimálási tartomány minden paraméter esetén szűk, melyet a meghatározandó specieszek számán kívül a rendszer zárt jellege határoz meg. A HPLC-HG-AFS rendszernek nagy előnye, hogy a szerves szelén módosulatok azon tulajdonságát használja ki, hogy közvetlen hidridképzésre is alkalmasak. Így elkerüli a előredukcióval járó vegyszerek használatát, a velük járó extra szennyezés veszélyét, az elemzés idejének növekedését és azt, hogy az előredukcióval a rendszer bonyolultabbá válik és még több paraméter kézbentartását követeli meg. Ezzel szemben a HPLC-TO-UV-HG-AFS rendszer, melynek optimálása hosszadalmas és működtetése a sok kézben tartandó paraméter miatt különleges hozzáértést és figyelmet igényel, nagyságrendekkel megnöveli a rendszer kimutatási képességét mind a szelén-aminosavakra, mind a Se(IV) -re és a Se(VI) meghatározására is alkalmassá teszi.

Tehát összefoglalóan megállapítható, hogy a szelén módosulatok elválasztás utáni derivatizálása, bár folyamatos speciációs rendszerben sok paraméter kompromisszumos optimalizálását megkövetelő feladat, már közvetlenül is jelentősen növeli a módszer érzékenységét és előredukció beiktatásával a meghatározható specieszek száma is növekszik.

6.7 Detektálás

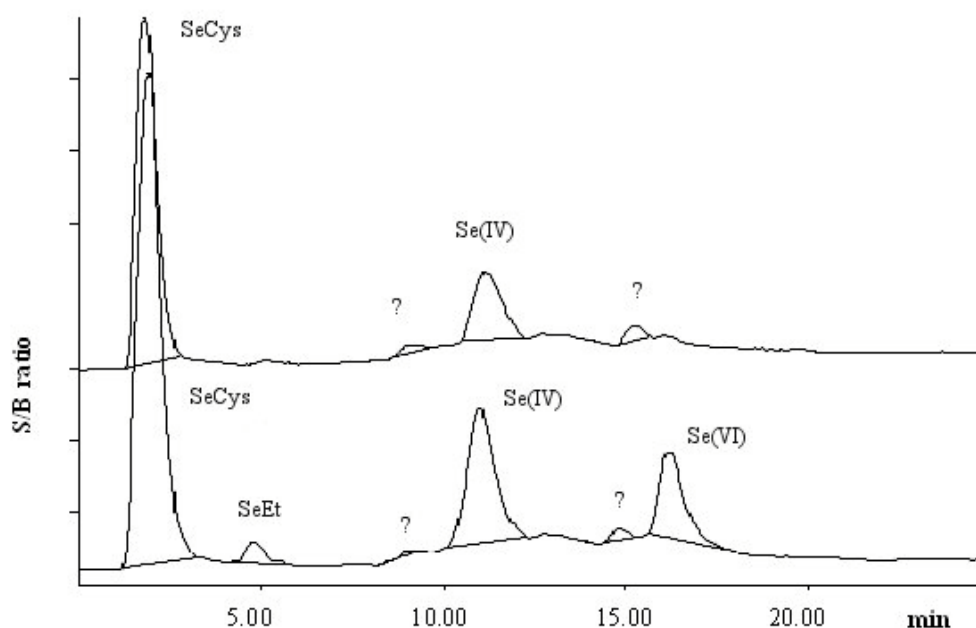
Speciációs feladataimban atomfluoreszcens és tömegspektrometriás detektálást alkalmaztam, az AFS detektort folyadékkromatográfiával, az MS detektort gázkromatográfiával kapcsolva. Míg a vájtkatód lámpával üzemelő AFS nagyon érzékeny, hidridfejlesztéssel különösen jó kimutatási határokat biztosító, de más mintabeviteli egységekkel is alkalmazható detektálási módszer, egyidejűleg csak egy elem specieszeinek meghatározására alkalmas, a GC-MS rendszerrel elméletileg több elem specieszeinek meghatározása is lehetséges, de legnagyobb előnye, hogy szerkezetazonosítással ismeretlen módosulatok azonosítását is lehetővé teszi.

Az első példával azt szemléltetem, hogy kromatográfiával kapcsolt speciációs rendszerekben az elem-specifikus detektálás alkalmazása nem feltétlenül jelenti azt, hogy minden megjelenő csúcs a vizsgált elem egy specieszének felel meg.

A HPLC-HHPN-AFS rendszert alkalmazva több esetben szembesültem olyan csúcsok megjelenésével a kromatogramokon, melyeket nem tudtam azonosítani. Abban az esetben, ha nem áll rendelkezésre szerkezetazonosításra alkalmas, illetve legalább egy különböző elven működő detektor, mely bizonyíthatná, hogy valójában a vizsgált elem egy specieszének megjelenéséről van szó, vagy egy alternatív kromatográfiás technika, mely egy alkotó jelenlétét alátámaszthatná, akkor könnyen juthatunk téves következtetésekhez.

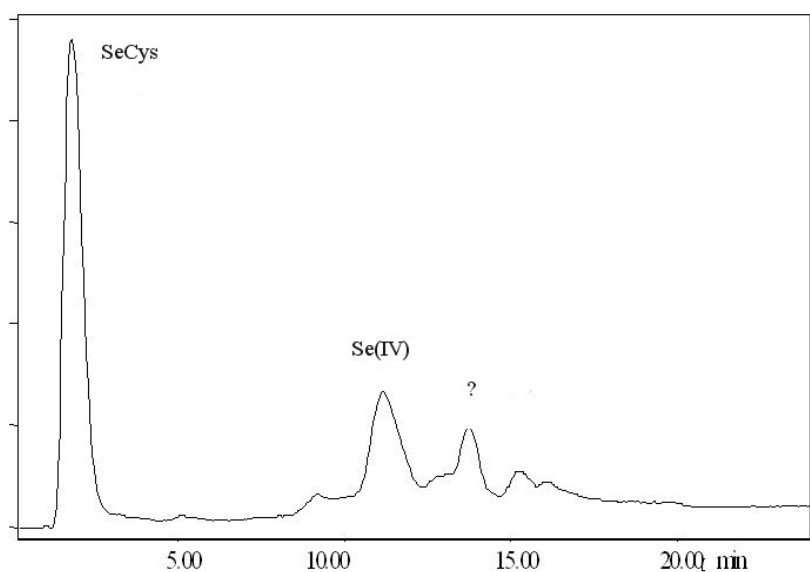
A 34. ábrán szelénrel dúsított gomba minta HPLC-HHPN-AFS rendszerrel spikolás előtti (felső) és spikolás után (alsó) kapott kromatogramja látható. A felső kromatogramon két azonosítatlan csúcs látható, melyből a második szerkezetazonosítás nélkül és spikolás előtt Se(VI)-nak feltételezhető, melynek mátrixhatás miatt megváltozott a retenciós ideje. A csúcs a SeCys-SeEt-Se(IV)-Se(VI) multispeciesz standarddel 'adalékolt' minta kromatogramján is jelen van és intenzitása a hígítással járó térfogatváltozás arányában csökkent. Az irodalom ezzel a kromatográfiás technikával, a kísérletek idejében nem adott olyan komponens megjelenéséről bizonyosságot, melynek azonosítására standarddel rendelkezünk volna.

34. Ábra Szelénnel dúsított gomba minta kromatogramja spikolás előtt és után

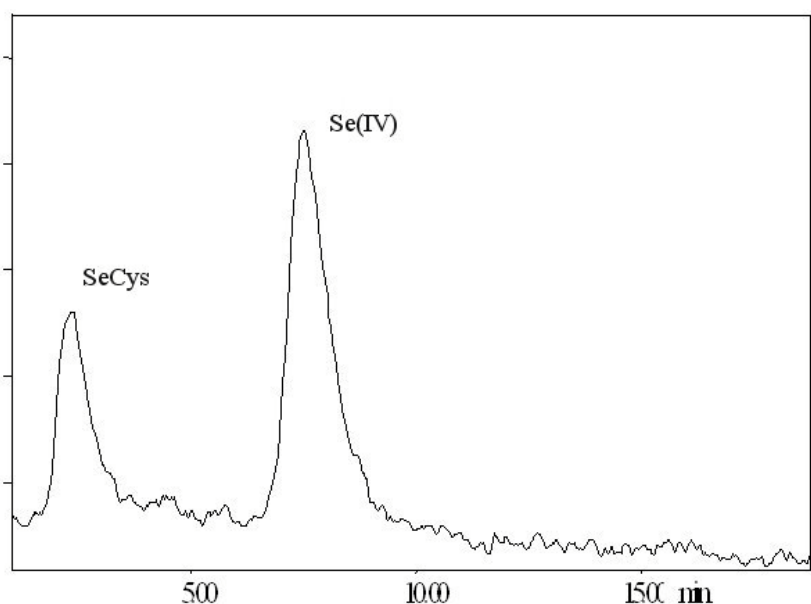


Így annak ellenére, hogy az AFS elemszelektív detektálás, azt feltételezem, hogy a mátrixból a nem tökéletes deszolvatálás eredményeképpen lágba jutott molekulák adnak fluorescens jelet a HPLC-HHPN-AFS műszerkombinációban. A feltételezést úgy ellenőriztem, hogy a Se-nel dúsított gomba ugyanazt az extraktumát a porlasztóval üzemelő rendszer mellett a teljes fázisválasztást biztosító mintabeviteli technika, a hidridfejlesztés alkalmazásával is megmértem. A 35. és 36. ábrán a szelénnel dúsított gombaminta vizes extraktumára, a HPLC-HHPN-AFS és a HPLC-HG-AFS technikákkal kapott kromatogramok láthatók.

35. Ábra A gomba minta vizes extraktumára, a HPLC-HHPN-AFS rendszerrel kapott kromatogram



36. Ábra *A gomba minta vizes extraktumára, a HPLC-HG-AFS rendszerrel kapott kromatogram*

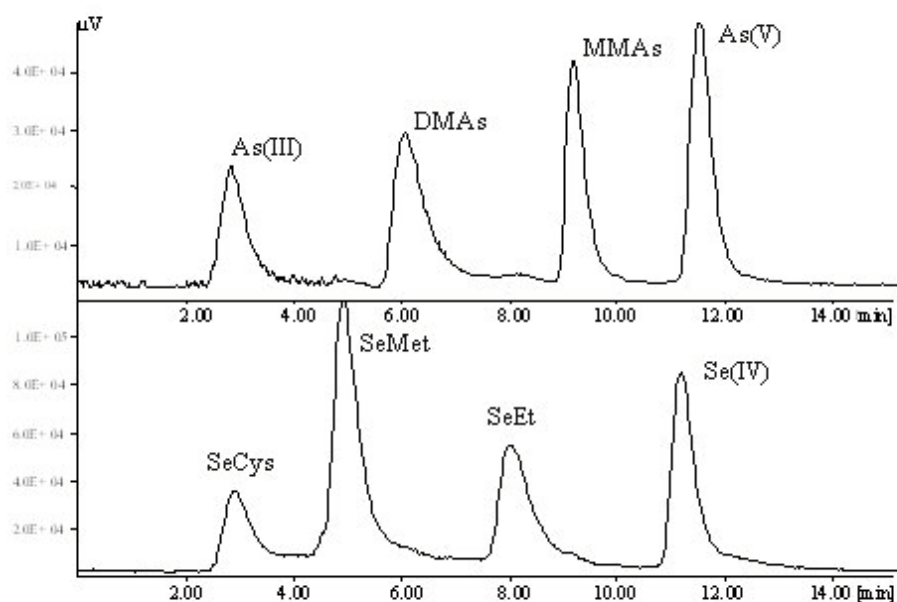


A 35. ábra kromatogramján ugyanaz a 9.5 percnél megjelenő kis jel és a 15 percnél megjelenő csúcs látható, mely a 34. ábra mindkét kromatogramján jelen van. Ezenkívül a 13. percnél is megjelent egy, a rendelkezésre álló standardekkel szelén speciesznek nem azonosítható csúcs. A 36. ábrán a hidridfejlesztéssel kapott kromatogram látható, ahol ezek az azonosíthatatlan csúcsok már nem észlelhetők. Ez alátámasztja a feltételezést, hogy a csúcsokat nem egy ismeretlen species megjelenése okozta, hanem a porlasztással járó háttérjel és bizonyítja a hidridfejlesztés, tehát a teljes fázisválasztás előnyeit a porlasztással szemben az AFS-el kapcsolt rendszerekben.

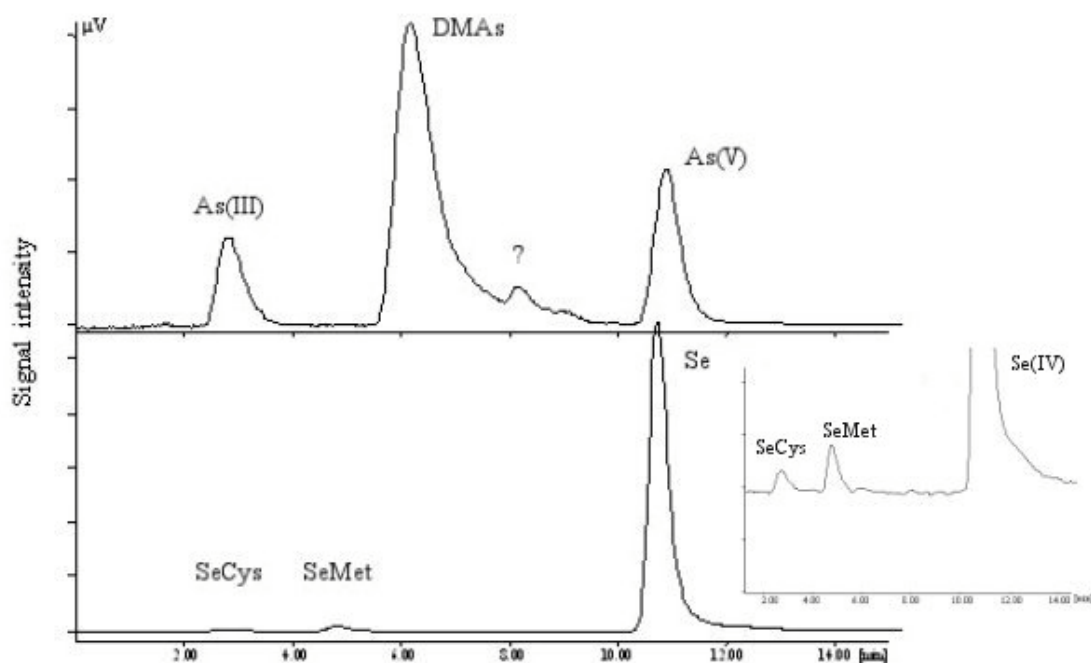
A második példával az egyelemes AFS detektor többelemes rendszerben való alkalmazhatóságát mutatni be. A feladatot úgy oldottam meg, hogy két AFS detektort kötöttem párhuzamosan egy T-elágazás segítségével a mintabeviteli egység után és így az As és Se specieszek szimultán meghatározására alkalmas HPLC-HG-(AFS)₂ rendszert kaptam.

A két detektor használatával a rendszerbe vezetett argonáram és a fejlődő hidridmennyiség kétfelé oszlik, minek eredményeképpen az érzékenység csökken, csak a 100%-os mintabeviteli hatásfokot és teljes fázisválasztást eredményező hidridfejlesztéssel együtt alkalmas természetes minták As és Se koncentrációjának meghatározására (37. ábra). Természetesen kételemes rendszer jellege megköveteli az elválasztási, a hidridfejlesztési paraméterek és a gázáramok újraoptimalását, mely azzal, hogy két elem specieszeinek meghatározását tűztam ki célul, még nagyobb kompromisszumokat követelt, mint az egyelemes rendszerek fejlesztése.

37. Ábra A HPLC-HG-(AFS)₂ rendszerrel kapott szimultán kromatogram négy As és négy Se specieszre



38. Ábra A multielemes speciációs rendszerrel mért osztriga minta As-Se szimultán kromatogramja



A 38. ábra a multielemes speciációs rendszerrel mért spikolt osztriga minta As-Se szimultán kromatogramját mutatja, melyet egy EU projekt keretében vizsgáltam. A kromatogram bizonyítja, hogy a rendszer alkalmas bizonyos természetes minták speciációs elemzésére.

Ezenkívül a két párhuzamosan kötött AFS detektor multieleemes detektor alkalmazása megfelelő előkísérlet sorozatot alkotott a valódi multieleemes - multieleemes detektort alkalmazó (ICP-AES, ICP-MS) - speciációs rendszerek fejlesztéséhez is.

Mára már megbizonyosodhattunk arról, hogy a szimultán multieleemes speciációs elemzések legnehezebben megoldható része nem a detektálás, az elválasztástechnika és a speciációs rendszer egyes lépéseiben a működési paraméterek összehangolása, hanem a mintaelőkészítés. Ma még az egy elem módosulatainak nagy hatékonyságú és eredeti állapotban való extrakciója is sok megválaszolatlan kérdést hordoz magában.

Összefoglalóan megállapítható, hogy az elemspecifikus AFS detektort alkalmazó speciációs rendszerekben is számolni kell a nem a vizsgált elem specieszei által okozott jelekkel, melyek azonosítására szerkezetazonosításra alkalmas vagy más elven működő detektor hiányában alternatív, fázisválasztást biztosító mintabeviteli egység alkalmazása javasolt. Annak ellenére, hogy az AFS detektálás egyeleemes technika, két detektor párhuzamosan kapcsolásával két elem szimultán speciációjára alkalmas módszer fejlesztése lehetséges, amelynek kimutatási határai természetes minták elemzését is lehetővé teszik.

6.8 Kalibráció

A speciációs analitika mai napig nagy kérdése a kalibráció. Számos kísérlettel és javaslattal találkozunk az irodalomban, melyek közül mindnek vannak előnyei és hátrányai is. Általános tapasztalat az, hogy a kalibrációs módszerek megfelelősége nem abszolút jellemző, hanem mintánként, módszerenként és technikánként változik. Munkámban több különböző kalibrációs módszert alkalmaztam a speciációs eredmények kvantifikálására, melyek közül néhány példát mutatok be azok előnyeinek és hátrányainak részletezésével.

A hagyományos kalibráció a mennyiségi meghatározás legkézenfekvőbb módja, de alkalmazása bonyolultabb mátrixok és bizonyos technikák esetén a mintamátrix ill. a mintaelőkészítés hatása miatt jelentős hibátényező.

A vízminták, különösen a nem szennyezett természetes vízminták, a speciációs analitikában egyszerű mátrixként kezelhetők. Szervesanyag tartalmuk a biológia és környezeti mintákénak csak töredéke, s mivel mintaelőkészítést nem igényelnek, elemzésüknél a mintaelőkészítéshez használt vegyszerek hatásával sem kell számolni. Ezért a 'Mintavétel, minta tartósítása és tárolása' fejezetben már említett alföldi természetes vizek As(III) és As(V) tartalmának meghatározáshoz, melyet az EU határértékeket kielégítő arzénmentesítési technológia

kidolgozásának részeként végeztem, a legegyszerűbb kvantifikálási módszer, a hagyományos kalibráció alkalmazása mellett döntöttem.

Mivel vízminták szervesen As speciesz meghatározásának minőségbiztosítására hiteles anyagminta a kereskedelemben nem kapható, a kalibráció alkalmazhatóságáról más módon kellett bizonyosodnom. Az As(III) és As(V) koncentrációkat HPLC-HG-AFS rendszerrel, hagyományos kalibrációval határoztam meg mennyiségileg (20. táblázat 2., 3. oszlop), majd a minták összkoncentrációját két független, különböző elven alapuló technikával, HG-AFS-val és GF-AAS-val határoztam meg (20. táblázat 5., 6. oszlop). Ezután a speciációval kapott As(III) és As(V) adatokkal és a független technikákkal kapott összkoncentrációkkal, tömegmérleget alkottam. A táblázat 4., 5. és 6. oszlopában szereplő adatokat összehasonlítva láthatjuk, hogy a két speciesz összege a szórásjellegű különbségektől eltekintve megegyezik mindkét technikával kapott összkoncentráció eredményekkel. Ez bizonyítja, hogy a két speciesz hagyományos kalibrációval kapott értéke helytálló és elmondható, hogy a kísérletsorozatban szereplő alföldi természetes vizek As(III) és As(V) tartalmának meghatározására megfelel az egyszerűen kivitelezhető hagyományos kalibráció.

20. Táblázat A természetes vízminták As(III) és As(V) tartalma és azok összege két független technikával kapott Σ As koncentrációval összehasonlítva. A érték 3 ismételéből számolt átlagértékek 5-8% RSD értékkel minden esetben

Minta	As(III)*	As(V)*	As(III)+As(V)	Σ As**	Σ As***
1.	165	125	280	286	285
2.	14	75	89	92	92
3.	< D.L.	32	32	30	30
4.	28	18	46	44	42
5.	< D.L.	42	42	40	43
6.	< D.L.	27	27	27	25
7.	< D.L.	59	59	59	60
8.	11	16	27	27	25
9.	10	16	26	27	25
10.	< D.L.	24	24	22	23
11.	< D.L.	65	65	63	65
12.	43	11	54	54	55
13.	33	24	57	56	54

Az eredmények $\mu\text{g L}^{-1}$ -ben vannak kifejezve.

*A HPLC-HG-AFS rendszerrel kapott speciációs eredmények; **HG-AFS technikával kapott össz As koncentrációk a minták savas roncsolása után; ***GF-AAS technikával kapott össz As

A második példával a módosíthatatlan kalibrációsor és a belső standard együttes alkalmazásának előnyeit szemléltetem a 'Részminta vétele' részben már említett szardíniai kagylóminták metil higany tartalmának meghatározásával.

A minták előkészítése az 'Anyag és módszer' részben leírtak szerint történt úgy, hogy a módszerben belső standardként szereplő etil higany-kloridot meghatározott mennyiségben az acetonos és toluolos tisztítás után és a sósavas feltárás előtt adagoltam a szilárd mintához. Így a belső standard mennyiségében fellépő veszteségekkel nyomonkövethetőek a mintaelőkészítés során fellépő veszteségek.

Az etil higany belső standardnak való alkalmasságát a metil higanyhoz hasonló karaktere igazolja. Az esetleges veszteségek abból eredő különbségeit, hogy a metil higany a minta szerves része, míg az etil higany oldatként hozzáadott független komponens, így sem lehet nyomon követni a mintaelőkészítés során.

A derivatizálatlan metil higany-klorid és a mintáknál is alkalmazott etil higany-klorid mennyiség együttes derivatizálásával kapott kalibrációsor pedig a derivatizációs veszteségekről ad számot. A kalibrációs görbét a mérendő komponens és a belső standard hányadosaiból számoljuk, s mivel a mintában és a kalibrációsorban ugyanabban a koncentrációban van jelen a belső standard, így a minta metil higany koncentrációjának mennyiségi meghatározásához is a mérendő és a belső standard intenzitásának hányadosát használjuk.

A hányados használatával az analitikai készülék intenzitásának azon változása ill. ingadozása is kiküszöbölhető, mely egy, akár 30-40 mintából álló sorozat elemzése alatt a készülék melegedésével, stabilizálódásával gyakran fellép. A 21. táblázat egy MeHg kalibrációs sor öt párhuzamos elemzésének 1., 3. és 5. ismétlésének eredményét tartalmazza. Látható, hogy a 3. párhuzamos eredménye az ~60%-kal nagyobb, mint a 1. párhuzamosé mind a MeHg, mind az EtHg intenzitást tekintve. Az 5. eredmény pedig további ~15%-kal emelkedik a 3.-hoz képest.

A MeHg/EtHg hányadosok szórásjellegű különbségektől eltekintve mind a három sorozatban megegyeznek. Ez bizonyítja, hogy a hányadosok használata kiküszöböli a készülék több órás használata alatt fellépő drift jellegű különbségeket. Ha belső standard használata nélkül végeztem volna a kagylóminták MeHg tartalmának meghatározását, akkor a sokszor többórás automata mintavevő sorozat alatt bekövetkező intenzitásváltozást nem tudtam volna nyomonkövetni és az eredmények kiértékelésénél akár 30-40%-ot is tévedhettem volna.

A belső standard használata az automata mintavevő bizonytalanságából eredő különbség kiküszöbölését is megoldja. A kalibrációsor 1. mérését bemutató táblázatban látható, hogy a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg esetén mind a MeHg, mind az EtHg érték 20%-kal kisebb, mint az ugyanarra a koncentrációra vonatkozó érték a többi ismétlésnél, míg a MeHg/EtHg hányados megegyezik a többi ismétlés sorozatban a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg-hoz tartozó hányadossal. Ez azt jelenti, hogy a

különbség injektálási hibából ered és a belső standard, ill. a belső standarddel képzett hányados használata az ebből eredő differenciák kiküszöbölésére is alkalmas.

21. Táblázat Öt párhuzamos MeHg kalibrációból az I., III. és V. beütésszámban kifejezve; belső standard: $200 \mu\text{g L}^{-1}$ EtHg

I.

	MeHg	EtHg	MeHg/EtHg
10	7020	20200	0,348
50	18596	20544	0,905
200	84763	17038	4,975
400	165954	21002	7,902
800	325109	20876	15,57

III.

	MeHg	EtHg	MeHg/EtHg
10	11132	31611	0,352
50	29337	32173	0,912
200	155412	31296	4,966
400	250867	31718	7,909
800	498589	32224	15,47

V.

	MeHg	EtHg	MeHg/EtHg
10	12715	36577	0,348
50	32630	35908	0,909
200	182125	36677	4,966
400	292065	37001	7,893
800	574545	37149	15,47

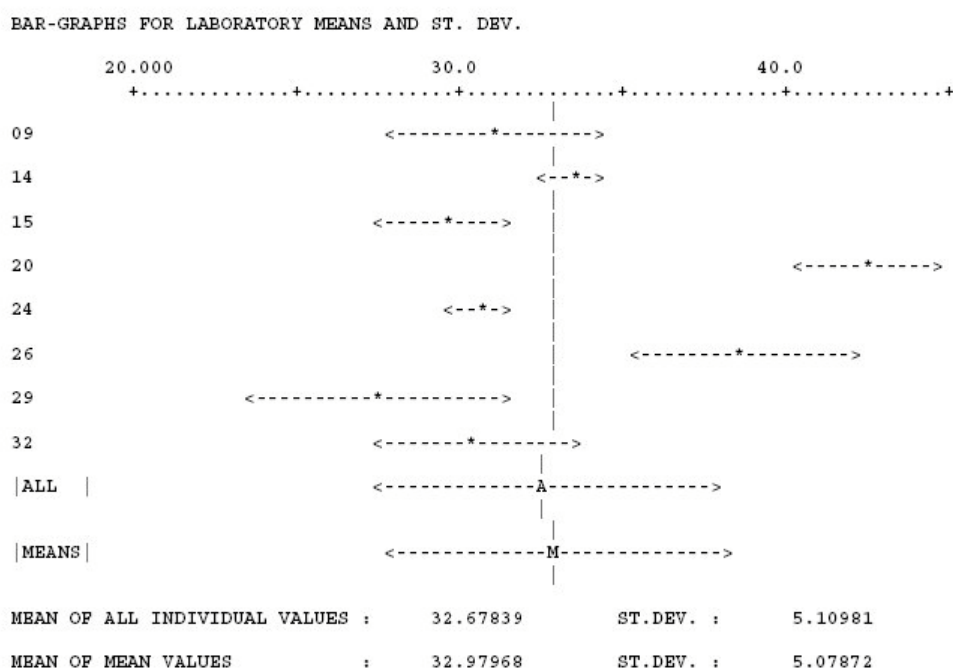
A belső standard fontosságát a mintaelőkészítés során fellépő veszteségek nyomonkövetésében a kagylóminták előkészítésénél a következőképpen tapasztaltam. A MeHg tartalom kvantifikálásra szolgáló mintaelőkészítés bonyolult, számos lépésből álló folyamat, melyet az 'Anyag és módszer' fejezet részletez, és melyek során a mérendő veszteségével az alábbi okok miatt kell számolni. Jelentős veszteség feltételezhető elsősorban amiatt, hogy a szilárd minta megköt a roncsolást szolgáló sósavoldatból, melyet többlépcsős centrifugálással sem lehetséges tökéletesen elválasztani. Feltehetően a térfogatveszteséggel arányos mérendőt tart magában. Ezen kívül a szerves és vizes fázis elválasztása sem oldható meg tökéletesen. A toluolos extrakciónál olyan fázisválasztási nehézségek lépnek fel, melyet a minta zsírtartalmának felhabzása okoz, s mely az oldószer akár 25%-t is tartalmazhatja. Ha a belső standard a mintaelőkészítés elején a mintába

kerül, a veszteségek a MeHg veszteségekkel arányosak lesznek, így a MeHg/EtHg hányadossal a kvantifikálásnál ennek hatása kiküszöbölhető. Ha egy mintát három párhuzamos vizsgálati mintarészlet elemzésével jellemezünk, melyeknél nem tudjuk egyenlő mértékben megoldani a fázisok szeparálását, csak a MeHg-t koncentrációt tekintve, belső standard használata nélkül nagyon különböző eredményeket is kaphatunk. Ez az eredmények nagy szórásához vezet. A belső standard alkalmazásával ezeket a különbségeket nyomon követjük, normáljuk.

Tehát a derivatizálatlan mérendőből és állandó mennyiségű derivatizálatlan belső standardból készített kalibrációs mintákkal együttes végzett derivatizálása a származékképzési lépés hibáit követi nyomon, és a kvantifikálást tekintve kiegyenlíti, míg a belső standard használata a teljes analitikai folyamat veszteségeivel számol a mintaelőkészítés első lépésétől a detektálásig. A kettő együttes alkalmazása az analitikai folyamat és a kvantifikálás minőségét is biztosítja

A harmadik példával a belső kalibráció – a standard addíció – alkalmazását mutatom be egy hitelesítési gyakorlat keretében mért osztriga minta arzenobetén tartalmának meghatározására. A feladatban a BCR és a projekt standard addícióra vonatkozó szigorú szabályait követtem. A kalibrációs görbét a minta hagyományos kalibrációval meghatározott koncentrációjából és három addíciós pontból építettem fel, az eredeti koncentráció egyszeres, kétszeres és négyszeres mennyiségének adagolásával. A minta AsBet koncentrációját az ily módon kapott kalibrációs görbe és az Y-tengely metszéspontja adta meg.

39. Ábra Az osztriga minta AsBet koncentrációját jellemző eredmények a hitelesítési gyakorlatban



A 39. ábra a hitelesítési gyakorlatban kapott extrakciós hatásfokkal korrigált AsBet koncentrációkat mutatja be szárazanyagtartalomra megadva. A '09' szám jelzi a saját eredményeket. Megállapítható, hogy a standard addícióval meghatározott koncentráció jól egybevághat a hitelesítési gyakorlatban résztvevő többi laboratórium eredményének átlagával. A kiértékelés jóval a mérés kivitelezése után történt, mely a hitelesítési gyakorlatban való részvétel, mint minőségbiztosítási eszköz jelentős hátránya. Ha speciációs méréseknél nem áll rendelkezésre bizonylatolt anyagminta, a hozzáértő laboratóriumok eredményeivel való összehasonlítás az egyik legjobb minőségbiztosítási megoldás.

A három példa szemlélteti, hogy a kalibrációk alkalmazhatóságát elsősorban a minta, az analitikai módszer és a feladat határozza meg. A vízminták egyszerű mátrixa lehetővé teszi a legegyszerűbb kalibrációs technika, a hagyományos kalibráció alkalmazását. Azonban a mérendő minták mátrixának megfelelő CRM hiányában az eredmények minőségbiztosítására független technikák és anyagmérleg alkalmazását találtam megfelelőnek, mely jelentősen megnöveli a technika munkaigényét. A kagylóminták MeHg tartalmának GC-MS-val való meghatározására a hagyományos kalibráció a mintaelőkészítés során fellépő veszteségek miatt nem alkalmazható, de belső standard és módosítatlan kalibrálósor együttes alkalmazásával a teljes analitikai folyamat kézben tartható. Az osztrigaminták AsBet tartalmának mennyiségi meghatározására alkalmazott standard addíciós technika a mátrix figyelembevétele miatt a legmegbízhatóbb technika a három példa közül, de ez a legjobban munka- és időigényes megoldás is. A hitelesítési gyakorlat előírja használatát, de rutin minták sorozatának elemzésénél a munkaigényesség miatt nem javasolt az alkalmazása.

Összefoglalóan tehát elmondható, hogy a speciációs analitika eredményeinek számszerűsítésére számos kalibrációs technika áll rendelkezésre, melyek alkalmazhatósága minden esetben feladatfüggő – a minta mátrixa, a minták száma és használandó analitikai módszer határozza meg.

6.9 A speciációs analitika minőségbiztosítása

Az speciációs analitika általános lépéseit, a lépések során felmerülő nehézségeket és azok lehetséges megoldásait a az 'Irodalmi előzmények' fejezet részletezi. Az 'Eredmények' előző részeiben pedig példákkal mutattam be, hogy munkám során a speciáció egyes lépéseit tekintve milyen formában találok ezek a nehézségekkel és milyen megoldásokat alkalmaztam annak érdekében, hogy a speciációs információ megbízható legyen. A példák részletezése során bebizonyosodott, hogy bár a speciáció minden lépésében vannak kritikus pontok, melyeket

külön-külön kell kézben tartani, a technikák sorozatát alkalmazó speciációs módszerek esetén a lépések oly módon való működésének a megoldása a cél, hogy a vizsgált mintát jellemző speciációs információ az utolsó lépésig eredeti formájában megmaradjon. Új módszerek bevezetése esetén ez validálással biztosítható, melyre a megfelelő bizonylatolt referenciaminta használata alkalmas. Már bevezetett módszerek teljesítményének folyamatos ellenőrzésére RM ill. CRM rendszeres használata javasolt, ha a meghatározandó módosulatokra a kereskedelemben elérhető, és a rendszeresen elemzett referenciamintával kapott eredményekkel kontrollkártya készíthető.

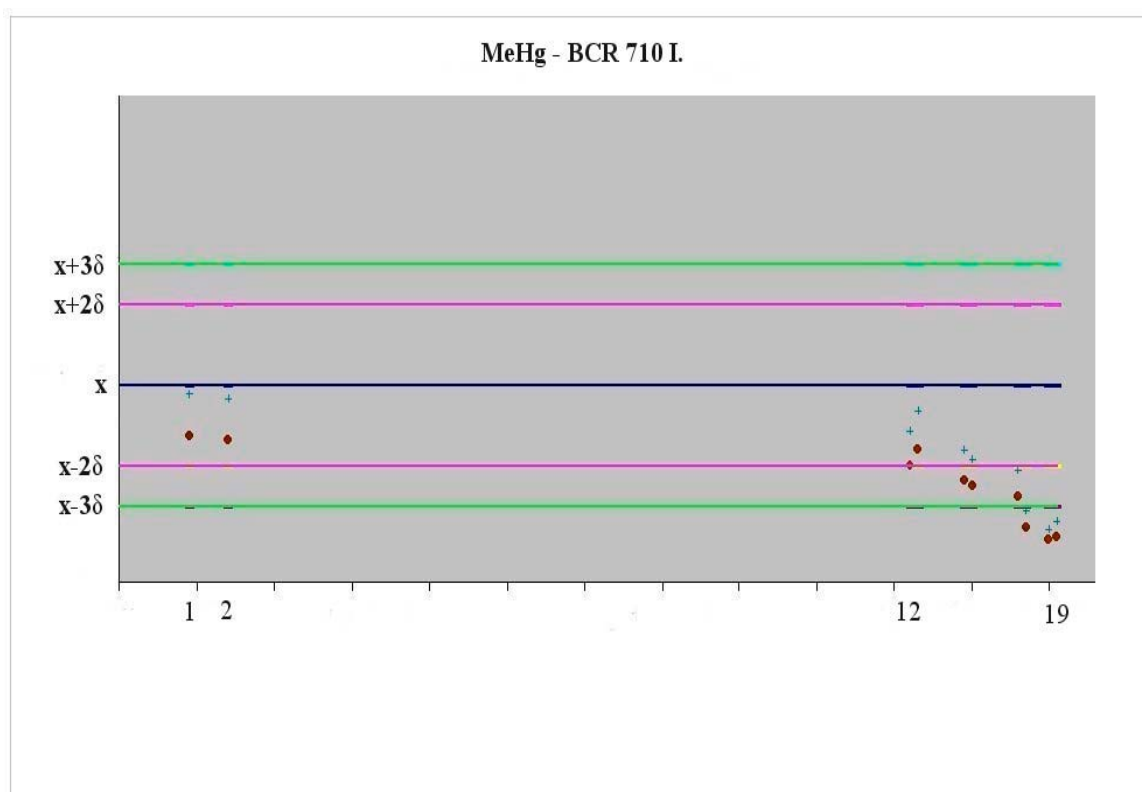
A BCR három lépéses szekvenciális extrakció időtakarékos változatainak fejlesztése szemlélteti az RM és CRM szerepét, új módszer fejlesztésekor. A klasszikus BCR 3-lépéses procedura megfelelő kivitelezéséről a BCR 601 CRM elemzésével bizonyosodtam meg – az így elért eredmények jól megegyeztek a bizonylatolt értékekkel. Ezután klasszikus procedúrával meghatároztam az RM S7-re vonatkozó értékeket (melyek egyeztek a körelemzésben meghatározott indikatív értékekkel), és ezeket az értékeket állítottam az optimálás célértékeiként. Majd az ultrahangos rázógépet és a mikrohullámú roncsolót alkalmazó időtakarékos verziókat a körelemzés keretében meghatározott indikatív értékekkel rendelkező referencia mintán optimáltam és az optimális paraméterseregeket a célértékekkel való megegyezés alapján választottam ki, statisztikai kiértékelés segítségével. Végül a statisztikai kiértékelés eredményeképp kiválasztott két alternatív procedúrát BCR 601 CRM-re is alkalmaztam és a kapott eredményeket összehasonlítottam a klasszikus procedura CRM-án kapott eredményeivel és ennek alapján vontam le az új módszerek alkalmazhatóságára vonatkozó következtetéseket. Míg az ultrahangos procedura eredményei egyeztek a bizonylatolt eredményekkel, a mikrohullámú roncsoló alkalmazáskor több eredmény a bizonylatolt értékektől statisztikailag eltérő volt. Ennek ellenére, az extrakció időigényének jelentős csökkenését figyelembe véve, a mikrohullámú verzió alkalmazása is javasolható a környezeti fémterhelés gyors és megbízható ellenőrzésére, melynek eredményét szükség esetén a klasszikus procedura alkalmazásával lehet kiegészíteni.

A CRM-ek szerepét a kontrollkártyák készítésében, tehát a már bevezetett speciációs módszerek teljesítményének folyamatos ellenőrzésében az alábbi két példán mutatom be.

A szardíniai kagylóminták MeHg elemzésének minőségbiztosítását a következőképpen végeztem. A BCR 710 jelű metil higany tartalomra bizonylatolt osztriga CRM előző méréssorozatban kapott 9 eredménye alapján meghatároztam a középértéket, mely kijelölte a kontrollkártya középvonalát (x), a 9 mérési eredmény szórása megadta a δ -nak megfelelő értéket, melynek segítségével kijelöltem a figyelmeztető és beavatkozási határt az x -től $\pm 2\delta$ és $\pm 3\delta$ távolságra. A kagylóminták mérési sorozatának elején a CRM két párhuzamos elemzésének eredménye kijelölte a

kontrollkártya első két pontját, majd naponta a CRM egy bemérési mintarészletét elemeztem egy kagylóminta három párhuzamos bemérési mintarészletével. A CRM-val kapott eredményeket felvezettem a kontrol kártyára.

40. Ábra A MeHg meghatározás hibát jelző kontrollkártyája. A piros pontok a korrigálatlan koncentrációkat, míg a kék pontok a kinyerési hatásfokkal korrigált értékeket mutatják

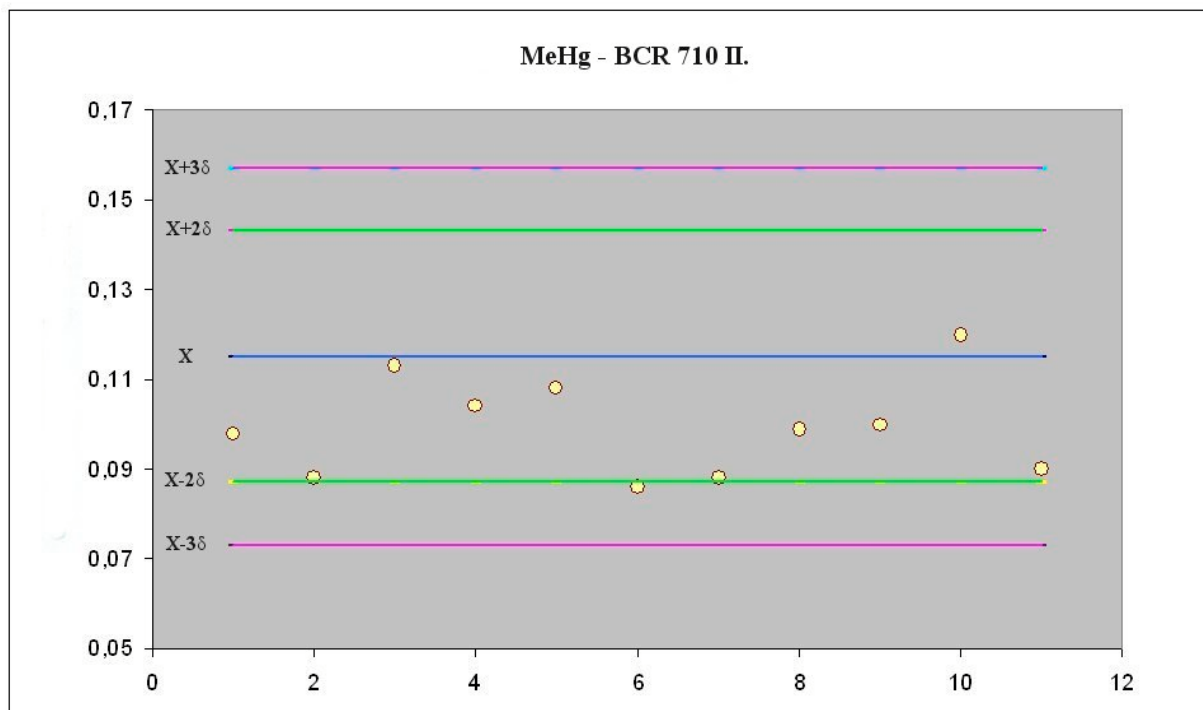


A 40. ábrán a pöttyök a metil higany mért koncentrációját, a keresztek pedig a kinyerési hatásfokkal korrigált értékeket mutatják. A kártyán megfigyelhető a mért értékek csökkenő tendenciája, mely ugyanúgy felhívja a figyelmet egy hibára, mint az, hogy három egymást követő érték a figyelmeztető zónába esik a figyelmeztető és beavatkozási határ közé, majd már a beavatkozási határon kívül. A három egymást követő, figyelmeztető zónába eső eredmény után a kagylóminták elemzését leállítottam. A hibaforrás felderítésének érdekében a CRM-et további három független ismételtsben elemeztem, különösen figyelmet fordítva a mintaelőkészítésre és a GC-MS készülék kalibrálására. Ez a három eredmény a beavatkozási határon kívül esett, mely a kontrollkártyák alkalmazási szabályai szerint minden esetben a mérési folyamat haladéktalan leállítására és korrigálására szólít fel.

Az MeHg meghatározására alkalmazott analitikai folyamat minden lépésének ellenőrzése után, mely a mintaelőkészítést, standard készítést és a GC-MS készülék működésének kivizsgálását és

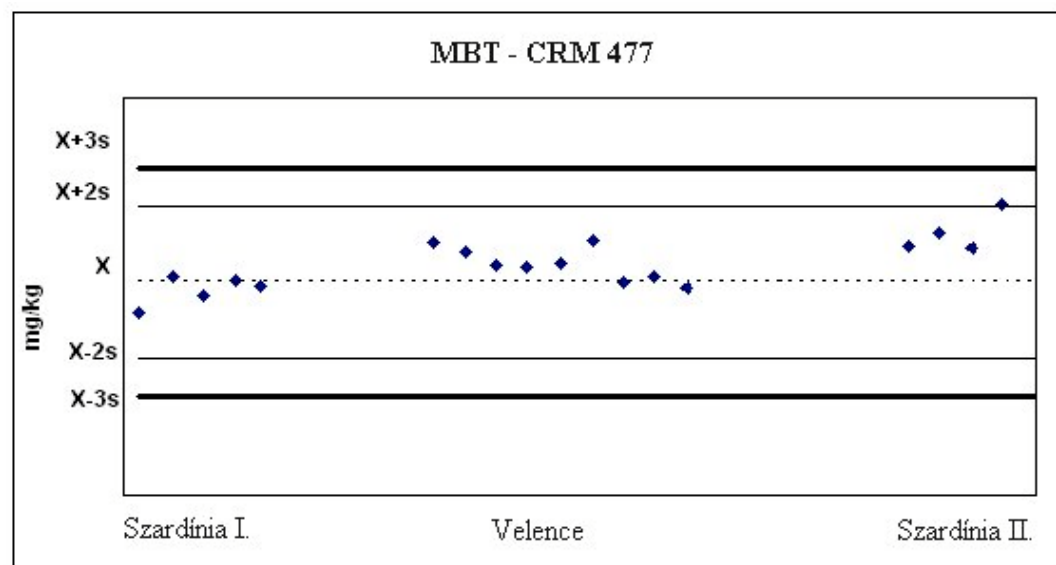
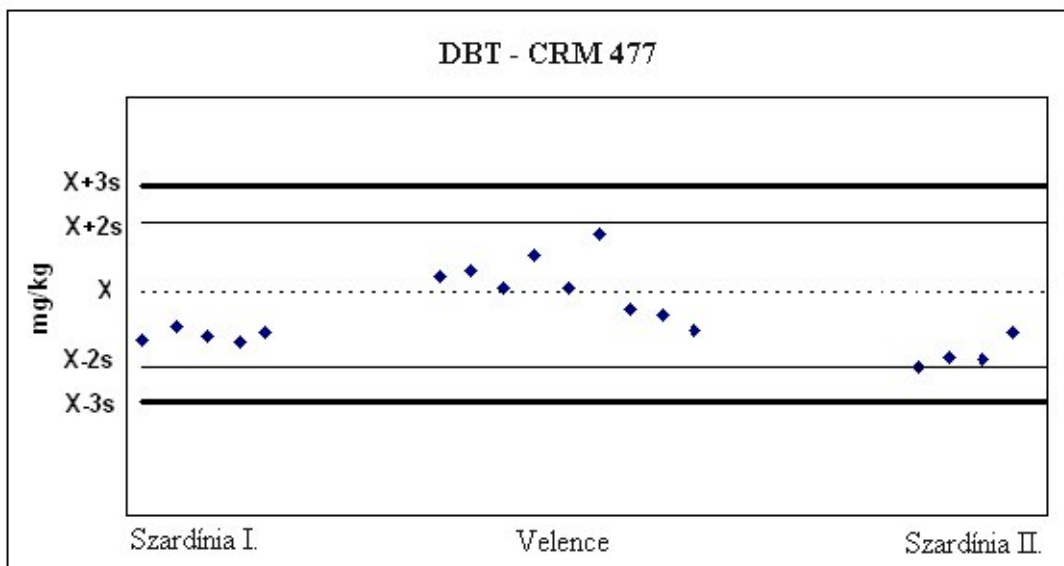
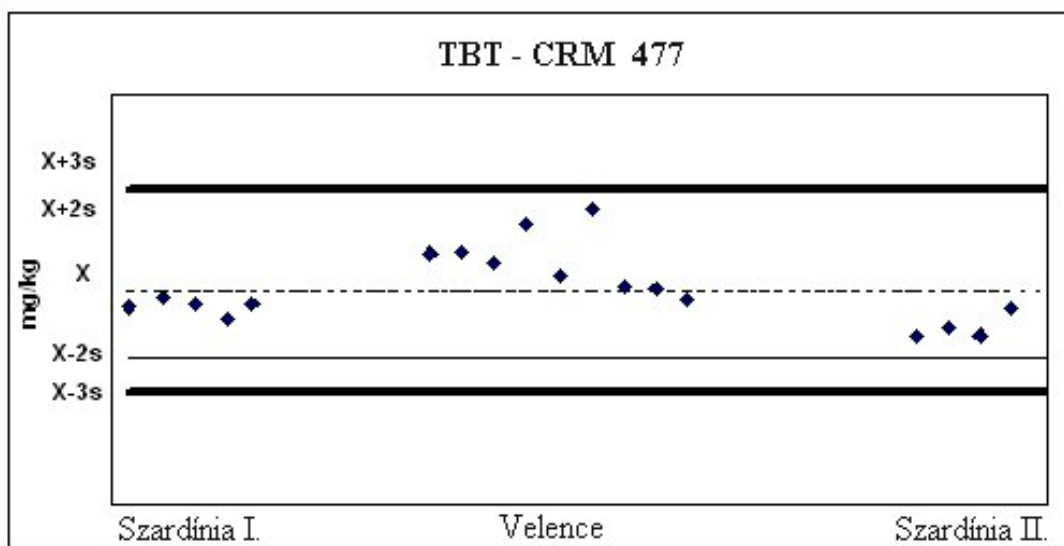
az adatkiértékelést is magában foglalta, a hiba egyetlen lehetséges forrásának a NaBPh₄ derivatizálószer lejárt szavatosságát találtam. A feltételezést bizonyította, hogy új üveg bontásával az eredmények javultak és ahogy a 41. ábra mutatja, a CRM elemzési eredményei újra a kontrollzónába estek. Ez a folyamat közben tartottságát bizonyította és amely így is maradt a kagylóminták elemzésének végéig.

41. Ábra A kagyló minta MeHg meghatározásának a hiba felderítése utáni kontrollkártyája



A kagylóminták butilón-tartalom meghatározásának minőségbiztosítására a bizonylatolt TBT, DBT és MBT koncentrációval rendelkező CRM 477-et használtam és mindhárom komponensre kontrollkártyát vezettem. A középértékeket, a figyelmeztető és beavatkozási határokat meghatározó σ értékeket a CRM négy napon kapott összesen 12 eredményéből számoltam. A mintaelőkészítés bonyolultsága és időigénye miatt minden mintát két bemérési mintarészlettel jellemeztem, és egy nap egy mintát készítettem elő – egyik nap egy vakkal, a másik nap egy CRM mintarészlettel párhuzamosan. Az utóbbi eredményeit felvezettem a kontrollkártyára.

42. Ábra A kagylóelemzés kontrollkártyái TBT, DBT és MBT tartalomra



A 42. ábra a három komponens, a TBT, DBT és MBT, kontrollkártyáját mutatja be. Mindhárom kártya az alkalmazott analitikai folyamat kézbentartottságát bizonyítja. Az eredmények minden esetben a kontrollzónába esnek és nem mutatnak olyan jellemző eltérést, melyek beavatkozást igénylő jelenségre hívják fel a figyelmet.

A butilón-tartalom meghatározása minőségbiztosítási szempontból egy összetettebb feladat, mint a metilhigany meghatározás, mert itt három komponens értékeinek folyamatos megfigyelésére van szükség. A kontrollkártyák általános kiértékelési szabályai meghatározzák, hogy az eredmények bizonyos elrendezésben való megjelenése a folyamat milyen irányú módosulására ill. hibájára hívják fel a figyelmet. Ezek a szabályok azonban egy komponens megfigyelésére vannak kidolgozva. Kérdéses, hogy a szabályok hogyan módosulnak azokban az esetekben, amikor a három kontrollkártya, tehát három komponens megfigyelése együttesen jellemzi a folyamat kézbentartottságát.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatási munkám során speciációs rendszereket és módszereket fejlesztettem és kidolgoztam a módszerek minta-specifikus és lépésenkénti minőségbiztosítását.

Kísérleti eredményeim három fő részre oszthatók:

1. Arzén és szelén specieszek meghatározására számos mérőrendszert fejlesztettem nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia és atomfluoreszcens detektor felhasználásával a meghatározandó specieszek, a minták és a kimutatandó speciesz koncentrációk függvényében. A rendszer- és módszerváltozatok speciációs feladatra való alkalmasságát minták elemzésével bizonyítottam.
2. Kidolgoztam az üledékminták fémspeciációjára alkalmas műveleti speciációs módszer, a BCR három-lépéses szekvenciális extrakció jelentősen rövidített változatait ultrahangos és mikrohullámú technika felhasználásával. Az alternatív extrakciós megoldások teljesítményét a módszer-specifikus BCR 601 CRM-val jellemeztem, és az eredmények statisztikai kiértékelése után megállapítottam, hogy a kidolgozott módszerek a rutin analitikában alkalmazhatók.
3. Módszert fejlesztettem biológiai minták metilhigany tartalmának extrakciójára és GC-MS meghatározására, s megoldottam a módszer rutinszerű használatának minőségbiztosítását. Egy biológiai minták szerves ón tartalmának meghatározására validált módszer teljesítményvizsgálatát végeztem el kontrollkártyák alkalmazásával.

Megoldottam speciációs feladataim lépésenkénti minőségbiztosítását és a következőket állapítottam meg:

- Az elemről elemre és specieszről specieszre változó mobilitás, biológiai elérhetőség és beépülési mechanizmus miatt, a speciációs elemzések elemspecifikus tervezést igényelnek.
- A specieszek eredeti állapotban való megtartása a minták egyedi tartósítási és tárolási paramétereinek meghatározását követeli meg. A tárolási paraméterek hatására bekövetkező változások felmérésével és a megállapításokhoz való igazodással ill. a minták mielőbbi elemzésével a specieszek eredeti állapota megőrizhető.
- A homogenizálás módja és mértéke jelentősen befolyásolja a speciációs mérések megbízhatóságát. Az alminták együttes homogenizálása - a speciesz analitikában is - a környezetre vonatkozó információ veszteségéhez vezethet.
- A BCR három-lépéses szekvenciális extrakció alternatív változatainak fejlesztésekor kiértékeltem a pontosságot és megbízhatóságot befolyásoló paramétereket.
- A statikus speciációnál alkalmazott extrakciós módszerek alapjaiban határozzák meg a választott elválasztástechnika optimális paramétereit és korlátait. Ha az extrakciós

paraméterek változtatása már a mennyiségi meghatározás minőségét befolyásolná, akkor az elválasztási paraméterek adott feladatra való módosítását kell alternatív megoldásként számításba venni. A vizsgált minta jellege és speciesz koncentrációja nagymértékben meghatározza az extrakciós technikák alkalmasságát.

- A speciációban leggyakrabban jelentkező kromatográfiás problémára - specieszazonosítás és csúcstisztaság -, szerkezetazonosításra alkalmas detektálás és megfelelő CRM hiányában a spikolás módszere és két különböző elven működő kromatográfia együttes alkalmazása megbízható minőségbiztosítási alternatívát nyújt számos minta esetén. Az olyan összetett rendszerekben, mint a HPLC-HHPN/USN-AFS és a HPLC-TO-UV-HG-AFS, a kromatogramok kiértékelési problémáinak (alapvonal emelkedés, háttérjelek) nem minden esetben kromatográfiás okai vannak, az elválasztás előtti lépések is befolyásolják a kromatogram minőségét.
- A folyamatos speciációs mérőrendszerekben az elválasztás utáni derivatizálás rendszerbe illesztése bonyolult, és sok paraméter kompromisszumos optimalizálását igénylő feladat. A szerves szelén módosulatok közvetlenül is képeznek hidridet. A HPLC-HG-AFS rendszer a specieszek ezen jellemzőjét használja ki. Előredukciós lépés alkalmazásával a speciációs mérőrendszer ugyan bonyolultabbá válik és még több paraméter kézbentartását igényli, mint a közvetlen hidridképzés, azonban jelentősen növeli a módszer érzékenységét és a hidridet nem képző specieszek Se(IV)-é történő redukciójával a meghatározható specieszek száma is növekszik.
- Annak ellenére, hogy a atomfluoreszcens detektálás elementspecifikus technika, porlasztásos mintabeviteli egység használatakor számolni kell olyan háttérjelek megjelenésével, amelyeket nem a mérendő elem specieszei eredményeznek. Ezek azonosítására szerkezetazonosításra alkalmas vagy más elven működő detektor hiányában teljes fázisválasztást biztosító mintabeviteli egység alkalmazása javasolt. Két AFS detektor párhuzamos kapcsolásával két elem szimultán speciációjára alkalmas, valódi minták elemzését biztosító módszer fejlesztése lehetséges.
- A speciációs analitika eredményeinek mennyiségi kiértékelésére számos kalibrációs technika áll rendelkezésre, melyek alkalmazhatósága minden esetben feladatfüggő, a minta mátrixa, a minta száma és a használandó analitikai módszer határozza meg.
- A bevezetett speciációs módszerek teljesítményének folyamatos ellenőrzését RM ill. CRM minták rendszeres használata és az eredményekkel készített kontrollkártya biztosíthatja.

Összefoglalóan megállapítható, hogy a speciációs analitika minden lépésében vannak olyan kritikus pontok, melyeket külön külön kell kézben tartani, de a speciációs módszerek lépései mégsem kezelhetők egymástól teljesen függetlenül. A lépések oly módon való összehangolásának

megoldására van szükség, hogy a vizsgált mintát jellemző speciációs információ az utolsó lépésig megmaradjon.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Megállapítottam, hogy a speciációs környezetanalitikai vizsgálatok elemspecifikus tervezést igényelnek. Vizsgálataimmal igazoltam, hogy a tengervíz szerves ón szennyezésének monitorozására tervezett kísérletsorozat arzén hasonló megfigyelésére nem alkalmas, az elem és specieszeinek különböző beépülési mechanizmusa miatt.
2. Igazoltam, hogy a speciációs mintavétel után lehetőleg azonnal végre kell hajtani az elemzést vagy tartósítani kell a mintát. Ez a minták egyedi tartósítási és tárolási paramétereinek meghatározását követeli, azonban a tartósítás ritkán jár száz százalékos eredménnyel.
 - Bemutattam, hogy a vizsgált szerves arzén specieszek stabilitása vizes oldatban nem biztosítható, míg a brazil dió minták szerves szelén specieszei olyan stabilisak, hogy referencia minta készítését is lehetővé teszik.
3. A homogenizálás mértéke és a vizsgálati mintarészlet mérete jelentősen befolyásolja a speciációs mérési eredmények megbízhatóságát. Kagylóminták higany speciációjával és brazil dió minták szelén speciációjával meghatároztam a homogenitás mértékének hatását a mérési eredmények reprodukálhatóságára. Megállapítottam, hogy az alminták együttes homogenizálása javítja a homogenitás mértékét, ez azonban környezeti információ veszteségéhez vezethet a speciesz analitikában is.
4. Megállapítottam, hogy az extrakció hatásfokának ellenőrzése elengedhetetlen, de még a speciesz hozzáadás/visszanyerés adatokat is kritikával kell kezelni.
 - Kifejlesztettem a négy napot igénybe vevő BCR három-lépéses szekvenciális extrakció két jelentősen rövidített változatát ultrahang és mikrohullámú besugárzás felhasználásával és a CRM 601 bizonylatolt referencia minta (CRM) használatával meghatároztam a módszer pontosságát és megbízhatóságát befolyásoló paramétereket.
 - Csirkehús minták arzén speciációjával bemutattam, hogy ha az extrakciós paraméterek változtatása már a mennyiségi meghatározás minőségét befolyásolná, akkor az elválasztási paraméterek módosítását kell alternatív megoldásként számításba venni. A példával bizonyítottam, hogy a vizsgált minta jellege és a mért specieszek koncentrációja is nagymértékben befolyásolja az extrakciós technikák alkalmasságát.
5. Megállapítottam, hogy az elválasztások hatékonyságát nagymértékben befolyásolják a mintaelőkészítés körülményei, melyek elválasztással való összehangolása feltétele a megbízható speciációs analitikai eredményeknek.
 - Vizsgálataim azt bizonyították, hogy nagy hatékonyságú porlasztót alkalmazó rendszereknél, mint a HPLC-HHPN-AFS és a HPLC-USN-AFS, az extrahálószer és a

mintabeviteli egység választása befolyásolja a kromatogram minőségét és olyan háttérjeleket okozhat, melyek kiküszöbölésére a teljes fáziselválasztást biztosító hidridfejlesztés nyújt lehetőséget.

- Bizonyítottam, hogy szerkezetazonosításra alkalmas detektor és CRM hiányában, az addíció és a két különböző elven működő kromatográfia nyújt megbízható minőségbiztosítási alternatívát az ismert módosulatok azonosítására.

6. Bizonyítottam, hogy az elválasztás előtt ill. az elválasztás után alkalmazott származékképzés növelheti a módszerek szelektivitását és érzékenységét, azonban számos hibaforrást (szennyezést, műtermékképződést, stb) is rejt magában.

- Megállapítottam, hogy a szerves szelén módosulatok közvetlenül is képeznek hidridet, lásd: HPLC-HG-AFS rendszer, amely a szelén specieszek ezen jellemzőjét használja ki. Annak ellenére, hogy a szelén aminosavak hidridképzési hatásfoka elmarad a száz százaléktól, a nagy hatékonyságú porlasztót alkalmazó rendszerhez képest jelentős kimutatási határ javulást eredményez. A hidridfejlesztés előtti előredukció alkalmazásával a speciációs mérőrendszer – HPLC-TO-UV-HG-AFS – ugyan bonyolultabbá válik és így a hibaforrások száma növekszik, azonban növeli a módszer érzékenységét és a hidridet nem képző Se(VI) Se(IV)-é redukálásával a meghatározható specieszek számát is.

7. Példákkal támasztottam alá, hogy a speciációban szükség lenne a szerkezetazonosításra alkalmas detektálás használatára.

- Bizonyítottam, hogy az atomfluoreszcens detektálás bár elemspecifikus technika, porlasztásos mintabeviteli egység használatakor számolni kell olyan háttérjelek megjelenésével, amelyeket nem a mérendő elem specieszei eredményeznek.

- Bemutattam, hogy két egyelemes AFS detektor párhuzamos kapcsolásával két elem szimultán speciációjára alkalmas, valódi minták elemzését biztosító módszer fejlesztése is lehetséges.

8. Megállapítottam, hogy a speciációs analitika kalibrálása csak speciesz specifikusan végezhető, s a mátrixhatások miatt ritkán elegendő a hagyományos kalibráció. Standard addíció vagy bizonylatolt referencia mintával történő kalibráció az eredmények megbízhatóságát növeli.

- Bizonyítottam, hogy a hagyományos kalibráció egyszerű mátrix esetén (természetes vízminták) megbízhatóan alkalmazható speciációs eredmények mennyiségi meghatározására.

- Kagylóminták metil-higany tartalmának mennyiségi meghatározásával bemutattam, hogy módosítatlan kalibrációsor és belső standard együttes használata alkalmas bonyolult

analitikai folyamatok veszteségeit nyomon követni a mintaelőkészítés első lépésétől a detektálásig.

- Osztrigaminták arzenobetén tartalmának mennyiségi meghatározásával szemléltettem, hogy a belső kalibrációs technika bár rendkívül munkaigényes, a mátrix figyelembe vétele miatt a legmegbízhatóbb kalibrációs megoldás.

I. MELLÉKLET - IRODALOMJEGYZÉK

1. URE A.M. et al (1995): Introduction to speciation. 1-5 p. In: URE A.M., DAVIDSON C.M. (Szerk.): *Chemical Speciation in the Environment*, Blackie Academic and Professional, London.
2. TEMPLETON D.M., ARIESE F., CORNELIS R., DANIELSSON L-G., MUNTAU H., van LEEUWEN H.P., LOBINSKI R. (2000): Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of trace elements. Definitions, structural aspects and methodological approaches. *Pure and Applied Chemistry*, 72 143-159 p..
3. EBDON L., PITTS L., CORNELIS R., CREWS H., DONARD O.F.X., QUEVAUVILLER P. (Szerk.) (2001): Foreword. *Trace element speciation for environment, food and health*. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge.
4. MARCANTONIO F., FLOWERS. G.C., TEMPLIN N. (2000): Lead contamination in a wetlandwatershed: isotopes as fingerprints of pollution. *Environmental Geology*, 39 (9)1070-1076 p.
5. MARQUES M.J. et al. (1998): Review: Analytical methodologies for chromium speciation in solid matrices: a survey of literature. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 362 (3) 239-248 p.
6. SZPUNAR J. (2000): Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst*, 125 963-988 p.
7. VATHER M. (1999): Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. *Science Progress*, 82 (1) 69-88 p.
8. CORNELIS R. (2002): Speciation of trace elements: a way to a safer world. *Analitical and Bioanalytical Chemistry*, 373 123-124 p.
9. REGLINSKI J. (1998): Environmental and medicinal chemistry of arsenic, antimony and bismuth. 402-440 p. NORMAN N.C. (Szerk.): *Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth*, Blackie Academic and Professional, London.
10. SHIOMI K. (1994): Human Health and Ecosystem Effects. 261-301 p. NRIAGU J.O. (Szerk.): *Arsenic in the Environment*, Wiley & Sons Inc., New York.
11. RAAB A. et al. (2002): Arsenic accumulation and speciation analysis in wool from sheep exposed to arsenosugars. *Talanta*, 58 (1) 67-76 p.
12. SAKURAI T. et al. (1997): Study of in vitro cytotoxicity of a water soluble organic arsenic compound, arsenosugar, in seaweed. *Toxicology*, 122 (3) 205-212 p.

13. MOESGAARG S., MORRIL R. (2001): The Need for Speciation to Realise the Potential of Selenium in Disease Prevention. 261-282 p. EBDON L. et al. (Szerk.): *Trace element speciation for environment, food and health*, The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge.
14. World Health Organization [1990]: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 49., *Chromium, Nickel and Welding*, Lyon, France.
15. KRUMP K.S. (1995): Evaluation of Epidemiological Data and Risk Assessment for Hexavalent Chromium. *Contract no j-9-f-1-0066*. Occupational Health and Safety Administration, Washington DC.
16. DE FLORA S. et al. (1995): Chromium and Carcinogenesis, 1020-1036 p., In: BERTHON G. (Szerk.) *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids, Bioinorganic Medicine*.
17. EPA –United States Environment Protection Agency (1997): Fate and Transport of Mercury in the Environment. (EPA-452/R-97-005), *Mercury Study Report to Congress*, Volume III. <http://www.epa.gov/ttn/atw/112nmerc/mercury.html>
18. BATLEY G. (1996): Distribution and fate of tributyltin in the marine environment. 123-145 p. *Tributyltin: case study of an environmental contaminant*. Cambridge Environmental Chemistry Series.
19. FODOR P. (2000): Minőségbiztosítás a speciációs analitikában (Irodalmi összefoglaló). *Magyar Kémiai Folyóirat*, 106 (5-6) 192-200 p.
20. HLAVAY J. (1998): Analitikai módszerek validálása: megfelelés a célnak. *Magyar Kémikusok Lapja*, 53. (Különszám) K6-K8 p.
21. LOBINSKI R., SZPUNAR J. (1999): Biochemical speciation analysis by hyphenated techniques. *Analytica Chimica Acta*, 400 321-332 p.
22. GÓMEZ-ARIZA J.L. et al. (2000): Stability of chemical species in environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 19 (2-3) 200-205 p.
23. GÓMEZ-ARIZA J.L. et al. (1999): Stability and storage problems in selenium speciation from environmental samples. *International Journal of Analytical Chemistry*, 74 (1-4), 215–231 p.
24. RAPSOMANIKIS S. (1994): Derivatization by ethylation with sodium tetraethylborate for the speciation of metals and organometallics in environmental samples. *Analyst*, 119 1429-1439 p
25. JÓKAI ZS. et al (1998): Stability and Optimization of Extraction of Four Arsenic Species. *Microchemical Journal*, 59 (1) 117-124 p.

26. CARICCHIA A.M. et al (1994): Influence on storage conditions on the organotin determination in mussel samples. *Analytica Chimica Acta*, 286 329-334 p.
27. DE BOER J., SMEDES F. (1997): Effects of Storage Conditions of Biological Materials on the Contents of Organochlorine Compounds and Mercury. *Marine Pollution Bulletin*, 35 93-108 p.
28. ROSENBERG E., ARIESE F (2001): Quality Control of Speciation Analysis. 17-50 p. EBDON L. et al. (Szerk.): *Trace element speciation for environment, food and health*, The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge.
29. LI W.C. et al (1990): Preservation of organics. 90-139 p. *Part V. Stability of Butyltin Species in Sediment Extracts*, NWRI Contribution No. 1.
30. RITSEMA R., DONARD O.F.X. (2000): Organometallic Compounds Determination in the Environment by Hyphenated Techniques. 1003-1023 p. In: BARCELO D. (Szerk.): *Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants*, Elsevier, Amsterdam.
31. LEVANDER O.A., BURK R.F. (1996): Occurrence and Distribution of Selenium. 320-324 p. In: ZIEGLER E.E., FILER L.J. (Szerk.): *Present Knowledge in Nutrition*, ISLI Press, Washington DC.
32. QUEVAUVILLER PH. (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.
33. KORHAMMER S. et al. (2000): Practicioners's report: The preparation of a cabbage reference material for environmental monitoring and food analysis. *Accreditation and Quality Assurance*, 5 238-242 p.
34. MORABITO R. (1995): Extraction techniques in speciation analysis of environmental samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 351 (4/5) 378-385 p.
35. DONARD O.F.X. et al. (2001) :Organotin Compounds in the Environment: Still a Critical Issue. 142-175 p. EBDON L. et al. (Szerk.): *Trace element speciation for environment, food and health*, The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge.
36. IPOLYI I. et al (2003): Concentration levels of total and methyl mercury in mussel samples collected along the coast of Sardinia Island (Italy). *Analytica Chimica Acta*, accepted for publication.
37. PELLEGRINO C. et al. (2000): Comparison of twelve selected extraction methods for the determination of butyl- and phenyltin compounds in mussel samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 19 (2-3) 97-109 p.
38. CARUSO J.A. et al.(2001): An evaluation of extraction techniques for arsenic species from freeze-dried applesamples. *Analyst*, 126 136-140 p.

39. SÖRÖS CS. et al. (2003): The potential of arsenic speciation in *Mytilus edulis* for environmental monitoring. Submitted to *Analytical and Bioanalytical Chemistry* for publication.
40. CHATTERJEE A. (2000): Determination of total cationic and total anionic arsenic species in oyster tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS. *Talanta*, 51 303-314 p.
41. RABER G. (2000): Determination of 'arsenosugars' in algae with anion-exchange chromatography and an inductively coupled plasma mass spectrometer as element-specific detector. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 367 181-188 p.
42. GÓMEZ-ARIZA J.L. et al.(2001):Sample Treatment and Storage in Speciation Analysis. 51-80 p. EBDON L. et al. (Szerk.): *Trace element speciation for environment, food and health*, The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge.
43. MARTINS P. et al (2002): Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, 470 195-204 p.
44. ANGELES QUIJANO M. et al. (2000): Selenium speciation in animal tissues after enzymatic digestion by high-performance liquid chromatography coupled to plasma mass spectrometry. *Applied Organometallic Chemistry*, 5 431-437 p.
45. BERMEJO-BARRERA P. et al (2001): Sample pre-treatment methods for the trace elements determination in seafood products by atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 54 969-984 p.
46. PADRO-MARTINEZ M. et al. (2001): Comparison of enzymatic extraction procedures for use with directly coupled high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of baby foods. *Analytica Chimica Acta*, 441 (1) 29-36 p.
47. PANNIER F. et al. (1996): Determination of butyltin compounds in marine biological samples by enzymatic hydrolysis and HG-GC-QFAAS. *Analytica Chimica Acta*, 327 (3) 287-293 p.
48. STEFANKA ZS. et al (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.
49. GILON N. et al. (1995): Selenoamino acid speciation using HPLC-ETAAS following an enzymatic-hydrolysis of selenoprotein. *Applied Organometallic Chemistry*, 9 623-628 p.
50. KOTREBAI M. et al. (1999): Characterization of selenium species in biological extracts by enhanced ion-pair liquid chromatography with inductively coupled-mass spectrometry

- and by referenced electrospray ionization-mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 54 1573-1591 p.
51. DELA CALE GUNTINAS M.B. et al (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 (9) 1041-1046 p.
 52. STEFÁNKA ZS. et al. (2001): Biológiai minták előkészítése As-, Se-speciációs célokra. ELTE –Tavaszi Szél Konferencia 2001.
 53. QUEVAUVILLER PH., MORABITO R. (2000): Evaluation of extraction recoveries for organometallic determinations in environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 19 (2-3) 86-96p.
 54. THOMPSON M et al. (1999): Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement (technical report). *Pure Applied Chemistry*, 71 337-348 p.
 55. MULSPOT Certification Exercise on Species of As, Hg and Sn, and on Se in Oyster tissue, sample T34 (candidate BCR 710) /EC Contract SM&T CT 98-2232/
 56. HILL S.J. et al (2000): High-performance liquid chromatography-isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry for speciation studies: an overview. *Trends in Analytical Chemistry*, 19 (2+3) 120-126 p.
 57. CORNELIS R. et al. (2001): Trends in certified reference materials for the speciation of trace elements. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 370 120-125 p.
 58. QUEVAUVILLER PH. (2000): Certified Reference Materials: a Tool for Quality Control of Elemental Speciation Analysis. 529-566 p. In: SUTTON K.L., CARUSO J.A. (Szerk.): *Elemental Speciation – New Approaches for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam.
 59. IPOLYI I. et al. (2002): Evaluation of performances of time-saving extraction devices in the BCR three-step sequential extraction procedure. *Journal of Environmental Monitoring*, 4 541-548 p.
 60. BANFI C., CENCI R. BIANCHI M., H. MUNTAU, Istituto dell'Ambiente, Centro Comune di Ricerca, Ispra, *EUR Report*, 1992.
 61. URE A.M. et al (1995): Introduction to speciation. 1-5 p. In: URE A.M., DAVIDSON C.M. (Szerk.): *Chemical Speciation in the Environment*, Blackie Academic and Professional, London
 62. FÖRSTNER U. (1993): Metal speciation – general concepts and applications. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 51 (1-4) 5-23 p.

63. QUEVAUVILLER PH. et al. (2002): Sequential extraction procedures for sediment analysis. 10-24 p. In: QUEVAUVILLER PH. et al. (Szerk.): *Methodologies for soil and sediment fractionation studies*. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge.
64. WEISZ M. et al. (2000): Fractionation of elements in sediment samples collected in rivers and harbors at Lake Balaton and its catchment area. *Microchemical Journal*, 67 (1-3) 2207-217 p.
65. QUEVAUVILLER PH et al (1993): Improvement of analytical measurements within the BCR-program – single and sequential extraction procedures applied to soil and sediment samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 51 (1-4) 129-134 p.
66. URE A.M. et al (1993): Speciation of heavy-metals in soils and sediments – An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission-of-the-European-Communities. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 51 (1-4) 135-151 p.
67. QUEVAUVILLER PH et al (1993): Conclusions if the workshop – single and sequential extraction in sediment and soils. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 51 (1-4) 231-235 p.
68. DAVIDSON et al (1998): A critical evaluation of the three-stage BCR sequential extraction procedure to assess the potential mobility and toxicity of heavy metals in industrially-contaminated land.. *Analytica Chimica Acta*, 363 (1-3) 45-55 p.
69. ZUFIAURRE R. et al (1998): Speciation of metals sewage sludge for agricultural uses. *Analyst*, 123 255-261 p.
70. CHWASTOWSKA J., SKALMOWSKI K. (1997): Speciation of heavy metals in municipal compost. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 68 (1) 13-24 p.
71. MESTER Z. et al (1999): Digestion methods for analysis of fly ash samples by atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 395 (1-2) 157-163 p.
72. HALL G.E.M. et al (1996): Application of a sequential extraction scheme to ten geological certified reference materials for the determination of 20 elements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 11 787-797 p.
73. MARTIN R. et al (1998): Sequential extraction of U, Th, Ce, La and some heavy metals in sediments from Ortigas river, Spain. *Talanta*, 46 (5) 1115-1121 p.
74. MORABITO R. (1999): Sources of errors in organotin speciation analysis. 51-64 p. In: THOMAIDIS N.S., LEKKAS T.D. (Szerk.): *Metal Speciation in the Environment – Post*

- Conference Symposium Proceedings*, 6th Conference on Environmental Science & Technology, Pythagorion, Samos, 2nd September 1999.
75. ŠLEJKOVEC Z. et al. (2001): Underestimation of the total arsenic concentration by hydride generation techniques as a consequence of the incomplete mineralization of arsenobetaine in acid digestion procedure. *Analytica Chimica Acta*, 443 (2) 277-282 p.
 76. IPOLYI I. et al. (2001): 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.
 77. RITSEMA R. et al. (1995): Chapter 19. In QUEVAUVILLER PH et al (Szerk.): *Quality Assurance for Environmental Analysis*, Elsevier, Amsterdam.
 78. RITSEMA R. (1997): Application of Hyphenated Techniques for the Speciation of Tin, Arsenic and Mercury. *PhD Thesis*, Université de Pau et des Pays de l'Adour.
 79. DEDINA J., TSALEV D.L. (1995): *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. John Wiley & Sons, New York.
 80. CAI Y. (2000): Speciation and analysis of mercury, arsenic and selenium by atomic fluorescence spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 19 (1) 62-66 p.
 81. MORABITO R. et al (2000): Derivatization methods for the determination of organotin compounds in environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 19 113-119 p.
 82. DE LA CALLE-GUNTINAS et al. (1997): Comparison of different derivatization methods for the determination of butyl- and phenyltin compounds in mussel by gas chromatographic methods. *Applied Organometallic Chemistry*, 11 97-106 p.
 83. LAMBERTY A. et al. (1998): The recertification of the contents (mass fractions) of tributyltin and dibutyltin in coastal sediment (CRM462R). *EUR Report 18406 EN*, Brussels.
 84. QUEVAUVILLER PH. et al. (1997): The certification of the contents (mass fractions) of monobutyltin, dibutyltin and tributyltin in mussel tissue (CRM477). *EUR Report 17921 EN*, Brussels.
 85. QUEVAUVILLER PH. et al. (1998): Tin speciation. 69-113 p. *Method performance studies for speciation analysis*, The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge.
 86. DIRKX W.M.R. (1995): Speciation analysis of organotin by GS-AAS and GC-AES after extraction and derivatization. 360-409 p. *Quality Assurance for Environmental Analysis*, Elsevier Science, Amsterdam.

87. SCHUBERT P. et al. (1998): Evaluation of desulfurization procedures for the elimination of sulfur interferences in the organotin analysis of sediments. *Journal of Chromatography A*, 810 (1-2) 245-251 p.
88. SCHUBERT P. et al. (2000): Optimization of a sample preparation procedure for the speciation of organotin compounds in sediment samples using GC-AED. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 78 185-204 p.
89. PELLEGRINO C. et al (2003): in preparation.
90. MARTIN F.M., DONARD O.F.X. (1995): Aqueous ethylation of organotin compounds in simple solution for speciation analysis by cryofocussing and detection by atomic absorption spectrometry – comparison with hydride generation. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 351 (2-3) 230-236 p.
91. BLOOM N. (1989): Derivatization by etylation with sodium tetraethylborate for the speciation of metals and organometallics in environmental samples. *Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences*, 46 1131-1140 p.
92. CAI Y. et al. (2000): Gas chromatographic determination of organomercury following aqueous derivatisation with sodium tetraethylborate and sodium tetraphenylborate – Comparative study of gas chromatography coupled with atomic fluorescence spectrometry, atomic emission spectrometry and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 876 (1-2) 147-155 p.
93. MINGANTI V. et al (1995): Evaluation of different derivatization methods for the multielement detection of Hg, Pb and Sn compounds by gas chromatography-microwave induced plasma-atomic emission spectrometry in environmental samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 351 (4-5) 471-477 p.
94. PALMIERI H.E.L., LEONEL L.V. (2000): Special issue paper: Determination of methylmercury in fish tissue by gas chromatography with microwave-induced plasma atomic emission spectrometry after derivatization with sodium tetraphenylborate. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366 (5) 466-469 p.
95. BLOOM N. et al (1997): Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methyl mercury from environmental samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 358 371-377 p.
96. HINTELMANN H. et al (1997): Determination of artifactual formation of monomethyl mercury in environmental samples using stable Hg²⁺ isotopes with ICP-MS detection: calculation of concepts applying species specific isotope addition. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 358 363-370 p.

97. FALTER R. (Szerk.): Sources of error in methylmercury determination during sample preparation, derivatization and detection. In: FALTER R. (Szerk.): *Special Issue, Chemosphere*, 39 (7) 1037-1038 p.
98. HARRINGTON C.F. (2000): The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 19 (2+3) 167-179 p.
99. ABALOS M. et al. (1997): Analytical procedure for the determination of organotin compounds in sediment and biota: a critical review. *Journal of Chromatography A*, 788 1-49 p.
100. SARZANINI C., MENTASTI E. (1997): Determination and speciation of metals by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 789 (1-2) 301-321 p.
101. IPOLYI I. et al. (2000): Development of analytical systems for the simultaneous determination of the speciation of arsenic [As(III), methylarsonic acid, dimethylarsinic acid, As(V)] and selenium [Se(IV), Se(VI)]. *Analytica Chimica Acta*, 413 13-23 p.
102. KOHLMAYER U. et al. (2003): High resolution separation of 17 arsenic species in food by IC-ICP-MS – results and benefits. 66. p. In: HEUMANN K.G. (Szerk.): *Book of Abstracts – 2003 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry*. 12-17 January, Garmish-Partenkirchen, Germany.
103. VAN HOLDERBECKE M. et al. (1999): Speciation of six arsenic compounds using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14 229-234 p.
104. MICHALKE B., SCHRAMEL P. (1997): Coupling of capillary electrophoresis with ICP-MS for speciation investigations. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 357 (7) 594-599 p.
105. TAYLOR K.A. et al (1998): Design and characterization of a microconcentric nebuliser interface for capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13 1095-1100 p.
106. TANGEN A. et al (1998): Interface for the coupling of capillary electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 826 87-94 p.
107. SUTTON K.L. et al. (1998): Ultraviolet absorbance and inductively coupled plasma mass spectrometric detection for capillary electrophoresis – A comparison of detection modes and interface designs. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13 885-892 p.

108. SZPUNAR J., LOBINSKI R. (1999): Environmental speciation analysis by chromatography coupled with elemental and molecular mass spectrometry. 21-35 p. In: THOMAIDIS N.S., LEKKAS T.D. (Szerk.): *Metal Speciation in the Environment – Post Conference Symposium Proceedings*, 6th Conference on Environmental Science & Technology, Pythagorion, Samos, 2nd September 1999.
109. IPOLYI I. et al (1996): Króm speciáció optimalása. 80-84 p. In: 39. *MSzV Kiadványa*, Mosonmagyaróvár.
110. UGGERUD H., LUND W. (2000): Determination of arsenic by inductively coupled plasma mass spectrometry – comparison of sample introduction techniques. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 368 162-165 p.
111. CHAUSSEAU M. et al (2000): Optimization of HPLC-ICP-AES for the determination of arsenic species. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366 476-480 p.
112. TODOLI J.L., MERMET J.M. (1999): Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction. *Spectrochimica Acta Part B*, 895-929 p.
113. SABÉ R. et al (2001): Selenium determination in urine with atomic fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 436 215-221 p.
114. EBDON L. et al (2002): Cold vapour atomic fluorescence spectrometry and gas chromatography-pyrolysis-atomic fluorescence spectrometry for routine determination of total and organometallic mercury in food samples. *Analyst*, 127 1108-1114 p.
115. BRANDL W., HUNTER R. (1999): Benchtop ICP-MS breaks the bottleneck in inorganic elemental analysis. *Spectroscopy*, 14 30-35 p.
116. DE BOER J.L.M. (1997): Simultaneous reduction of polyatomic ion interferences in quadrupole ICP-MS using ultrasonic nebulisation and direct optimization. In: HOLLAND G., TANNER S.D. (Szerk.): *Plasma Source Mass Spectrometry, Developments and Applications*, Royal Society of Chemistry, London.
117. GLUODENIS T.J., Jr. (1998): ICP-MS: the new standard for inorganic analysis. *American Laboratory*, November 24s-27s.
118. FERRARELLO C.N. et al (2000): Multi-elemental speciation studies of trace elements associated with metallothionein-like proteins in mussels by liquid chromatography with inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometric detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15 1558-1563 p.
119. TIAN X. et al. (1999): Analytical performance of axial inductively coupled plasma time of flight mass spectrometry (ICP-TOFMS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14 1807-1814 p.

120. LEACH M. et al (2000): Gas chromatography-inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry for the speciation analysis of organometallic compounds. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15 151-156 p.
121. ABRANKÓ L. et al. (2003): Az induktív csatolású plazma-repülési idő tömegspektrometria (ICP-TOFMS) analitikai alkalmazhatósága. In: 43. MSzV Kiadványa, Siófok.
122. KLAUE B., BLUM J.D. (1999): Trace analysis of arsenic in drinking water by inductively coupled plasma mass spectrometry: high resolution versus hydride generation. *Analytical Chemistry*, 71 1408-1414 p.
123. EVANS E.H. et al. (2003): High Resolution and Multicollector Sector Field ICP-MS for Speciation Studies. 61 p. In: HEUMANN K.G. (Szerk.): *Book of Abstracts – 2003 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry*. 12-17 January, Garmish-Partenkirchen, Germany.
124. BRABANTE C. et al. (2003): Platinum group elements determination in environmental matrices by ICP-SFMS with a low-flow micronebulization/desolvation system. 95 p. In: HEUMANN K.G. (Szerk.): *Book of Abstracts – 2003 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry*. 12-17 January, Garmish-Partenkirchen, Germany.
125. HIEFTJE G.M. et al. (2003): New Combinations, Configurations, and Capabilities in Plasma-Source Mass- Spectrometry. 83 p. In: HEUMANN K.G. (Szerk.): *Book of Abstracts – 2003 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry*. 12-17 January, Garmish-Partenkirchen, Germany.
126. LARSEN E.H. et al (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.
127. LA FUENTE J.M.G. et al. (1998): Organic and inorganic selenium speciation in urine by on-line vesicle mediated high-performance liquid chromatography-focused microwave digestion-hydride generation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13 (5) 423-429 p.
128. 'Workshop on sources of error in methyl mercury determination' (unpublished results), Mainz, Germany, 1998.
129. ARIESE F. et al (1999): Evaluation of the state-of-the-art of butyl- and phenyltin compound determinations in freshwater sediment prior to certification of a reference material. *Journal of Environmental Monitoring*, 1 (2) 191-196 p.

130. KINGSTON H.M. et al (1998): Speciated isotope dilution mass spectrometry a new analytical tool: defining traditional sources of errors in Cr(VI) analysis. In: BARNES R.M. (Szerk.): *Proceedings – 1998 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry*. Scottsdale, Arizona, USA.
131. 'Book of Abstracts' In: HEUMANN K.G. (Szerk.): 2003 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry. 12-17 January, Garmish-Partenkirchen, Germany.
132. QUEVAUVILLER PH., MAIER E.A. (1999): *Certified Reference Materials and Interlaboratory Studies for Environmental Analysis – the BCR Approach*, Elsevier Sciences, Amsterdam, The Netherlands.
133. QUEVAUVILLER PH. et al (1996): A programme to improve the quality of butyltin determinations in environmental matrices. *Microchimica Acta*, 123 163-173 p.
134. WOOD R. (1999): How to validate analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 18 624-632 p.
135. VAN ZOONEN P. et al (1999): Some practical examples of method validation in the analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 18 (8+9) 584-593 p.
136. BENOLIEL M.J. (1999): Step-by-step implementation of a quality system in the laboratory. *Trends in Analytical Chemistry*, 18 (8+9) 632-638 p.
137. PRICHARD E. (Co-ordinating Author) (1995): Control Charts. *Quality in the Analytical Chemistry Laboratory*, ACOL Series, John Wiley & Sons, Chichester, UK.
138. TRAP-LRM – Training on Production and Use of Laboratory Reference Materials for Use in Routine Quality Control. *EU Project material*.
139. PÉREZ-CID B., LAVILLA I., BENDICHO C. (1998) Speeding up of a three-stage sequential extraction method for metal speciation using focused ultrasound. *Analytica Chimica Acta*, 360 (1) 35-41 p.
140. PÉREZ-CID B., LAVILLA I., BENDICHO C. (1999) Application of microwave extraction for partitioning of heavy metals in sewage sludge. *Analytica Chimica Acta*, 378 (3) 201-208 p.
141. LOHAN M.C. et al. (2001): Trace metals in the Antarctic soft-shelled clam *Laternula elliptica*: implications for metal pollution from Antarctic research stations. *Polar Biology*, 24 (11) 808-817. p.
142. AL-AASM I.S. et al. (1998): Stable isotopes and heavy metal distribution in *Dreissena polymorpha* (Zebra mussels) from western basin of Lake Erie, Canada. *Environmental Geology*, 33 (2-3) 122-129. p.

143. QUEVAUVILLER PH., DONARD O.F.X. (1996): Tin speciation monitoring in estuarine and coastal environments. 331-362 p. *Element speciation in bioinorganic chemistry*, John Wiley & Sons, UK.
144. EBDON L. et al (1988): The variation of tributyltin levels with time in selected estuaries prior to the introduction of regulations governing the use of tributyltin-based antifouling paints. *Science of Total Environment*, 68 207-223 p.
145. CHIAVARINI S. et al. (1991): Distribution and fate of TBT and its degradation products in the La Spezia gulf. *FAO/UNEP/IAEA MAP Technical Report Series*, No. 59 179-187 p.
146. BUCHET J.P. et al. (1994): Assessment of exposure to inorganic arsenic following ingestion of marine organisms by volunteers. *Environmental Research*, 66 44-51 p.
147. CHANG J.C. et al. (1995): Selenium Content of Brazil Nuts from Two Geographic Locations in Brazil. *Chemosphere*, 30 (4) 801-802 p.
148. TU H.M. et al (1998): Expression of the Brazil nut methionine-rich protein and mutants with increased methionine in transgenic potato. *Plant Molecular Biology*, 37 829-838 p.
149. KANNAMKUMARATH S.S. et al. (2002): HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373 (4-5) 454-460 p.
150. THOMAS P. et al (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.
151. HÉNINGER I. et al. (1997): Storage of aqueous solutions of selenium for speciation at trace level. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 357 600-610 p.

II. MELLÉKLET - PUBLIKÁCIÓK

1. I. Ipolyi, P. Fodor: *Development of analytical systems for the simultaneous speciation of arsenic [As(III), methylarsonic acid, dimethylarsinic acid, As(V)] and selenium [Se(IV), Se(VI)]*
Analytica Chimica Acta, 2000, **413**, 13-23.
2. I. Ipolyi, Zs. Stefánka, P. Fodor: *Speciation of Se(IV) and the Selenoamino Acids by high performance liquid chromatography - direct hydride generation – atomic fluorescence spectrometry*
Analytica Chimica Acta, 2001, **435**, 367-375.
3. Zs. Stefánka, I. Ipolyi, M. Dernovics, P. Fodor: *Comparison of sample preparation methods based on proteolytic enzymatic processes for Se-speciation of edible mushroom (Agaricus bisporus) samples*
Talanta, 2001, **57**, 437-447.
4. Ipolyi I., Stefánka Zs, Fodor P.: *Módszerfejlesztés szelено-aminosavak és szelén(IV) közvetlen hidridfejlesztéssel történő meghatározásához*
Magyar Kémiai Folyóirat, 2001, **107**, 1.
5. I. Ipolyi, W.Corns, P. Stockwell, P. Fodor: *Speciation of Inorganic Selenium and Selenoamino Acids by HPLC-UV-HG-AFS system*
Journal of Automated Methods and Management in Chemistry, 2001, **23**, 167-172.
6. I. Ipolyi, C. Brunori, C. Cremisini, P. Fodor, L. Macaluso and R. Morabito: *Evaluation of performances of time-saving extraction devices in the BCR 3-steps sequential extraction procedure*
Journal of Environmental Monitoring, 2002, **4**, 541 – 548.
7. Stefánka Zs., Dernovics M., Ipolyi I., Mátyás A., Abrankó L., Fodor P.: *HPLC-UV-HG-AFS módszer szelено-aminosavak és szervetlen szelén specieszek meghatározása*
Anyagvizsgálók lapja, 2003, **13**, 23-27.

8. I. Ipolyi, P. Massanisso, S. Sposato, P. Fodor and R. Morabito: *Concentration levels of total and methyl mercury in mussel samples collected along the coasts of Sardinia Island (Italy)*
Analytica Chimica Acta, közlésre elfogadott.

9. E.T.Bodó, Zs. Stefánka, I. Ipolyi, Cs. Sörös, M. Dernovics and P. Fodor: *Preparation, homogeneity and stability studies of candidate LRM for selenium speciation*
Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry, közlésre elfogadott.