

NAGYHATÉKONYSÁGÚ MINTABEVITELI TECHNIKÁK
ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEI NYOMELEMEK SPECIÁCIÓS
ANALÍZISÉNÉL

PhD értekezés

Stefánka Zsolt

Szent István Egyetem

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

MTA doktora

Szent István Egyetem, 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

RÖVIDÍTÉSEK.....	5
1. BEVEZETÉS.....	7
1.1 A speciációs analitika definíciója és jelentősége.....	7
1.2 A speciációs analitika általam vizsgált területei, a mintabevitel problémái.....	8
1.3 Célkitűzés.....	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	11
2.1 Szervetlen komponensek és komplexek.....	11
2.2 Fém-organikus komplexek.....	12
2.3 Makromolekulák speciációja.....	12
2.4 Speciáció oxidációs állapot szerint illetve kismolekulájú fémorganikus vegyületekben.....	17
2.4.1 Illékony specieszek elválasztása gázkromatográfiával.....	17
2.4.2 Derivatizációs és nagy hatékonyságú mintabeviteli módszerek nem illékony specieszek elválasztására gázkromatográfiával.....	18
2.4.3 Elektroforetikus módszerek a speciációs analitikában.....	20
2.4.4 Elválasztás folyadék-kromatográfiával, ICP-MS detektálással.....	21
2.4.5 Néhány példa HPLC-ICP-MS alkalmazására.....	22
2.4.6 Hidridfejlesztés a speciációs analitikában.....	23
2.4.7 Hidridfejlesztés előzetes roncsoló lépéssel kombinálva.....	24
2.4.8 A hidridfejlesztés alkalmazási lehetőségei.....	25
2.4.9 Izotóp eloszlás meghatározása.....	25
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	33
3.1 Atomfluoreszcens detektor.....	33
3.2 Induktív csatolású plazma repülési-idő tömegspektrométer.....	35
3.2.1 Az új technika megjelenésének okai.....	35
3.2.2 Az ICP-TOFMS működésének elve és a készülék felépítése.....	36
3.2.3 A modulátor.....	38
3.2.4 Az iontűkőr.....	39
3.2.5 Ionkizárás.....	39
3.2.6 A TOFMS jelentősége tranziens jelek vizsgálata során.....	40
3.2.6 A gyorsaság egyéb előnyei.....	41
4. EREDMÉNYEK.....	43
4.1 Nagy hatékonyságú folyadék-kromatográfia és atomfluoreszcens spektrometria kapcsolása nagynyomású porlasztóval, HPLC-HHPN-AFS rendszer.....	43
4.1.1 Felhasznált vegyszerek és eszközök.....	43
4.1.2 A HPLC-HHPN-AFS rendszer felépítése.....	44
4.1.3 A HPLC-HHPN-AFS rendszer analitikai teljesítőképességének vizsgálata.....	47
4.1.4 A HPLC-HHPN-AFS rendszer alkalmazása élelmiszer minta speciációs elemzésére.....	51
4.1.5 Összefoglalás.....	55
4.2 Nagy hatékonyságú folyadék-kromatográfia és atomfluoreszcens spektrometria kapcsolása hidridfejlesztéssel, HPLC-HG-AFS rendszer.....	57
4.2.1 Felhasznált eszközök és vegyszerek.....	57
4.2.2 Az elválasztás optimalálása.....	58
4.2.3 A hidridfejlesztés paramétereinek optimalálása.....	59
4.2.4 A hidridképzés határfokának vizsgálata.....	61
4.2.5 Analitikai teljesítő képesség vizsgálata.....	62
4.2.6 Valódi minták szelén speciációja HPLC-HG-AFS rendszerrel.....	64
4.2.7 Összefoglalás.....	65

4.3 Nagy hatékonyságú folyadék-kromatográfia és atomfluoreszcens spektrometria kapcsolása előzetes roncsolással kombinált hidridfejlesztéssel, HPLC-TD-UV-HG-AFS rendszer	67
4.3.1 Felhasznált vegyszerek és eszközök	67
4.3.2 Hidridképzés optimalálása	68
4.3.3 A HPLC-TD-UV-HG-AFS módszer analitikai teljesítőképességének vizsgálata ..	71
4.3.4 Brazil dió minta elemzése HPLC-TD-UV-HG-AFS rendszerrel	73
4.3.5 Összefoglalás	75
4.4 Elektrotermikus elpárologtatás és induktív csatolású plazma repülési idő tömegspektrométer kapcsolása, WETV-ICP-TOFMS.....	77
4.4.1 Felhasznált vegyszerek és eszközök	77
4.4.2 A WETV-ICP-TOFMS paramétereinek optimalálása	80
4.4.3 A WETV-ICP-TOFMS rendszer analitikai teljesítőképességének vizsgálata	85
4.4.4 Hiteles anyagminták vizsgálata WETV-ICP-TOFMS rendszerrel	87
4.4.5 Összefoglalás	90
4.5 Nagynyomású porlasztó és induktív csatolású plazma repülési idő tömegspektrométer kapcsolása flow-injection módban, FI-HHPN-ICP-TOFMS.....	91
4.5.1 Felhasznált vegyszerek és eszközök	91
4.5.2 FI-HHPN-ICP-TOFMS paramétereinek optimalálása.....	93
4.5.3 A FI-HHPN-ICP-TOFMS rendszer analitikai teljesítőképességének vizsgálata....	97
4.5.4 Hiteles anyagminták vizsgálata FI-HHPN-ICP-TOFMS rendszerrel	99
4.5.5 Összefoglalás	100
ÖSSZEFOGLALÁS.....	105
IRODALOMJEGYZÉK.....	107

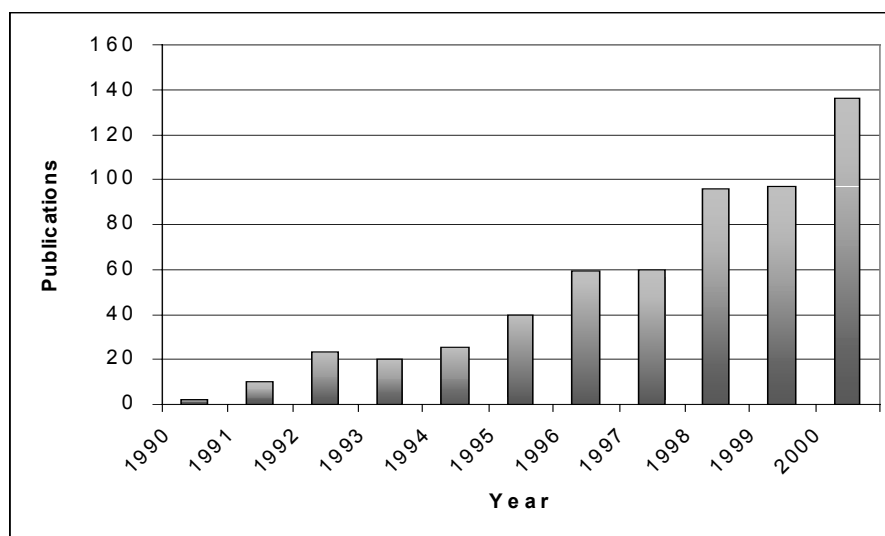
RÖVIDÍTÉSEK

AAS	Atomic Absorption Spectrometry	Atomabszorpciós spektrometria
AES	Atomic Emission Spectrometry	Atomemissziós spektrometria
AFS	Atomic Fluorescence Spectrometry	Atomfluoreszcens spektrometria
BDHL	Boosted-Discharge Hollow Cathode Lamp	Emelt feszültségű vájtkatódlámpa
CE	Capillary Electrophoresis	Kapilláris elektroforézis
CZE	Capillary Zone Electrophoresis	Kapilláris zónaelektroforézis
CRM	Certified Reference Material	Hiteles anyagminta
DIHEN	Direct Injection High Efficiency Nebulizer	Közvetlen befecskendezésű nagy hatásfokú porlasztó
DIN	Direct Injection Nebulizer	Közvetlen befecskendezésű porlasztó
ESI	Electrospray Ionization	Elektrospray ionizáció
ETV	Electrothermal Vaporization	Elektrotermikus elpárologtatás
FAAS	Flame AAS	Láng AAS
FI	Flow Injection	Áramlóoldatos injektálás
GC	Gas Chromatography	Gázkromatográfia
GFAAS	Graphite Furnace AAS	Grafitkemencés AAS
HG	Hydride Generation	Hidridfejlesztés
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfia
ICP	Inductively Coupled Plasma	Induktív csatolású plazma
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry	Induktív csatolású plazma tömegspektrometria
ICP-TOFMS	Inductively Coupled Plasma Time Of Flight Mass Spectrometry	Induktív csatolású plazma repülési idő tömegspektrometria
HHPN	Hydraulic High Pressure Nebulizer	Nagynyomású porlasztó
LA	Laser Ablation	Lézer elpárologtatás
LOD	Limit of Detection	Kimutatási határ
MCN	Microconcentric Nebulizer	Mikrokoncentrikus porlasztó
RSD	Relative Standard Deviation	Relatív szórás

1. BEVEZETÉS

1.1 A speciációs analitika definíciója és jelentősége

Az elmúlt egy-két évtized kutatási tapasztalatainak tanulsága, s ma már általánosan elfogadott tény, hogy az egyes elemek környezeti szerepe, hatása az élővilágra korántsem egyértelmű, ha csupán az adott elem összkoncentrációja alapján vonunk le következtetéseket. A nyomelemek hatása a biológiai rendszerekre nem csak a szervezetbe jutott elem mennyiségétől függ, hanem annak minőségétől is. A biológiai hatás szempontjából kulcsfontosságú lehet, hogy az adott fém milyen *oxidációs állapotban*, milyen *szerves vagy szerves komplexben*, milyen *szerves molekulához kötötten* van jelen egy adott rendszerben, mert ez nagymértékben befolyásolja az elem abszorpciójának, eloszlásának, átalakulásának, a biológiai rendszerekre gyakorolt pozitív ill. negatív hatásának és kiürülésének körülményeit. Az analitikai kémia azon új ágát, amely ennek meghatározásával foglalkozik, speciációs analitikának nevezik, mely napjaink analitikai kémiájának egyik legdinamikusabban fejlődő ága. Az elmúlt évtizedben több, mint tízszeresére nőtt az ebben a témában megjelent közlemények száma, mint azt az **1. ábra** is mutatja.



1. ábra

A speciációs analitika tárgyú tudományos cikkek számának alakulása 1990-2000 között

A tudományterület megnövekedett jelentősége a nemzetközi tudóstársadalmat is arra ösztönözte, hogy megteremtse az új tudományterület szókészletét, elősegítve ezzel a zavartalanabb információcserét. Ennek első lépése az alapfogalmak definiálása volt. A 2000. évben megjelent IUPAC közlemény szerint (TEMPLETON 2000):

„Az olyan kémiai komponenseket, amelyek izotóp eloszlásukban, szerkezetükben, oxidációs állapotukban, töltésükben, vagy komplexeik és kovalensen kötött vegyületeik tulajdonságaiban különböznek, kémiai **specieszeknek** nevezzük.”

További definíciók a fent említett IUPAC állásfoglalás szerint:

1. Kémiai speciesz: Egy elem speciális formája amelyet izotóp eloszlása, töltés eloszlása vagy oxidációs állapota és/vagy komplex vagy molekuláris állapota határoz meg.
2. Speciációs analitika: Analitikai tevékenység, melynek célja egy vagy több kémiai speciesz minőségi és/vagy mennyiségi meghatározása egy adott mintában.
3. Egy elem speciációja; speciáció: Egy elem meghatározott specieszai szerinti eloszlása egy adott rendszerben.

1.2 A speciációs analitika általam vizsgált területei, a mintabevitel problémái

A speciációs analitika fent említett szerteágazó területei közül két területtel foglalkoztam. Munkám első részében az elemek eltérő oxidációs állapotának ill. szerves molekulákhoz kapcsolt formáinak meghatározására alkalmas módszerek kidolgozása volt. Ezen munka során különböző szelén specieszek, úgymint szeleno-cisztin (SeCys₂), szeleno-metionin (SeMet), szeleno-etionin (SeEt), szelenit (SeIV) és szelenát (SeVI) meghatározására alkalmas analitikai eljárásokat fejlesztettem ki. Az analitikai rendszer minden esetben nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfia (HPLC) és atomfluoreszcens detektor (AFS) kapcsolásából állt, eltérő mintabeviteli technikákat alkalmazva. Munkám második részében az elemek izotóp eloszlásának meghatározására is alkalmas analitikai módszerek kidolgozása koncentráltam. Ez esetben induktív csatolású plazma repülési idő tömegspektrométert (ICP-TOFMS) használtam detektorként.

Az atom- ill. tömegspektrometriai detektálás Achilles-sarka az adott módszer érzékenysége szempontjából a mintabevitel. Az általánosan használt porlasztók - pl. Meinhard-, Babington-porlasztó - mintabeviteli hatásfoka ugyanis nem haladja meg a 2-3%-ot. Ez a tény, mivel a meghatározandó komponensek koncentrációja általánosan a µg-ng/g, esetenként a pg/g tartományban mozog, jelentősen behatárolja az analitikusok mozgásterét, nem ritkán dúsítási lépéseket tesz szükségessé.

A spektrometriai nyomelem analízis egy másik nagy problémája, hogy hagyományos mintabeviteli technikát alkalmazva (folyadék halmazállapotú mintából pneumatikus porlasztással) a meghatározandó komponenssel együtt a mintamátrix zavaró komponensei is bekerülnek a detektorba, zavarva ezzel az elemzendő alkotó meghatározását.

1.3 Célkitűzés

A fenti problémával szembesülve próbáltam meg doktori munkám során olyan mintabeviteli eljárásokat kidolgozni, amelyek mind az alkalmazott elválasztás-technika, mind a detektálás által támasztott követelményeknek megfelelnek, és mintabeviteli hatásfokuk jóval meghaladja a konvencionálisan használt porlasztókét, valamint szelektívek a meghatározandó alkotóra, így javítva az alkalmazott detektorok kimutatási határát.

A mintabeviteli módszerekkel szemben az alábbi elvárásokat támasztottam:

- A módszer nagy hatékonysággal juttassa a mintát a detektorba, javítva ezzel az analitikai eljárás kimutatási határát, és érzékenységét.
- Lehetőség szerint a mintabevitel szelektív legyen, a mérendő komponens(ek) ezáltal elválasztható(ak) legyen(ek) a minta mátrixától, kiküszöbölve az esetleges zavaró hatásokat.
- Egyszerűen kapcsolható legyen valamely elválasztás-technikai módszerhez, így módon speciációs analitikai feladatokra használható legyen.
- A kialakított rendszer rendelkezzen valódi minták speciációs analíziséhez szükséges analitikai jellemzőkkel (kimutatási határ, linearitás, ismételhetség stb.)
- Alkalmas legyen több komponens egyidejű elemzésére, ezzel csökkentve a meghatározás költségét, időigényét, növelve az elemzés által szolgáltatott információt.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A speciációs analitika irodalmának áttekintésekor a fentebb már hivatkozott IUPAC közlemény (TEMPLETON 2000) tematikáját követem. Az általam is vizsgált speciációs módszerek – tehát az elemek oxidációs állapota, szerves molekulákhoz kapcsolt formái és izotóp eloszlása meghatározásának – irodalmát részletesebben tárgyalom, mint az egyéb módszereket.

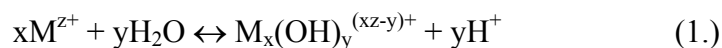
2.1 Szervetlen komponensek és komplexek

Egy elem szervetlen komponenseinek eloszlása egy rendszerben az adott forma töltésétől, oldhatóságától, diffúziós együtthatójától függ. Ezek a tulajdonságok szabják meg a speciesz felvehetőségét, részvételét a transzport folyamatokban.

A szervetlen speciációs analitika jelentőségét a Ni speciáció példája jól mutatja. A nikkel-klorid, nikkel-szulfát sók vízoldhatók, és kis toxicitásúak, míg a nikkel-oxidok és -szulfidok vízben oldhatatlanok, de szerves ligandumokként felvehetők a szervezet számára. A trinikkeldiszulfidot pl. az állati szervezet számára lehetséges rákkeltő vegyületként tartják számon. Számos publikáció foglalkozik Ni_3S_2 , NiO, NiSO_4 , NiCl_2 , NiCO_3 meghatározásával (IARC 1990, HERTEL 1991), ill. a Ni specieszek topokémiai, morfológiai leírásával (ORTNERH 1998, BUFFLE 1993).

Egy másik példa a szervetlen komplexek speciációjának fontosságára: Angliában és Norvégiában figyelték meg kutatók, hogy kétféle víz, egy savas, amely instabil monomer alumíniumot tartalmazott és egy bázikus keveredésekor a keveredési zónában a kialakuló polimer alumínium- hidroxó komplexek miatt a víz a halakra igen toxikus volt (ROSSELAND 1992, VERBOST 1995).

Szervetlen ionok speciációjához számos analitikai módszer használatos; a hidrolizált fémionok közvetlen meghatározásához optikai vagy mágneses spektroszkópiát használnak, bár az esetek nagy részében a hidrolízis termékek bonyolultsága nem teszi lehetővé az egyszerű meghatározást. Ilyenkor általánosan használt módszer a pH potenciometrikus meghatározása, és az 1. egyenlet alapján a termékek sztöchiometriájának megállapítása.



A polimer komplexek meghatározására még különböző kiegészítő módszerek alkalmazhatók, úgymint oldhatóság mérés, ultracentrifugálás, fényszóródás vizsgálat (KRIEGER 1986).

2.2 Fém-organikus komplexek

A komplexképződési reakciók során a szerves ligandumokkal képezett koordinációs komplexek eltérő termodinamikai stabilitással rendelkeznek, amely meghatározza reaktivitásukat. Egy speciesz komplexbeli eloszlása több paraméter, pl. a koncentráció, pH, ionerősség függvénye (RINGBOM 1963).

Amíg egyes komplexek instabilak az analízis során, addig számos szerves-fém kelát-komplex (pl. ferroxiamin) változatos körülmények között is stabil. A szerves komplexképződési adatokat általában kétdimenziós ábrán ábrázolják. A rendszer pH-ját általában savval vagy bázissal történő titrálás mellett potenciometrikusan mérik, a vizsgálatot különböző fém és szerves ligandum arányokkal végzik el, így állapítják meg a rendszer stabilitási állandóját. Ily módon ábrázolhatóvá válik a speciesz eloszlás a pH és az összetétel függvényében. Ezzel a módszerrel a speciesz eloszlás megállapítható a fémkomponens elválasztása nélkül pusztán a pH, az adott fém összkoncentrációja és a ligandum összetétel ismeretében. A potenciometrikus titrálást igen elterjedten használják az elemzendő fém-komplex stabilitási állandójának kiméréséhez (MARTELL 1992).

2.3 Makromolekulák speciációja

A speciáció ezen területe foglalkozik a legnagyobb szerkezetű specieszek meghatározásával. Az esetek többségében fehérjékhez kapcsolódó nyomelemek meghatározása a cél pl. Cd metallothioneinben, vas hemoglobinban (POLEC 2000, STUHNE-SEKALEC 1992).

A makromolekuláris speciációhoz csakúgy, mint a később ismertetésre kerülő fémorganikus vegyületek és oxidációs állapot speciációjához jellemzően kapcsolt rendszereket alkalmaznak, amely valamely elválasztás-technika, általában nagy hatékonyságú folyadék-kromatográfia (HPLC), gázkromatográfia (GC), kapilláris elektroforézis (CE) és elemspecifikus detektálás (jellemzően AAS, AFS, ICP-OES, ICP-MS) kapcsolásaként jön létre. Az alkalmazott módszereket a **2. ábra** részletesen mutatja.

A biológiai rendszerekben jelenlévő makromolekulák sokszínűsége miatt egy elválasztási technika alkalmazása a speciáció ezen területén általában nem ad kielégítő eredményt, az egyes specieszek nem különíthetők el egymástól kellőképpen. Ezért előzetes méret szerinti elkülönítést szoktak alkalmazni, jellemzően méretkizárásos kromatográfiát, amellyel a 100 kDa feletti molekulatömegű biomolekulák elválasztása megoldható. Ezután az egyes

frakciókat a **2. ábrán** látható elválasztás-technikák valamelyikével, általában anion-, kationcserével, fordított fázisú kromatográfiával (RP-HPLC) vagy kapilláris zóna elektroforézissel elemzik (CZE) tovább. Ilyen eljárást alkalmaztak többek között metalloproteinekhez kötött fémek vizsgálatára agyban (PRANGE 2001), patkány szövetben (POLEC 2002), szelén speciációra anyatejben (MICHALKE 1997), élesztőben (McSHEEY 2001), valamint arzén speciációra algákban (McSHEEY 2000).



2. ábra

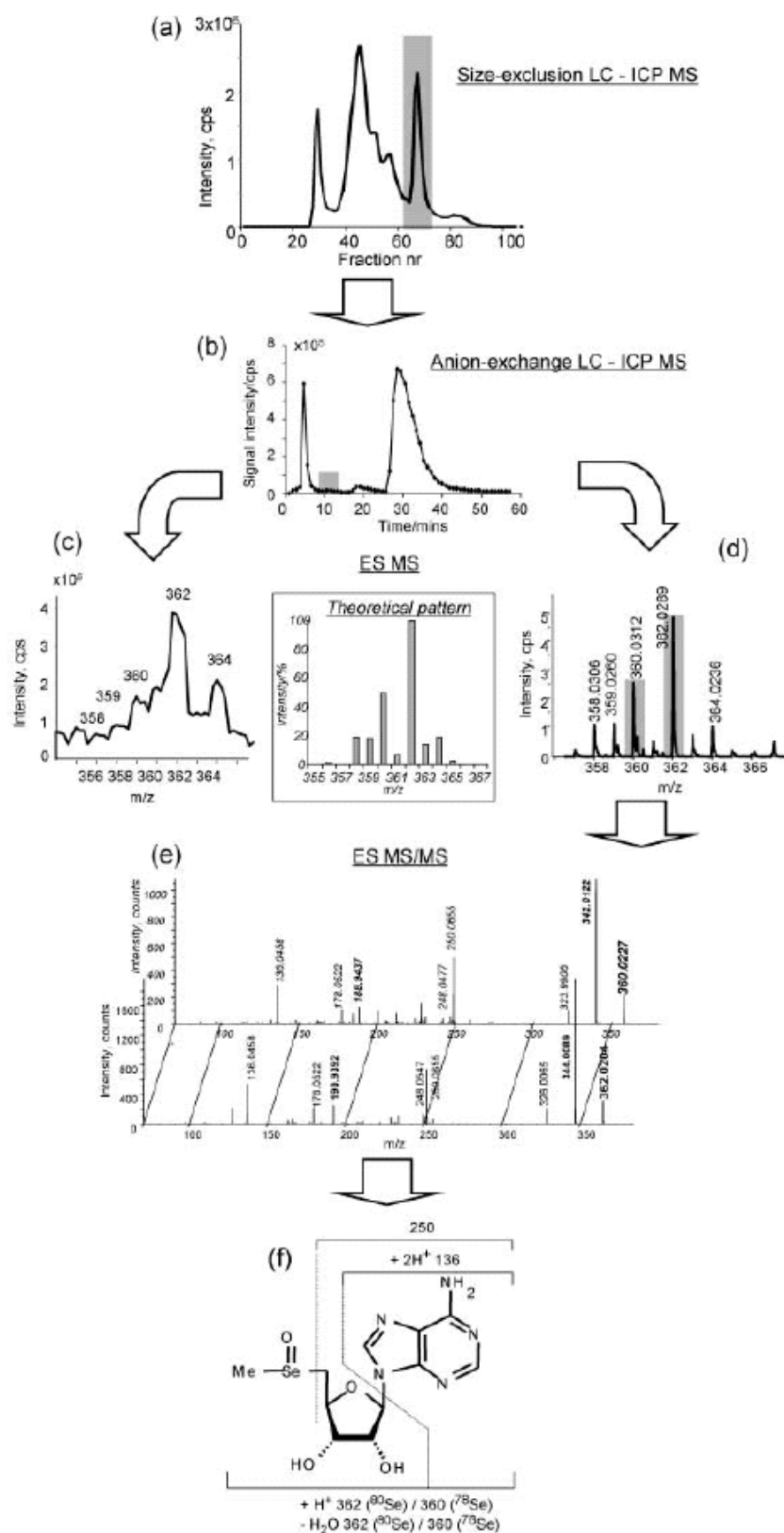
Kapcsolt rendszerek felépítésére leggyakrabban alkalmazott analitikai technikák

Mivel biológiai rendszerekben a nyomelemek koncentrációja nem ritkán a ng/g tartomány alsó részében található, a nagy érzékenységű ICP-MS technika a legelterjedtebben használt detektálási módszer a biomolekulák speciációjára. A folyadék halmazállapotú mintabevitel egyszerű kapcsolhatósága miatt általában HPLC vagy CE elválasztással kombináltan használják (MICHALKE 1999a).

Makromolekulák speciációjához nem állnak rendelkezésre hiteles anyagminták, amelyekkel az egyes specieszek azonosítása lehetővé válna. Ezért speciálisan ezen a területen szerkezetvizsgálatra alkalmas detektorokat is alkalmaznak (pl. ESI-MS, MALDI-MS). A

szerkezet analízishez további kémiai eljárásokra lehet szükség, pl. elválasztás utáni savkezelés (post-column acidification) a bioligandumok disszociálására, vagy enzimes bontás az MS vizsgálat előtt.

Az alábbiakban egy többdimenziós eljárást ismertetek, amelyet élesztő extraktum szelénkomponenseinek speciációjára dolgoztak ki, de főbb lépései általánosságban jellemzőek a biomolekulák speciációjára, és mutatják a speciáció ezen területének problémáit, ill. ezek leküzdésének lehetőségeit (McSHEEY 2002a, 2002b).



3. ábra

Makromolekulához kapcsolódó szelén specieszek meghatározása szerves és szervetlen tömegspektrometriai módszerek alkalmazásával (McSHEEY nyomán)

Az eljárás első lépése a méretkizárásos kromatográfia, amely 3-6 frakcióra különíti méret szerint az élesztő extraktumot (**3a. ábra**). A detektálás ezen elválasztási lépésnél ICP-MS. Mindegyik frakciót anion cserés kromatográfiával elemzik (**3b. ábra**) majd, mivel a kationok és töltés nélküli komponensek a holtterfogóban eluálódnak, kationcserés HPLC elválasztás következik. Az így kapott frakciókat ESI-MS technikával elemzik quadrupól (**3c. ábra**) és repülési idő (time of flight, TOF) (**3d. ábra**) tömeganalizátorral. Ez a bonyolult szeparációs eljárás nem csak az egyes specieszek elkülönítése miatt szükséges, hanem az ESI-MS vizsgálatnál zavaró mátrix komponensek eltávolítása végett is.

A szelén jellemző izotóp eloszlása lehetővé teszi az egyes szelén specieszek felismerését a szerves tömegspektrumon. Bár a quadrupól tömeganalizátor érzékenysége gyakran nem teszi lehetővé a specieszek detektálását, és a meghatározott komponensek esetében sem mindig kielégítő az analízis megbízhatósága. Ezért ajánlott az ESI-TOFMS alkalmazása, mely technika érzékenysége és felbontása is meghaladja a quadrupól MS-ét, így a szelén specieszek meghatározása jóval nagyobb biztonsággal végezhető el. Az így kapott eredmények alapján felállítható egy hipotézis az ismeretlen szelén speciesz szerkezetéről. A feltételezés alátámasztására tandem tömegspektrométer vizsgálat használható, amelyben a CID (collision induced dissociation) technikával előállított, protonálódott molekulaionokat vizsgálják. A molekulaionok fragmentálódása során a két legnagyobb intenzitású szelén izotóp aránya nem változik (^{78}Se , ^{80}Se). Ez megkönnyíti a CID tömegspektrum kiértékelésekor a szelént tartalmazó és nem tartalmazó csúcsok megkülönböztetését. Az első esetben ugyanis a két tömegspektrum között két tömegegységnyi eltérés van, míg a második esetben az egymás után kapcsolt tömegspektrométerek spektrumai megegyeznek. A **3e.** ábrán egy újonnan felfedezett szelenovegyület CID spektruma látható, melynek ^{80}Se izotópot tartalmazó molekulatömege 362, 0289 és szerkezeti képletét a **3f.** ábra mutatja.

A biomolekulák speciációjában gél elektroforézis (GE) elválasztás-technika alkalmazására is akad példa, ez esetben szilárd mintabeviteli technikák, lézer vagy elektrotermikus elpárologtatás (LA vagy ETV) segítségével valósítják meg a kapcsolást, a detektálás itt is ICP-MS (MARSHALL. 2002, CHERY 2002). Ez esetben a gél elektroforézisnek, mint a protein-vizsgálatok egyik legelterjedtebb elválasztás-technikájának, azt a lehetőségét használják ki, hogy igen nagy szelektivitású elválasztásra nyílik mód a két dimenziós elektroforézis alkalmazásával. A módszer hátránya a mennyiségi meghatározás nehézkessége, melyre McLEOD kutatócsoportjában kidolgozott módszer nyújthat megoldást (NEILSEN 1998). Eszerint az elemzendő fémeket ismert mennyiségben egyenletesen eloszlatják az elektroforézis gélben, ily módon a gélt egyben külső kalibrációs standardként is használják.

A speciációs analitika fent ismertetett területének fejlődése az egyes specieszek bioszintézis folyamatainak feltárása irányába mutat. Ezen kutatások egyik legfontosabb ága a hiperakkumulatív növények stresszhelyzetekben történő reagálásának pl. metallothioneinek, fitokelatinok szintézis folyamatainak megértése. A speciációs analitika és molekuláris biológia szoros együttműködésével az egyes specieszek bioszintéziséért felelős gén definiálható a növényben, és klónozással egyszerűbb szervezetbe (pl. baktériumba vagy élesztőbe) transzportálható. A speciációs analitikai technikákkal ellenőrizhető, hogy az adott genetikailag módosított szervezet stresszhatásnak kitéve ugyanazt a specieszt termeli-e, mint a kiindulási növény. Ilyen technikákkal a biológiai lebontási folyamatok egyszerűsíthetőek, ami nem elhanyagolható környezetvédelmi jelentőséggel bír (SZPUNAR 2002).

2.4 Speciáció oxidációs állapot szerint illetve kismolekulájú fémorganikus vegyületekben

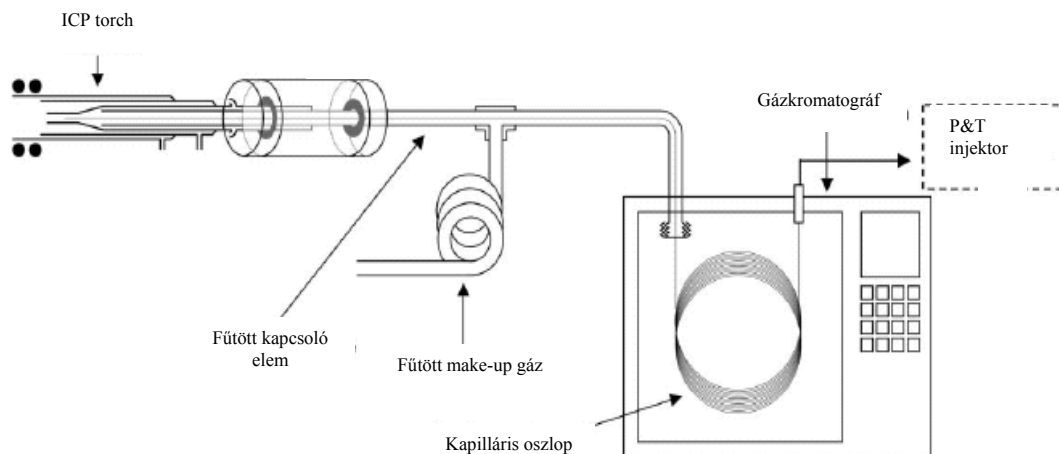
A speciáció ezen két válfaját egy alfejezetben tárgyalom, melynek több oka van. Egyrészt a két speciációs irányvonal műszerezettségé szinte teljesen megegyezik. Másrészt a speciációs vizsgálatok érdeklődésének középpontjában álló nyomelemek nagy részénél a két vizsgálati módszer nem választható szét egymástól, mint ezt az alábbiakban is látni fogjuk, sokszor ténylegesen egy vizsgálaton belül határozzák meg az eltérő oxidációs állapotú ill. kismolekulájú szerves vegyületekhez kötött specieszeket. Harmadrészt doktori munkám egy jelentős része e két technikára együtt koncentrált, ezért célszerűnek tartom ezen technikák irodalmát is együtt tárgyalni.

A terület általánosan használt műszerei kereskedelmi forgalomban egyelőre nem kaphatók, a kutatólaborokban felépített, fentebb már említett ún. kapcsolt rendszerek, amelyek általában HPLC, GC vagy CE és egy szelektív detektálás, jellemzően AAS, AFS, ICP-OES, ICP-MS kapcsolásaként jönnek létre. Az általánosan alkalmazott analitikai módszerek áttekintését, és a lehetséges kapcsolásokat a **2. ábra mutatja**.

2.4.1 Illékony specieszek elválasztása gázkromatográfiával

Az alkalmazott elválasztási módszert a mérendő komponensek töltése, polaritása, hőstabilitása, illékonyága határozza meg. Hőstabil, könnyen illó specieszek elválasztására jellemzően GC technikát használnak atomemissziós ill. ICP-MS detektorral kombinálva. A GC-ICP-MS csatolás viszonylag könnyen megvalósítható, egyik sarkalatos kérdése azonban a kicsapódás megakadályozása az interfészben, ami a GC-ben használatos magas hőmérséklet és az ICP torch bevezető szakaszának alacsony hőmérséklete miatt következhet be. Ezt a

problémát fűhető interfésszel ill. a make-up gáz előzetes felmelegítésével szokták áthidalni, mint azt a **4. ábra** is mutatja (LEENAERS 2002, ABALOS 1997).



4. ábra

ICP-MS kapcsolása gázkromatográfhoz (LEENAERS nyomán)

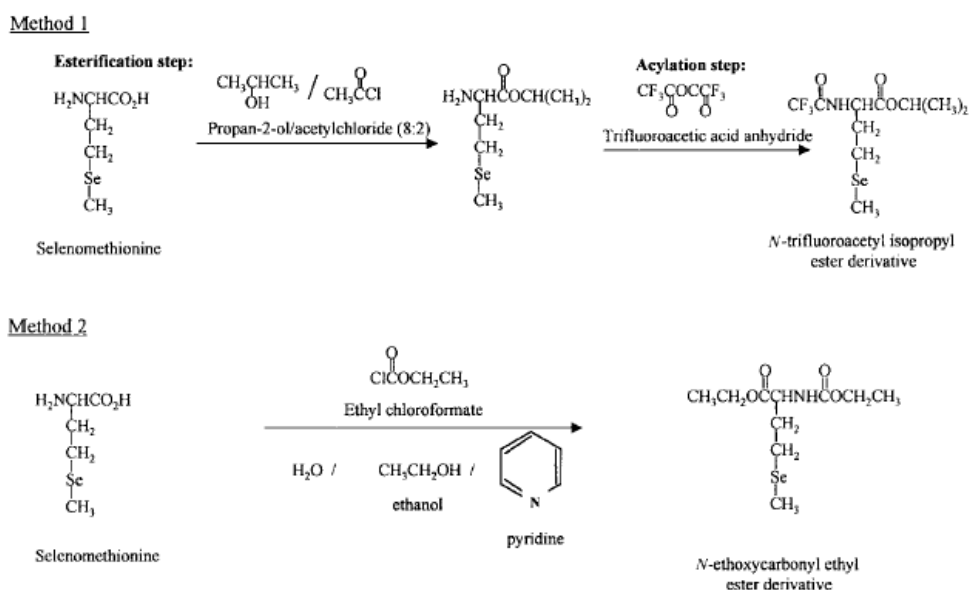
A gázkromatográfia speciációs analitikai alkalmazásai közül leggyakoribb a különböző szerves ón- (dibutil-ón DBT, tributil-ón TBT, difenil-ón DPT) és higany (metil-higany MeHg, dimetil-higany Me₂Hg) specieszek meghatározása. Még a nagy illékonyaságú ón specieszek meghatározásához is bonyolult extrakcióra és derivatizációs eljárásokra van szükség. Godoi és munkatársai (2002) által leírt módszert ón speciációra alkalmazták tengeri üledék mintából. A mintát először toluol és ecetsav elegyével extrahálják, majd az extrakciós hatásfok növelése érdekében ammónium-pirrolidin-ditiokarbamátot adnak hozzá. Ezután egy éjszakán át, 120 °C-on állni hagyják a derivatizációs reagenssel, ami pentil-magnézium-bromid. A mérést csak másnap lehet elvégezni. Ez a példa is mutatja, hogy bár a GC technika egyszerűen kapcsolható spektrometriai detektorokhoz, gázkromatográfia esetén a speciáció elvégzése igen komplikált, időigényes mérés.

2.4.2 Derivatizációs és nagy hatékonyságú mintabeviteli módszerek nem illékony specieszek elválasztására gázkromatográfiával

Nem illékony specieszek is meghatározhatók gázkromatográfiával, ebben az esetben az elválasztás előtt, olyan derivatizációs lépésre van szükség, amely illékonyá teszi a meghatározandó specieszeket. Hidridképző elemek pl. arzén speciációja esetén ilyen lépés lehet a hidridképzés, amely során a nem illékony arzenátból (AsV), arzenitből (AsIII), és metilezett arzén specieszekből GC-vel elemezhető arzén-hidridek, ill. arzén-kloridok

keletkeznek (MESTER 2001). A módszert „purge and trap” technikával (PT), illetve alacsony hőmérsékletű gázkromatográfiával (LT-GC) kombinálva sikeresen alkalmazták talaj és szennyvíziszap légtérben elvégzett arzén speciációra (WICKENHEISER 1998, PROHASKA 1999).

A hidridfejlesztés önmagában is nagy hatékonyságú mintabeviteli módszer, de dúsítási lépéssel kombinálva a módszer érzékenysége még tovább javítható. Ilyen dúsítást tesz lehetővé a szilárd fázisú mikroextrakció (SPME), melyet GC-vel kombinálva Mester és munkatársai (2000) alkalmaztak arzén speciációra vizeletben.



5. ábra

Nem illékony szelén specieszek derivatizációja GC méréshez

Peláez és munkatársai (2000) szeleno-metionin meghatározására két derivatizációs eljárást is kifejlesztettek. Az egyik módszer két lépésben, egy észterezési és egy acilezési reakción keresztül N-trifluoracetil-izopropilészter származékot állít elő, amely diklór-metánba extrahálva GC-vel elemezhető. A másik módszer egy lépésben etil-kloroform reagenssel, piridin és etanol jelenlétében N-etoxikarbonil-etilésztert állít elő szeleno-metioninból (5. ábra).

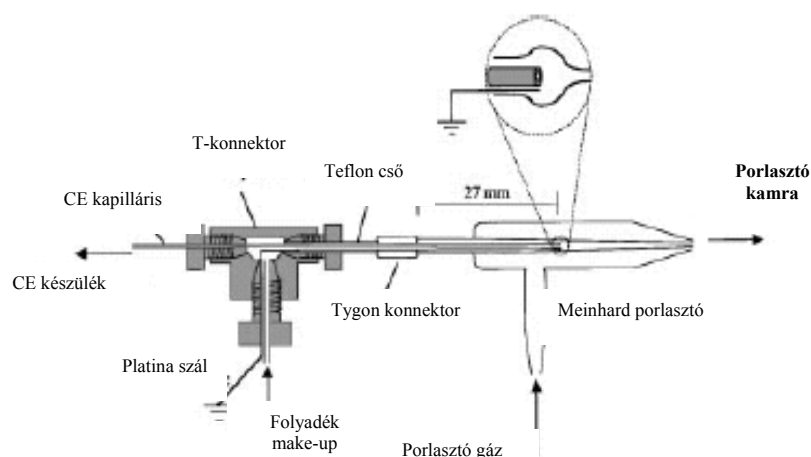
A módszerrel szelén tartalmú élelmi kiegészítők vizsgálatát is elvégezték, kielégítő eredményeket kapva mind érzékenység, mind megbízhatóság tekintetében.

A gázkromatográfiás technikák érzékenysége, szelektivitása alkalmassá teszi az eljárást speciációs analízisre, de a sokszor igen bonyolult minta-előkészítés, és derivatizáció a módszer komoly hátrányát jelenti.

2.4.3 Elektroforetikus módszerek a speciációs analitikában

Gázkromatográffal el nem választható specieszek esetén leggyakrabban elektroforetikus elválasztás ill. HPLC használatos. Speciációs analitikában az elektroforetikus elválasztások közül kapilláris elektroforézist, kapilláris zóna elektroforézist ill. izoelektromos fókuszálást használnak (PRANGE 1999, POLEC 2001, MICHALKE 1998). A kapilláris elektroforézis technikák előnye, hogy kis mintaigényűek és komplex mátrixok is csak kis mértékben zavarják az elválasztást (WESTERGAARD 1998).

A CE csatolása ICP-MS detektorhoz igen bonyolult feladat, hiszen nem csak két egymástól nagyságrendekkel eltérő áramlási sebességet igénylő analitikai technikát kell egymáshoz illeszteni, hanem a csatoló elemnek biztosítani kell a feszültségkülönbséget az elválasztás folyamán. Több kutatócsoport is foglalkozott a probléma megoldásával, számos egymástól csak részleteiben eltérő interfészt kifejlesztve. A **6. ábrán** egy Costa-Fernandez és munkatársai (2000) által fejlesztett csatoló elemet látni, mely főbb megoldásaiban jellemző a mások által publikált interfészekre.



6.ábra

CE-ICP-MS interfész sematikus felépítése (COSTA-FERNANDEZ nyomán)

A csatoláshoz egy általánosan alkalmazott Meinhard porlasztót használtak, melyet egy T-csatlakozóval kapcsolnak a CE rendszer kapillárisához. Az elektromos áram folyamatosságát az elválasztás során és a CE-ICP-MS interfészben a T-csatlakozón keresztül bevezetett platina szál biztosítja. A Meinhard porlasztó ml/perc nagyságrendű folyadékáramot igényel, míg a kapilláris elektroforézis elválasztásra nl/perc térfogatáram jellemző. Ezért szükséges ún „make-up” folyadékáram alkalmazása, amely áthidalja a két rendszer közti folyadékáram

eltérést, és a Meinhard porlasztó által kívánatos mennyiségre növeli az áramlási sebességet. A kapcsoló elem legfontosabb paraméterei, melyeket minden esetben optimalni kell: a make-up folyadék áramlási sebessége, a kapilláris helyzete a porlasztóban, a porlasztó gázáram. A fent ismertetett Meinhard típusú porlasztón kívül kis térfogatáram igényű porlasztókat is használnak, mivel ez esetben a minta kisebb mértékben hígul az alacsonyabb make-up áram miatt. Ilyen például a közvetlen befecskendezésű nagy hatékonyságú porlasztó (DIHEN) (BENDAHL 2001) ill. mikrokoncentrikus porlasztó (MCN) (SCHAUMLÖFFEL 1999).

A CE technikákat leginkább ICP-MS detektorokkal használják. Az így fejlesztett műszeregyüttesel számos nyomelem pl. arzén, cink, króm, szelén speciációját végezték el (VAN HOLDERBEKE 1998, SEMENOVA 1995, STEWART 2000, LUSTIG 1998).

A mátrixok széles spektrumát átfogó vizsgálatokat találhatunk az irodalomban kezdve az ivóvíztől, a geotermikus vizeken keresztül, az anyatején át, a baktérium szuszpenzióig bezárólag (CASIOT 1998, POTIN-GAUTIER 1996, MICHALKE 1995, WALKER 1996).

Bár, mint a fentiekből is látszik, a CE technika ICP-MS-sel kombinálva elterjedten használatos speciációs feladatokra, és kétségkívül sok előnye van az alkalmazásának, mint például az igen kis mintaigény vagy a gyors elválasztás, a technika egyik legnagyobb hátrányát éppen az alacsony folyadék-térfogatáram jelenti. Az összes eddig kifejlesztett csatoló elemnél szükség van make-up folyadékáramra, és így a minta igen nagy mértékben felhígul, ami a módszer érzékenységét jelentősen rontja. Ezért nem lehet teljes mértékben kihasználni az ICP-MS detektor egyébként nagyszerű kimutatási határát, ami valódi minták egy részénél akár a vizsgált nyomelem speciációját is lehetetlenné teheti (MICHALKE 1999b).

2.4.4 Elválasztás folyadék-kromatográfiával, ICP-MS detektálással

Kevésbé illékony specieszek elválasztásához és meghatározásához a CE módszer mellett a HPLC technika a másik elterjedt elválasztás-technika, melynél a csatolás nem jár annyi gonddal, mint a fent tárgyalt esetben, mivel a HPLC-nél alkalmazott áramlási sebesség azonos nagyságrendbe esik, mint az atomspektrometriában szokásosan használt porlasztóké. Leggyakrabban Meinhard- vagy szögporlasztókkal valósítják meg a csatolást az elválasztástechnika és az ICP-MS között (TERÄSAHDE 1996, DAY 2002, LONDESBOROUGH 1999).

Mivel az általánosan használt porlasztók mintabeviteli hatásfoka 1-2% körüli, számos kísérlet történt nagy hatékonyságú porlasztók speciációs analitikában történő alkalmazására, így javítandó a kapcsolt rendszerek kimutatási határát. HYMER C.B. és munkatársai (1998) három porlasztót hasonlítottak össze monometil- és dimetil-arzénos sav, arzenobetén és

arzenokolin speciációs elemzésében, HPLC elválasztással és ICP-MS detektálással. A három porlasztót: a nagy hatékonyságú Meinhard porlasztót (Meinhard high-efficiency nebulizer, HEN), koncentrikus porlasztót, és oszcillációs kapilláris porlasztót (oscillating capillary nebulizer, OCN) elválasztás-technikai és detektálási jellemzők alapján hasonlították össze. Míg a csúcsszimmetria és elméleti tényérszám szempontjából nem mutatkozott különbség az egyes porlasztók között, addig a legnagyobb bizonytalansága a HEN-nek volt (10 % körüli) ezt követte az OCN (~8%) majd a koncentrikus porlasztó (~4%). A kimutatási határok esetében az OCN két nagyságrenddel rosszabb értéket ért el (160-360 ng/ml), mint a másik két, a vizsgálatban használt porlasztó.

Egy másik munkában élelmi kiegészítők szelén speciációjára alkalmaztak különböző porlasztási módszereket, úgymint Meinhard porlasztót, nagynyomású porlasztót (HHPN) és mikrokoncentrikus porlasztót (MCN), és eltérő elválasztási eljárásokat (ioncsere és ionpár kromatográfia). A porlasztókat kimutatási határ és érzékenység tekintetében hasonlították össze. A legnagyobb érzékenységgel a mikrokoncentrikus porlasztó rendelkezett, de a legjobb kimutatási határt a HHPN mutatta (38-90 pg/ml, ⁸⁰Se izotóp esetén) amit az MCN nagyobb háttér értékével lehet magyarázni. A szórás egyik porlasztó esetén sem haladta meg az 5%-ot (MARCHANTE-GAYON 2000).

Elválasztás-technikai szempontból a két leggyakrabban használt módszer az ioncsere és a fordított fázisú ionpár kromatográfia, mint az a következő példákban is látható. Mindkét esetben előnyben részesítik az analitikusok az illékony puffereket, így csökkentve az ICP-MS mintavevő kónuszain lerakódó szennyeződés mértékét, amely jelentős háttér növekedést okozhat.

2.4.5 Néhány példa HPLC-ICP-MS alkalmazására

A HPLC módszereket ICP-MS detektálással porlasztásos mintabevitellel elterjedten alkalmazzák speciációs analízisben gyakorlatilag minden mintafajtánál. A következőkben néhány toxikológiai, környezetvédelmi vagy gyógyászati szempontból fontos nyomelem speciációját mutatom be röviden.

A króm toxikológiai és környezetvédelmi szempontból is igen fontos, hiszen CrIII formában esszenciális a glükóz metabolizmusban, míg a CrVI karcinogén és genotoxikus tulajdonságokat mutat. A legnagyobb króm kibocsátó az acélipar, mivel a krómot a rozsdamentes acélgyártáshoz ötvöző anyagként használják (ABOUL DAHAB 1997, EISLER 1986). Számos publikáció jelent meg a króm speciáció terén jellemzően vízminták elemzéséről, ioncserés elválasztást alkalmazva ICP-AES vagy ICP-MS detektálással (PANTSAR 1996, SAVERWYNS 1999, POSTA 1996, FODOR 1995).

Biológiai minták speciációjánál egyik legintenzívebben kutatott nyomelem a platina. Napjainkban a platina alapú gyógyszerek (pl. ciszplatin tartalmú készítmények) igen elterjedten használatosak különböző szervek, úgy mint tüdő, here, petefészek antineoplasztikus kemoterápiájában. A növekvő felhasználással szoros összefüggésben a környezetben is jelentősen megnőtt ezen vegyületek mennyisége, jellemzően a kórházak szennyvizében, ugyanis a kezelt betegek a kapott platina komplexek 50–70 %-át a vizelettel kiürítik. Az aktív komponensek és metabolitjaik, melyek többnyire hidrolizált formában vannak jelen, átjuthatnak a szennyvíztisztító berendezéseken és felhalmozódhatnak növényekben és a talajvízben is. Platina speciációra ion-pár kromatográfia ICP-MS detektálással a legelterjedtebb módszer (HANN 2001, BAREFOOT 2001, HEUDI 1998).

Környezetvédelmi és táplálkozás tudományi szempontból a két „legnépszerűbb” mikroelem az arzén és a szelén. Mindkettőről elmondható, hogy szerves formái jóval toxikusabbak, mint metilezett vagy szerves kötésben megtalálható specieszei. Mindkét nyomelem speciációja megoldható HPLC-ICP-MS csatolt rendszerrel. Ivóvízben, talajvízben szerves arzén és szelén specieszek találhatók, ilyenkor ioncserés kromatográfia a leggyakrabban használt elválasztás-technika (DAY 2002, ALFTHAN 1995). Élelmiszerekben, vizeletben már nem csak szerves specieszek találhatók, ezért ezen minták analízisének már a fordított fázisú és ionpár kromatográfia is fontos szerepet játszik, hiszen a metilezett vagy aminosavakhoz kapcsolódó specieszek e módszerekkel jobban elválaszthatóak (KOTREBAI 1999, TUKAI 2002).

2.4.6 Hidridfejlesztés a speciációs analitikában

Napjainkban a szelén és arzén speciáció egy jelentős részénél nem ICP-MS detektorokat használnak, hanem a kutatók megpróbálnak egyszerűbb detektorokkal, nagy hatékonyságú mintabeviteli módszerek alkalmazásával valódi minták elemzésére is megfelelő rendszereket építeni. Ennek több mozgató rugója van: Egyrészt az ICP-MS meglehetősen nagy bekerülési költségű műszer, ezenkívül az üzemben tartás és a rendszeres karbantartás is jelentős kiadással jár. Sok laboratórium nincs abban a helyzetben, hogy ezeket a költségeket vállalni tudja. Ráadásul az ICP-MS technika alkalmazásával számos új zavaró hatás léphet fel, melyek más technikát nem terhelnek, pl. dimer ionok ($^{75}\text{ArCl}^+$), plazmát alkotó gázok ionjai ($^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$), mátrix ionok ($^{56}\text{ArO}^+$) által okozott interferenciák (EVANS 1993). Ezért ezen módszerfejlesztéseknél a kutató laborok legnagyobb számban AAS és AFS detektálást használnak, jellemzően hidrid fejlesztéssel kombinálva.

A hidridfejlesztés ideális mintabeviteli technika, hiszen hatásfoka jóval meghaladja a hagyományos porlasztókét, és a mintamátrix sem jut a detektorba, így a lehetséges zavaró

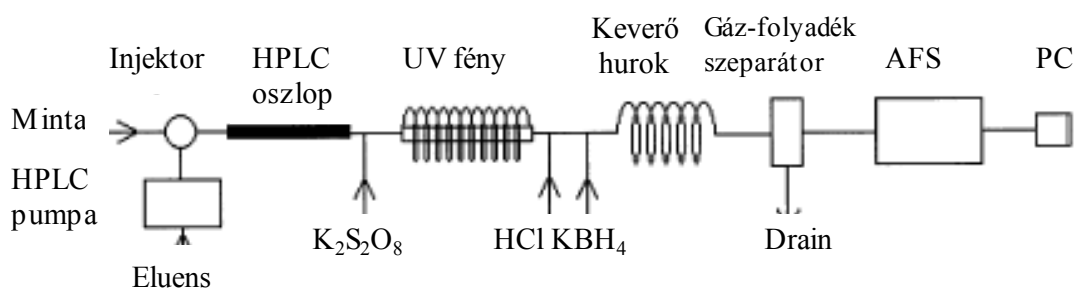
hatások egy részét ki lehet küszöbölni. A nagy mintabeviteli határfok biztosítja, hogy az ICP-MS-nél rosszabb érzékenységű AAS, AFS detektorok is alkalmasak legyenek valódi minták speciációjára (ŠLEJKOVEC 2000, STUMMEYER 1996).

Doktori iskolánkban, a Szent István Egyetem Alkalmazott Kémia Tanszékén is évek óta folynak kutatások a fent említett témakörben. Ezek eredményeképpen számos publikáció jelent a hidridfejlesztés speciációs analitikában történő alkalmazásáról, elsősorban arzén specieszek analizésére koncentrálva. Valamint két PhD értekezés témája is az AFS technika speciációs analitikai alkalmazási lehetősége volt (WOLLER 1998, MESTER 1999).

2.4.7 Hidridfejlesztés előzetes roncsoló lépéssel kombinálva

Mivel egyes arzén és szelén specieszek nem, vagy csak kis mértékben képeznek hidridet, ezen specieszek meghatározásához előzetes roncsoló lépésre van szükség. Ilyen specieszek többek között a főleg tengeri élőlényekben előforduló arsenobetén (AsB) arsenokolin (AsC), ill. a kén helyén szelént tartalmazó aminosavak: szeleno-metionin (SeMet), szeleno-cisztin (SeCys₂), szeleno-etionin (SeEt) valamint a szelenát.

Arzén speciációnál az elválasztást követően oxidáló reagens (jellemzően K₂S₂O₈) hozzáadása utáni ultraibolya fényrel való besugárzást alkalmaznak (WEI 2001, SÚŇNER 2000). A módszer jellemző kísérleti elrendezését az **7. ábra** mutatja.



7. ábra

HPLC-UV-HG-AFS rendszer felépítése (WEI nyomán)

A kálium-peroxodiszulfátot közvetlenül a HPLC-oszlop után keverik hozzá a mintához, majd egy alacsony teljesítményű UV lámpa (8 W, 254 nm) körül UV-áteresztő vezetékben spirálisan vezetik a mintát. A hidridképzéshez szükséges reagenseket, a savas közeget

biztosító sósavat, és a kálium-borohidridet csak ez után adagolják a mintához. Ezt követi egy keverő kamra és az AFS detektor előtt a gáz-folyadék szeparátor.

Az arzén speciációhoz hasonlóan, szelén speciáció esetén is használatos roncsoló lépés a hidridfejlesztés előtt. A rendszer felépítése hasonló az **7. ábrán** bemutatotthoz. Különbség a melegítésben mutatkozik, szelén speciációhoz ugyanis nagyobb hőfokú mikrohullámú melegítést használnak HBr és KBrO₃ (GONZÁLEZ LAFUENTE 1996) ill. a fentebb ismertetett kálium-perszulfát jelenlétében (GÓMEZ-ARIZA 2000).

2.4.8 A hidridfejlesztés alkalmazási lehetőségei

Hidridfejlesztést előzetes oxidációs lépés nélkül nagyrészt szervesetlen specieszek meghatározására használnak. Általában vízminták (ivóvíz, talajvíz, szennyvíz) speciációjában találkozhatunk ezzel a módszerrel (MESTER 1996, ZHANG 2001).

Az előzetes derivatizációs lépés használatakor nem csak szervesetlen specieszeket tartalmazó minták elemezhetők, hanem mód nyílik szerves speciesz tartalmú biológiai ill. élelmiszer minták speciációjára is. Vizeletben mind arzén mind szelén speciációt végeztek a fent ismertetett előzetes roncsoló lépés alkalmazásával. Arzén speciáció esetén arzenit volt kimutatható legnagyobb mennyiségben (HE 2000), míg szelén esetén szelenát és SeCys (GÓMEZ 1998).

Egy másik érdekes minta főként arzén speciáció esetén a tengeri élőlények népes családja, ezek közül is legfőképpen az ételmezési szempontból fontos halak ill. kagylók, osztrigák különböző fajtái. Ezen minták arzén tartalmának legnagyobb részét a toxikológiai szempontból indifferens AsBet teszi ki, ezért is igen nagy jelentőséggel bír e minták arzén tartalmának speciációja, és nem csak az összes arzéntartalom meghatározása (VILLA-LOJO 2002).

A bemutatott példából is jól látszik, hogy a hidridfejlesztés jelentősége igen nagy a speciáció területén, számos műszerrel kombinálva alkalmazzák igen változatos minták elemzésére.

2.4.9 Izotóp eloszlás meghatározása

Az izotóp arány pontos meghatározásának két nagy alkalmazási területe van a speciációs analitikában. Az első esetben egy ismeretlen eredetű minta komponensének természetes izotóp arányának meghatározása a cél, meghatározva ezzel a minta földrajzi, geológiai eredetét. A másik felhasználási lehetőség egy elem metabolizmusának nyomon követése állati vagy emberi szervezetben az elem stabil izotópjának felhasználásával.

Egy elem izotóp eloszlását a természetben számos ok befolyásolhatja. Vegyük példának az ólmot, melynek négy nem radioaktív izotópja van (²⁰⁴Pb, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb, ²⁰⁸Pb), de ebből

háromnak a koncentrációját más elemek radioaktív bomlása befolyásolja. A ^{206}Pb , ^{207}Pb izotópok az uránium, a ^{208}Pb izotóp a tórium radioaktív bomlása során keletkezhet. Ezért ezen elemek keveredésének geológiai idejétől függően az ólom izotóp aránya Földünk más-más pontján különböző lesz, vagyis az izotóparány jellemző lesz a kőzetminta származási helyére. Izotóp arány mérésére használatos módszereket a kén analízis példáján mutatom be. Kén izotóp arány mérésre az egyik legelterjedtebben használt eljárás szerint gáz fázisban tömegspektrometriás detektálással állapítják meg a $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ arányt. Ehhez igen bonyolult minta-előkészítési technikát használva, először a minta kéntartalmából H_2S -t fejlesztenek, majd Ag_2S formában megkötik azt, végül SO_2 -dá vagy SF_6 -dá alakítva mérik. A módszer megbízhatósága általában jobb, mint 0,05% RSD. Alternatív módszerként Fourier-transzformációs infravörös spektrometriát (FT-IR) vagy másodlagos ion tömegspektrometriát (SIMS) használnak. Ezen módszerek megbízhatósága 0,1-0,2% RSD körüli, mely megfelel az izotóp eloszlás mérésére használt technikákkal szemben támasztott megbízhatósági kritériumnak (PROHASKA 1999). Hátrányuk, hogy bonyolult minta-előkészítést igényelnek, amely mind az elemzés költségét mind időigényét jelentősen megnöveli.

A fent ismertetett technikákon kívül növekvő „népszerűségnek” örvend az ICP-MS technika, amely az alternatív módszerekhez képest gyorsabb és sok esetben jóval egyszerűbb minta-előkészítést igényel. Ahhoz azonban, hogy az ICP-MS az izotóp arány mérés megbízhatósági kritériumát teljesítse szükség van néhány korrekció elvégzésére.

Az egyik korrekciós faktor a detektor holtideje. A fotoelektron-sokszorozó elvén működő detektor sajátja, hogy miután egy ion becsapódott és jelet generált, egy rövid ideig a detektor nem képes újabb jel kibocsátására. Így a mért jelintenzitás egy bizonyos beütésszám felett (körülbelül 10^6 counts/sec) nem lesz lineáris, és az ebből számolt koncentráció eltér a valódi koncentrációtól. Ez izotóp arány mérésnél akkor okozhat problémát, ha két eltérő gyakoriságú izotóp arányának meghatározása a feladat pl. ^{86}Sr (9,9%) és ^{88}Sr (82,6%). Ilyenkor a valódi koncentrációt az alábbi összefüggéssel szokták meghatározni:

$$C_v = \frac{C_m}{(1 - C_m \tau)} \quad (2.)$$

Ahol, C_v a valódi, C_m a mért koncentráció, és τ a detektor holtideje.

A másik fontos korrigálandó paraméter a tömegtorzítás. Az ICP-MS készülékekben számos olyan hatás érheti a különböző tömegű ionokat (pl. eltérő mintavételezési hatások, tértöltés hatás) (LONGERICH 1987), amely megváltoztatja az eredeti izotóp eloszlást. Ezért a készülék tömegtorzítását figyelembe kell venni, amennyiben az izotóp arány meghatározása a

cél. Erre vagy ismert izotóp eloszlású mintát használnak (külső korrigálás) pl. hiteles anyagmintát, vagy a mérendő mintában található állandó izotóp arányt használják fel (belső korrekció) pl. $^{86}\text{Sr}/^{88}\text{Sr}$ arány, amely a természetben állandó. A valódi izotóp arányt az alábbi összefüggés alapján lehet meghatározni:

$$R_v = R_m * (1 + C)^{\Delta m} \quad (3.)$$

Ahol, R_v a valódi, R_m a mért izotóp arány, Δm a két izotóp tömege közötti különbség és C a mért koncentráció..

Barbaste és munkatársai (2001) az ICP-MS készülékek három típusát hasonlította össze. A vizsgálat célja annak megállapítása volt, hogy melyik tömegspektrometriás detektálási módszer felel meg leginkább az izotóp arány mérés támasztotta igényeknek. A három összehasonlított készülék a quadrupól (Q), a kettős fókuszálású multikollektor (MC-SF), és a repülési idő tömegspektrométer (TOF), a feladat pedig borok ólomtartalmának izotóp arány mérése volt. A vizsgálat azt az eredményt hozta, hogy az izotóp arány mérés megbízhatósága a $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ és $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ arány esetén ICP-QMS-sel 0,14-2,7%, ICP-TOFMS-sel 0,04-0,17% míg ICP-MC-SFMS-sel 0,01-0,12% volt. Hiteles anyagminták elemzésével ellenőrizték az egyes tömegspektrométerek által szolgáltatott eredmények megfelelőségét, amely mindhárom esetben kielégítő eredményt adott. Az ICP-QMS megbízhatósága viszont nem tette lehetővé az izotóp eloszlás meghatározását, mert a bizonytalanság jóval meghaladta e feladathoz szükséges 0,1-0,2% RSD értéket.

Az interdiszciplináris kutatások jó példája az izotóp arány mérés alkalmazása antropológiai vizsgálatokban. Az ólomhoz hasonlóan a talaj $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ aránya jellemző a földrajzi helyzetre, mivel a ^{87}Rb β -bomlása során ^{87}Sr keletkezik, így az adott kőzet rubídium koncentrációja egyúttal meghatározza a $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ arányt is. A táplálékláncba kerülve a stroncium a kalcium metabolizmus útját követve a csontokban raktározódik, mégpedig megőrizve az eredeti, a talajnak megfelelő izotóp eloszlást. Ez utóbbi tényt kihasználva mód nyílik ásatások során talált emberi csontleletek stroncium izotóp arányának meghatározásával az egyes népcsoportok vándorlásának nyomon követésére. Az izotóp eloszlás meghatározására különböző minta-előkészítési eljárásokat alkalmaznak, úgymint teljes roncsolást nyomás alatt salétromsav jelenlétében ill. ioncserés elválasztást az interferenciát okozó Rb elválasztására. A detektálásra jellemzően ICP-SFMS készüléket alkalmaznak, mert e készüléktípus mind az érzékenységi, mind a megbízhatósági kritériumokat teljesíti (NAGEOTTE 1998, LATKOCZY 1998).

Az izotóp eloszlás mérésének speciális alkalmazása az izotóp hígítás technikája. A módszer a mennyiségi kiértékelés egy fajtája, amely más eljárásokkal ellentétben nem relatív hanem abszolút módszer. A módszer fejlődése során több eljárást is kidolgoztak az izotóp hígítás elvégzésére (pl. fordított izotóp hígítás, on-line izotóp hígítás), az alkalmazott elvet tekintve azonban - melyet alább mutatok be Cd mérés példáján - e módszerek nem különböznek. Az izotóp hígítás során a meghatározandó elem egy izotópját ismert mennyiségben („spike”) a mintához adják (elegy), majd mérik az addicionált izotópot és az elem egy tetszőleges izotópját. Az elem koncentrációját a 4. egyenlettel lehet meghatározni:

$$C_m = C_{sp} \frac{M_{sp}}{M_m} \frac{A_m}{A_{rsp}} \frac{A_{sp}^{111}}{A_m^{114}} \frac{R_e - R_{sp}}{1 - R_e R_m} \quad (4.)$$

, ahol

C_m	a Cd koncentrációja a mintában	R_e	az izotóp arány az elegyben ($^{114}\text{Cd}/^{111}\text{Cd}$)
C_{sp}	a Cd koncentrációja a „spike”-ban	R_{sp}	az izotóp arány a „spike”-ban ($^{114}\text{Cd}/^{111}\text{Cd}$)
M_m	a minta tömege	R_m	az izotóp arány a mintában ($^{114}\text{Cd}/^{111}\text{Cd}$)
M_{sp}	a „spike” tömege		
A_{rm}	a Cd atomtömege a mintában		
A_{rsp}	A Cd atomtömege a „spike”-ban		
A^{111}	$A^{111}\text{Cd}$ izotóp eloszlása a „spike”-ban		
A^{114}	$A^{114}\text{Cd}$ izotóp eloszlása a mintában		

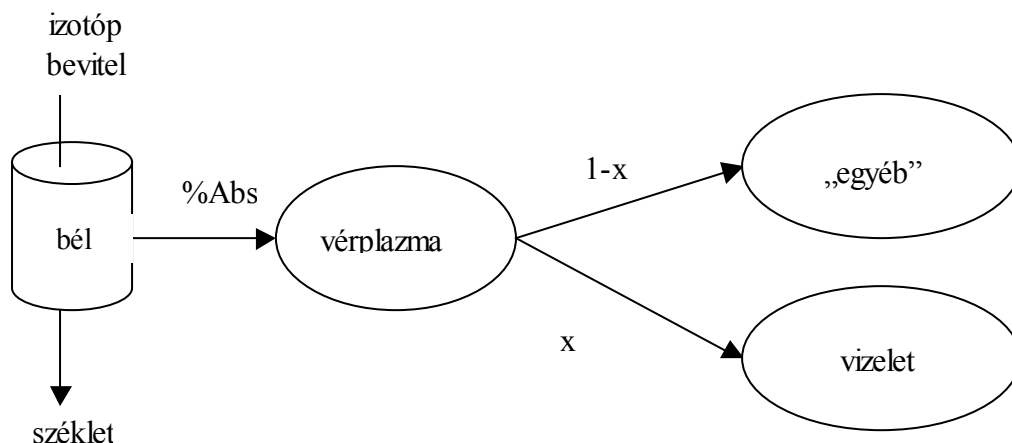
Az izotóp hígítás előnye, hogy nincs szükség külső kalibrációra, jobban figyelembe tudja venni a mátrix okozta zavarásokat, hiszen mintegy standard addícióként alkalmazható. A technikát használva kiküszöbölhető a minta-előkészítésből esetlegesen adódó veszteség.

Az izotóp eloszlás mérés másik dinamikus fejlődő ága a különböző mikroelemek metabolizmus folyamatainak vizsgálatával foglalkozik. Az egyik legintenzívebben kutatott nyomelem a cink, ezért az alábbi példákban ezen elem vizsgálatára alkalmazott módszereket ismertetem, amelyek természetesen általánosságban jellemzik más elemek metabolizmusának vizsgálatát is.

Cinkhiány esetén súlyos fejlődési rendellenesség, alacsony növény alakulhat ki, megnő az esély a dermatitisre, és az immunrendszer is károsodhat. Ezért 1960 óta, amikor emberi szervezetben először leírták a cink-hiánybetegséget, a kutatások középpontjában áll. A kutatásokat sokáig hátráltatta a megfelelő analitikai módszerek hiánya, melyekkel a cink felvételét, eloszlását, metabolizmus folyamatait nyomon lehet követni az emberi

szervezetben. Ezt az űrt töltötték ki a stabil izotópot használó módszerek, melyek nagy előnye, hogy terhes anyák és gyermekek vizsgálatára is alkalmazható, szemben a radioaktív nyomjelzéses technikákkal.

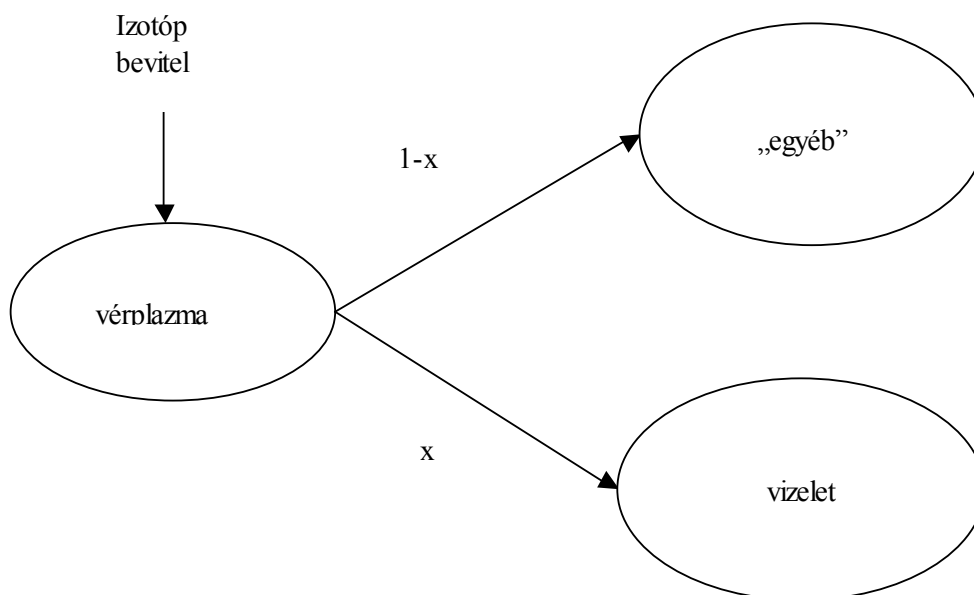
A módszer lényege, hogy szájon keresztül és/vagy intravénásan ismert mennyiségű stabil izotópot juttatnak a szervezetbe, majd mérik a kiválasztás során (széklet, vizelet) távozó izotóp mennyiségét. A vizsgálatot nehezíti, hogy nem csak a bejuttatott izotóp ürülhet ki a vizsgálat ideje alatt, hanem korábban a szervezetbe jutott, és bizonyos ideig abszorbeálódott izotóp is. A leggyakrabban alkalmazott módszer az ún. kettős izotóp arány mérés (dual isotope tracer ratio, DITR). Ennél az eljárásnál két cink izotópot használnak, az egyiket intravénásan (iv) a másikat orálisan juttatják a szervezetbe (o). A vizeletből a beadást követően legalább 32 óra elteltével mintát vesznek. A módszer egyes lépéseinek nyomon követését a **8. és 9. ábrák** segítik.



8. ábra

Stabil izotóp útja a szervezetben szájon át történő bevitel után

A szájon keresztül bejuttatott izotóp egy része (%Abs) a plazmában abszorbeálódik, melynek egy része a vizelettel kiürül („x”). A maradék („1-x”) vagy megkötődik a szervezetben, vagy a mintavétel időtartamán kívül ürül a vizelettel.



9. ábra

Stabil izotóp útja a szervezetben intravénás bevitel után

Az intravénás izotópot használva „x” mennyisége mérhető, mivel a szervezet képtelen megkülönböztetni az intravénás és a szájon keresztül bejuttatott izotópokat egymástól, így „x” mennyisége, azonos izotóp koncentrációt használva, a **8. és 9. ábrán** megegyezik. Mindezt egyenletekkel kifejezve:

$$\%Abs = \frac{\text{"o" mennyisége a vizeletben} / \text{"o" kiindulási mennyisége}}{\text{"iv" mennyisége a vizeletben} / \text{"iv" kiindulási mennyisége}} \quad (5.)$$

A DTIR módszer nem az egyetlen, de a legelterjedtebben alkalmazott módszer, mivel nem szükséges székletet gyűjteni, és a vizeletből is elég egyszer mintát venni, így akár kis gyermekek esetén is el lehet végezni a vizsgálatot.

Izotópok vizsgálatára biológiai rendszerekben számos módszert használnak pl. neutron aktivációs analízist (NAA), hőionizációs tömegspektrometriát (thermal ionisation mass spectrometry (TIMS), ICP-MS-t. Mindkét leggyakrabban használt módszernek (TIMS, ICP-MS) vannak előnyei és hátrányai is. Míg a TIMS módszer jóval nagyobb megbízhatóságú, mint az ICP-MS, a berendezés beruházási költsége igen nagy. A méréshez bonyolult minta-előkészítési módszer szükséges, az időegység alatti mérhető mintaszám alacsony, ami a rutin mérést nagyon költségessé teszi. Az ICP-MS megbízhatósága elmarad ugyan a TIMS precizitásától, és mintagénye is nagyobb, de alacsony költsége és a mérés gyorsasága igen vonzóvá teszi az izotóp eloszlás meghatározás területén. A HR-ICP-MS készülékek további

fejlesztésével valószínűleg megnyílik az út a két technika előnyeit ötvöző mérési módszer előtt, amely módszer a kutatók reményei szerint egyszerre lesz:

- eléggé érzékeny (így csökken a mintaigény)
- megfelelően nagy felbontású (ezzel kiküszöbölve az esetleges spektrális interferenciákat)
- nagy megbízhatóságú
- gyors
- kis bekerülési költségű, olcsó üzemeltetésű

A nagyhatékonyságú mintabevitel főleg a természetes izotóp eloszlás meghatározásakor jön szóba, mivel a biológiai rendszerekben a stabil izotóp technikát alkalmazva a mérendő komponens koncentrációja az esetek nagy részében ICP-MS-sel jól mérhető tartományban van. Nagyhatékonyságú mintabevitelt elsősorban szilárd minták analízisének alkalmaznak, jellemzően lézer elpárologtatást, így csökkentve a roncsolás folyamán fellépő esetleges hibák lehetőségét (mintaveszteség, szennyezés stb.) (PROHASKA 2002).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

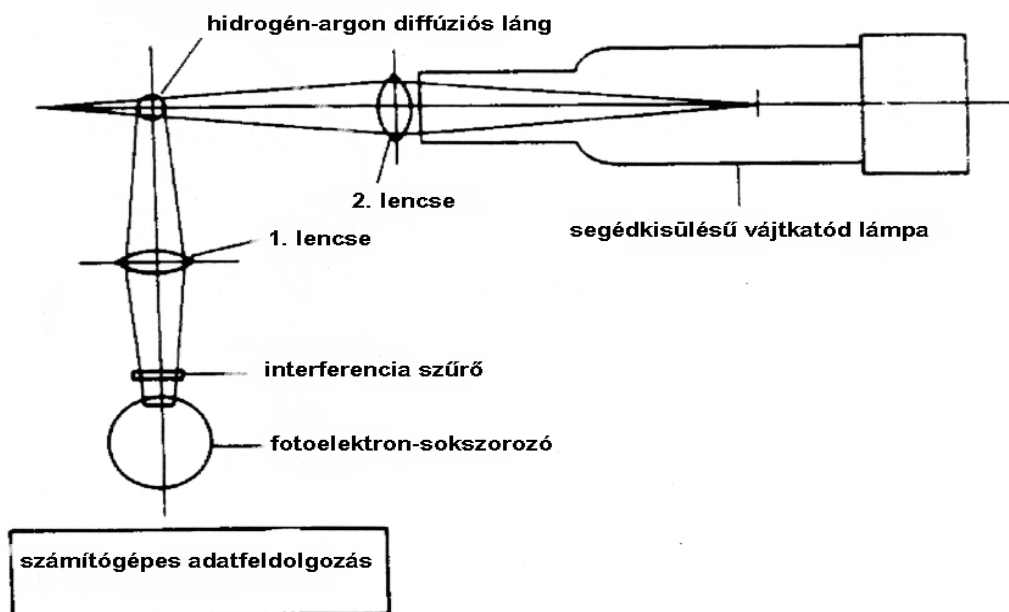
A munkám során felhasznált vegyszerek és eszközök részletes ismertetésére nem ebben a fejezetben kerül sor, hanem az „Eredmények” című fejezet aktuális alfejezeteiben, hiszen ezek módszerről módszerre változtak. E fejezetben a módszerfejlesztés során használt két detektort mutatom be részletesen, mivel ezek az eszközök munkám egésze alatt állandóak voltak.

3.1 Atomfluoreszcens detektor

Több, mint harminc éve kezdődtek el azok a fejlesztések, melyek célja egy fluoreszcencia elvén működő hidridfejlesztéssel kombinálható atomspektrométer létrehozása volt. A fejlesztések első lépései mind a diszperzív (THOMPSON 1975), mind a nemdiszperzív atomfluoreszcens spektrométer irányába megtörténtek (TSUJII 1974). Az eredmények azt mutatták, hogy a nemdiszperzív detektor a kérdéses célra jobban használható, melynek több oka is van:

- a) Az alkalmazott hidrogén-argon diffúziós láng kis energiájú, ezért 300 nm alatt az emissziója, vagyis a láng által okozott háttérsugárzás csekély, így nem szükséges monokromátor az esetleges interferenciák kiszűrésére.
- b) A gerjesztés elemszelektív, ezért monokromátor alkalmazása nélkül, interferencia szűrővel is vizsgálható a kívánt spektrum részlet.
- c) Az adott elem több vonala is használható gerjesztésre, és ezek emisszióját összegezve nagyobb érzékenység érhető el.
- d) A nemdiszperzív készülék a monokromátor hiánya miatt, sokkal kisebb helyigényű, könnyebben mozgatható, és nem utolsó sorban olcsóbb.

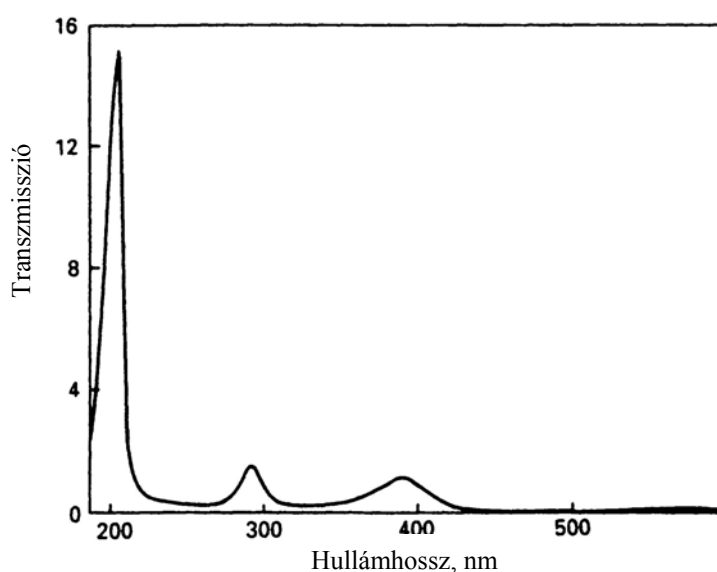
A tapasztalatokat összegezve CORNS (1993) és munkatársai kifejlesztettek egy hidridfejlesztéssel kombinált atomfluoreszcens spektrométert, melynek optikai felépítését a **10. ábra** mutatja.



10. ábra

A PSA Excalibur atomfluoreszcens detektor felépítése

A berendezésben a gerjesztést egy segédkisülésű (boosted) vájtkatód lámpa (Superlamp, Photron, Victoria, Australia) végzi. A lámpa fényét a 2. lencse fókuszálja a lángra, majd fluoreszcencia intenzitását a lámpával 90°-os szögben elhelyezett fotoelektron-sokszorozóval mérik. A láng és a detektor között helyezkedik el az 1. lencse, mely feladata a láng képét a fotoelektron-sokszorozóra fókuszálni.



11. ábra

A PSA Excalibur AFS detektor interferencia szűrőjének transzmissziója a hullámhossz függvényében

Az alkalmazott interferencia szűrő transzmisszióját a **11. ábra** mutatja, melyen jól látható, hogy az átérésztési maximum 200 nm-nél található, a szűrő sáv szélessége ± 10 nm.

A munkám során használt detektor (PSA Excalibur, PS Analytical, Sevenoaks, Kent, UK) felépítésében teljesen megegyezett a **10. ábrán** látható detektorral, amely berendezés az általam használt készülék prototípusa volt.

A detektorban az atomizálást egy hidrogén-argon diffúziós láng végzi. A diffúziós lángok jellemzője, hogy az égést tápláló láng diffúzióval illetőleg konvekcióval jut el az égés helyére, ezért nincs a lángban külön égési zóna, az égés a láng egész terében folyik. Az égőfej rögzített, ezért nincs mód a leképezési magasság optimalására, azt az alkalmazott gáz áramlási sebessége határozza meg. A mérést 196,09; 203,99; 206,28 nm-en, a szelén jellemző rezonancia-hullámhosszain végeztem.

3.2 Induktív csatolású plazma repülési-idő tömegspektrométer

Mivel az induktív csatolású plazma repülési-idő tömegspektrométer egy viszonylag új analitikai technika, amellyel az elsők között volt szerencsém behatóbban foglalkozni, valamint a technikáról tudomásom szerint eddig magyar nyelven nem jelent meg leírás (kivéve egy tanszékünkön 2002-ben készült diplomamunkát, ABRANKÓ 2002) szükségét érzem a módszert részletesebben tárgyalni.

3.2.1 Az új technika megjelenésének okai

Az ICP-MS technika már az 1980-as években igen elterjedten használatos volt, világszerte körülbelül 450 készülék működött, de a kilencvenes évek elejéig az ionok tömeg szerinti szétválasztásához, a kereskedelemben kapható készülékek kizárólag quadropól tömegspektrométereket alkalmaztak, melyek ún. szekvenciális analizátorok. Működési elvük részletesebb tárgyalása túlmutat e disszertáció keretein, ezért csak néhány fontosabb vonását említem meg a quadropól analizátoroknak. A szekvenciális jelző a quadropól analizátor esetében azt takarja, hogy az ionnyalábból érkező ionok közül nem minden tömegszámú ion becsapódását képes a detektor egy időben érzékelni, mivel a tömegszám szerinti elválasztás úgy történik, hogy a tömeganalizátor mintegy szűrőként működve, csak a mérendő iont engedi át. Egy tömegszámot a rendszer az adott mérés beállításában meghatározott ideig mér, majd a következő tömegszám mérését kezdi el. Így pásztázza végig a kívánt tömegszám-

tartományt. A mérés időszükséglete a meghatározandó ionok számától és koncentrációjától függ. Ez főleg gyors tranziens jelek mérése esetén okoz problémát, ha egy analízis során nagyszámú meghatározandó komponens elemzése a feladat (lásd később „spectral skew”). A quadropól analizátorok teljesítményének növelésére több lehetőség is kínálkozott. A teljesítmény fokozása érdekében, minden egyes tömegszámról kapott detektoradatot külön-külön tárolnak és több, rövidebb pásztázás összegzett eredményét használják mérési eredményként. Ezzel a módszerrel azonban nem tudjuk figyelembe venni a plazma ingadozásából eredő hibákat. Ezt az ún. tömegszám ugrásos (peak hopping) módszer alkalmazásával kívánták csökkenteni, melynél a pásztázást vezérlő számítógép az előre beállított (a mérés céljából adódóan érdektelen) tömegszámokat átugorja, így rövidebb pásztázási időket kapunk. Ezzel a módszerrel a praktikusnak tűnő 250 m/z tömegszámot választva felső pásztázási határként a teljes spektrumot kb. 0,1 s alatt mérhetjük végig. Kis koncentrációknál, gyors jeleknél (pl. ETV, LA), nagy számú meghatározandó elem esetén azonban az egyetlen, vagy néhány pásztázásból eredő jelek megbízhatósága kicsinek bizonyult tranziens nyomelemanalitikai vizsgálatok során. Válaszként a felmerült problémára, 1993-ban új, az ICP-MS készülékeknél addig nem használt tömegszám szerinti szétválasztási technika alkalmazása kezdődött el (MYERS 1993).

3.2.2 Az ICP-TOFMS működésének elve és a készülék felépítése

A készülék ismertetése során - a dolgozat kereteinek behatárolt volta miatt - csak a hagyományos quadropól tömegspektrométertől eltérő szerkezeti elemek működését és funkcióját tárgyalom részletesen.

Az új technika alapját, melyet magyarul induktív csatolású plazma-repülési idő-tömegspektrometriának nevezhetünk, mely a nemzetközi irodalomban elfogadott *inductively coupled plasma-time of flight-mass spectrometry* (ICP-TOFMS) nevet kapta, a kinetikából jól ismert összefüggés szolgáltatja:

$$KE = \frac{1}{2}mv^2 \quad (6.)$$

ahol

KE: a részecskék kinetikai energiája a gyorsítási mező végén [J],

m: a részecske tömege [kg],

v : a részecske pillanatnyi sebessége [m/s].

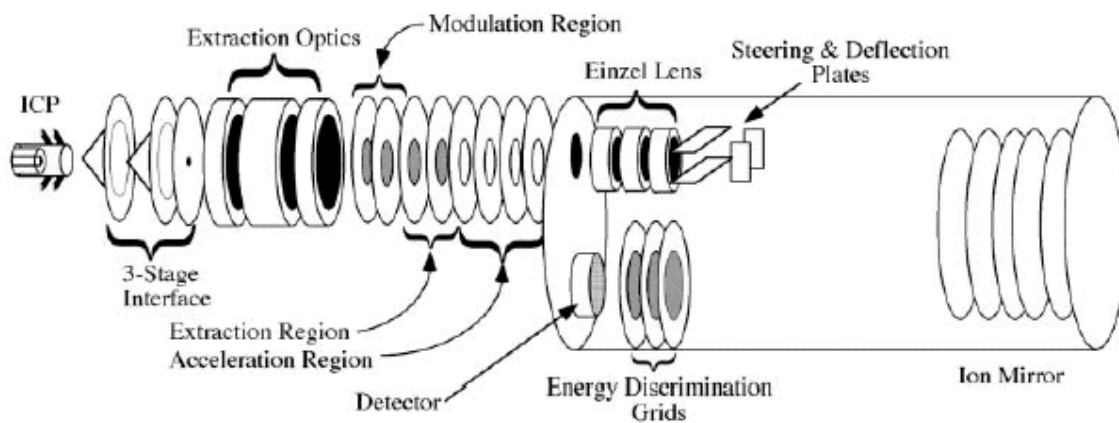
Az elmélet gyakorlati alkalmazhatóságának feltétele, hogy a különböző tömegű ionok kinetikai energiája azonos legyen. Mivel az ionok töltéssel rendelkeznek, így elektromos mező létrehozásával képesek vagyunk hatni rájuk. A mérendő részecskék (ionok) e tulajdonságát kihasználva, elektromos mező segítségével gyorsítjuk fel őket egy adott energiaszintre. Ezt úgy valósíthatjuk meg, hogy a pozitív töltésű ionokat az ionforrásból olyan térrészbe vezetjük, ahol az ionnyaláb „mögött” egy, az ionok potenciáljánál pozitívabb potenciálú taszítóelektród (*repeller*) helyezkedik el. Ez a taszítóelektród gyorsítja föl, és juttatja ezáltal többlet mozgási energiához az ionokat.

Ezek után a felgyorsított ionok egy elektromos mezőtől mentes térrészbe jutnak. Ebben az ún. repülési zónában az ionok időben szétválnak egymástól, tömegbeli különbségüknek köszönhetően. Ennek magyarázatát, a már említett mozgási energiát leíró összefüggés adja.

Az [6] egyenlet értelmében, ha az ionforrásból (plazmából) érkező különböző tömegű (tömegszámú) részecskék azonos mozgási energiaszintre lettek felgyorsítva, akkor kinetikai energiájuk rendre azonos.

$$KE_1 = KE_2 = \dots = KE_n = KE \quad (7.)$$

Ebből adódóan minden, az elektromos mezőtől mentes, szabad térrészbe jutó részecske repülési sebességében meglévő eltérés elvileg kizárólag tömegszámbeli különbségüknek köszönhető. Vagyis az m_1 tömegű részecske sebessége v_1 lesz, m_2 tömegűé pedig v_2 . Ha a repülési úthossz adott, akkor könnyen belátható, hogy a könnyebb részecskék hamarabb érik el a kijelölt repülési út végét, mint a lassabban repülő nehezebb részecskék. Kellően nagy felbontású, és megbízható időmérő eszközzel és megfelelő iondetektorral, az egyes ionok repülési idejét megmérve, megtudhatjuk azok tömegét, amely információt jelent kémiai minőségükre vonatkozóan. A repülési út végén lévő detektorba való becsapódások számából (a kapott detektorjel intenzitásából), pedig mennyiségi információt nyerünk (MYERS 1995). Az ICP-TOF MS sematikus felépítését a **12. ábra** mutatja.



12. ábra

A Leco Renaissance ICP-TOFMS felépítése

3.2.3 A modulátor

A valóságban elsősorban a „monokromátor” elv miatt a helyzet ennél valamivel összetettebb. Az ionforrásból, a részecskék folyamatosan és nagy számban érkeznek. Ha a folyamatos ionáram minden ionját felgyorsítanánk, lehetetlenné válna az ionok repülési idejének fenti célra felhasználható mérése. Ugyanis nem lehetne a repülési időket az adott ionokhoz rendelni, pontosabban nem lehetne megállapítani, hogy az adott pillanatban a detektorba csapódó ion egy korábban elindult, nehezebb ion vagy egy későbbi időpillanatban elindult, könnyebb ion. E probléma áthidalásaként a TOFMS készülékeknél nem alkalmaznak időben állandó elektromos mezőt a részecskék gyorsításához, hanem impulzusszerűen ki-be kapcsolt elektromos mezővel gyorsítják az ionokat, vagyis modulálják az egyenáramú jelet. Ezeket az impulzusokat olyan frekvenciára állítják be, hogy két ionsomag útnak indítása között legalább annyi idő teljen el, amely elegendő ahhoz, hogy az előző ionsomagban esetlegesen jelenlevő legnehezebb ion is végigrepülhessen. A következő ionsomag csak ezután indul útnak, és a repülési idő mérése is ettől az időpillanattól kezdődik újra. Egy ionsomag lehetséges legnehezebb ionja - amelynek konvencionálisan a 238-as tömegszámú uránt tekintik - az 1 méteres repülési utat kb. 50 μ s alatt teszi meg. Tehát a készülék másodpercenként 20000 teljes tömegspektrumot képes felvenni. Az MS kiértékelő szoftvere az így nyert több ezer tömegspektrum összegéből adja meg az adott minta tömegspektrumát. Az integrálási idő azonban nem csupán 1 másodperc lehet. Felhasználási céltól függően ms nagyságrendtől kezdve, akár több tíz másodpercig tartó integrálási idő is beállítható (RAY 2001).

3.2.4 Az iontükör

Az elmélet és a gyakorlat újabb eltérése miatt van szükség az iontükörré (ion mirror). A gyorsító feszültség bekapcsolásának pillanatában a modulációs térrészben (modulation region) található megegyező tömegszámú ionok kinetikus energiája nem teljesen egyenlő, amely jelenség több kiváltó okra vezethető vissza:

- Az ionok eltérő távolságra vannak a gyorsító feszültségtől, így kis mértékben ugyan, de eltérő nagyságú gyorsító feszültség hat rájuk, melynek következtében kinetikus energiájuk sem lesz teljesen azonos.
- Az ionok mozgási energiájának, mint vektor mennyiségnek nem csak a detektor irányába mutató összetevője van, bár ez az összetevő a legnagyobb. Minél nagyobb egy eltérő irányú összetevő, annál kisebb lesz a főirányú összetevő, amely a detektor felé mozgatja az iont. Az egyes azonos tömegszámú ionoknak következőképp kis mértékben, de különböző lesz a repülési idejük.

Ezek a jelenségek a tömegspektrumon csúcsszélesedés formájában jelennek meg, amely nemkívánt jelenség, hiszen minél keskenyebbek az egyes tömegszámokhoz tartozó csúcsok, annál jobb felbontás érhető el. Ez a csúcsszélesedés csökkenthető az iontükör segítségével, mégpedig úgy, hogy a nagyobb kinetikus energiájú ionok „beljebb” hatolnak az iontükörbe, ezzel megnő a repülési úthosszuk, vagyis a repülési idő beli különbség csökken. Az iontükör másik feladata a repülési úthossz megnövelése, ezáltal a különböző tömegszámú, eltérő sebességű ionok repülési ideje közötti különbség megnő, és pontosabban lesz mérhető.

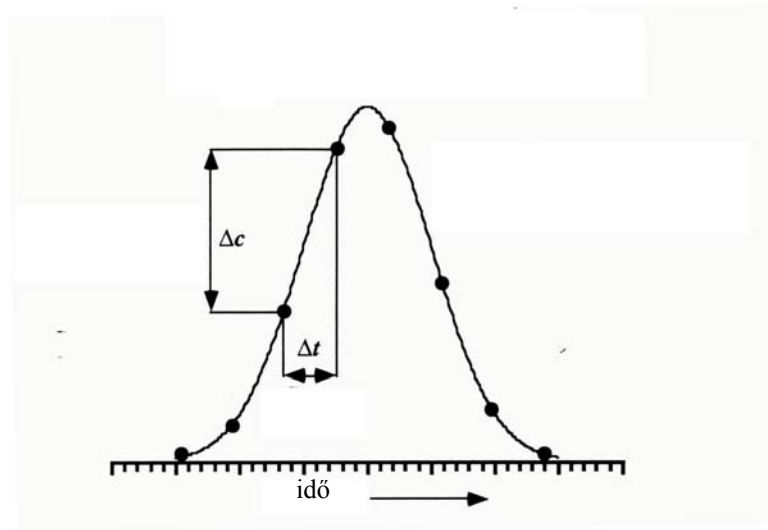
3.2.5 Ionkizárás

Mivel az ICP-TOFMS készülékekben a quadropól tömeganalizátorral működő tömegspektrométerekkel ellentétben nincs tömegszám szerinti „szűrő”, ha nem alkalmaznák az ionkizárás módszerét (ion deflection), minden a plazmában található ion bejutna a tömegspektrométerbe, és elérné a detektort. Ez természetesen igen rövid idő alatt a detektor „halálát” okozná, hiszen pl. a plazma 99%-át alkotó argon ionjai olyan óriási jelet generálnának, ami a detektort telítené, tönkretenné. Ezt megakadályozandó a detektor előtt található egy elektród, amely a nem kívánt ionokat nem engedi a detektorba jutni, oly módon, hogy a szoftverben megadható időpillanattól kezdve és szintén megadható időtartamig pozitív feszültséget kapcsolunk az elektródra, amely feszültség mintegy kiüti a nemkívánt ionokat az

ioncsomagból. Az ionkivágással mód nyílik egyes tömegszámok vagy akár egész tömegtartományok „törlésére” a tömegspektrumból. A módszer nem csak plazmagázok ionjainak – pl. Ar^+ , ArAr^+ , ArO^+ - kivágására szolgál, hanem használható (és ajánlatos is használni) a mintában lévő nagy mennyiségű mátrixkomponens - pl. salétromsavas feltárás esetén a N^+ - jelének „törlésére”.

3.2.6 A TOFMS jelentősége tranziens jelek vizsgálata során

Az ICP-TOFMS azon tulajdonsága, hogy rövid idő alatt képes a teljes tömegspektrumról információt szolgáltatni, igen jelentősnek bizonyult, főként tranziens jelek vizsgálata során. Ilyenkor ugyanis a meghatározandó komponens által szolgáltatott detektorjel ideális esetben egy gaussi haranggörbe lefutást mutat. Amennyiben a detektálás sebessége nem kellően gyors ahhoz, hogy annyi idő alatt, míg a jel „átfut” a készüléken kellő mennyiségű mérési pontot rögzítsen, a kapott jel bizonytalansága elfogadhatatlanul nagy lesz. Quadrupól ICP-MS készülékek esetében ez a probléma tranziens jelek vizsgálatakor léphet fel, ha a mérendő tömegszámok száma nagy. Ugyanis az alatt az idő alatt, amíg a quadrupól analízátor a teljes tömegspektrumot végigpásztázza, a jel intenzitása az idő függvényében változik. Ez azt eredményezi, hogy ha a tranziens módon bejuttatott mintában az m_1 és m_2 tömegszámú elem egyenlő koncentrációban van jelen, valamint feltételezzük, hogy semmilyen zavaró hatás nem tolja el ezt az arányt a vizsgálat során, quadrupól analízátorok esetében a mért jelintenzitás mégis különbözhet (ún. „spectral skew” jelenség). Ez abból adódik, hogy a rövid idő alatt lefutó haranggörbe szerűen változó jelintenzitás, a pásztázási idő alatt jelentősen változik. Ennek következtében az azonos időpillanathoz tartozó, a pásztázási intervallum elején mért m_1 tömegű ion mért intenzitása kisebb lesz, mint a pásztázási időablak közepén mért m_2 tömegű ioné, holott oldatbeli koncentrációjuk egyenlő (HOLLAND, 1983). E jelenség szemléltetése, az **13. ábrán** látható.



13. ábra

Tranziens jelek mérése során felmerülő koncentrációváltozás jelensége

Ez a jelenség a részecskék ionnyalábból történő szimultán mintavételezése ill. analizálása esetén gyakorlatilag nem létezik. A TOFMS-nél alkalmazott másodpercenkénti 20 kHz-es mintavételezési sebességnél a jelenségből adódó fent említett hiba elhanyagolható mértékűre csökken.

3.2.6 A gyorsaság egyéb előnyei

A TOFMS gyors mintavételezési sebessége – tranziens jelek vizsgálatán kívül –, stacioner jelek mérésekor is előnyt jelent. Ugyanis a mérések összes bizonytalanságának tartott zavaró hatások, úgymint:

- mintabetáplálásból (porlasztásból) adódó bizonytalanság,
- a plazma térbeli ingadozásából eredő bizonytalanság,
- az ionkoncentráció mátrixfüggőségéből adódó bizonytalanság

mind ún. multiplikatív hibaforrások. Ez annyit tesz, hogy minden egyes komponensre, gyakorlatilag ugyanolyan mértékben hatnak. Azaz, az ilyen jellegű hibaforrásokból adódó jel-fluktuációk bizonyos mértékben korrelálnak egymással. A fent felsorolt bizonytalansági források hatása csökkenthető akkor, ha a jelpárok hányadosát tekintjük meghatározandó mennyiségnek. Ilyen vizsgálatokat hatékonyan kizárólag olyan készülékekkel végezhetünk,

melyek szimultán, párhuzamosan képesek összetartozó (egymással elosztható) jelek mérésére. Az ICP-TOFMS gyorsaságából adódóan, az általa szolgáltatott jelek szimultán mért jeleknek tekinthetők (LEACH 2001).

A készülék fent említett tulajdonságai ideálissá teszik olyan vizsgálatok elvégzésére, amelynél a bizonytalansággal szemben a rutin analitikai elvárásoknál szigorúbb kritériumok fogalmazódnak meg, pl. izotóp arány meghatározásra. ICP-TOFMS készülékkel mind stacioner, mind tranziens jelekből a quadrupól tömeganalizátorral működő készülékekénél nagyobb megbízhatósággal lehet izotóp arány mérést végezni (WESTPHAL 2002, VANHAECKE 1999).

4. EREDMÉNYEK

4.1 Nagy hatékonyságú folyadék-kromatográfia és atomfluoreszcens spektrometria kapcsolása nagynyomású porlasztóval, HPLC-HHPN-AFS rendszer

Ezen alfejezet tárgya nagynyomású porlasztó (HHPN) speciációs analitikai alkalmazása lehetőségeinek bemutatása (előnyök, hátrányok) atomfluoreszcens detektálást alkalmazva. A módszert az öt leggyakrabban elemzett szelén speciesz meghatározására fejlesztettem ki, jellemeztem analitikai teljesítő képesség szempontjából, valamint kritikailag értékeltem a módszer felhasználhatóságát és korlátait valódi minták speciációs elemzésére.

4.1.1 Felhasznált vegyszerek és eszközök

Munkám során az elválasztás kidolgozásához használt szerves és szervetlen szelén specieszeket a **1. táblázat** tartalmazza. A vizsgálathoz használt oldatokat úgy állítottam elő, hogy a szeleno-aminosav standardeből 100 mg dm⁻³ koncentrációjú törzsoldatot készítettem, majd a későbbiek során ebből az oldatból hígítottam a kívánt koncentrációig. Erre azért volt szükség, mert a töményebb oldatok tovább tarthatók el a specieszek egymásba történő átalakulása ill. lebomlása nélkül.

Az eluensek készítéséhez trifluor-ecetsavat (TFA, Merck, Darmstadt, Németország), metanolt (Carlo Erba, Milánó, Olaszország), didodecil-dimetil-ammónium-bromidot (DDAB) (Fluka, Buchs, Németország) és ammónium-acetátot használtam (Reanal, Budapest, Magyarország).

1. táblázat A vizsgálatokhoz felhasznált szelén specieszek

Jelölés	Megnevezés (Összegképlet)	Előállító
SeMet	DL-szeleno-metionin (C ₅ H ₁₁ NO ₂ Se)	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA
SeEt	DL- szeleno-etionin (C ₆ H ₁₃ NO ₂ Se)	Sigma Chemical Co.
SeCys ₂	DL- szeleno-cisztin (C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ Se)	Sigma Chemical Co.
SeIV	Szelenit (SeO ₂) 1000 mg/liter	Merck (Darmstadt, Németország)
SeVI	Nátrium-szelenát (Na ₂ SeO ₄)	Sigma Chemical Co.

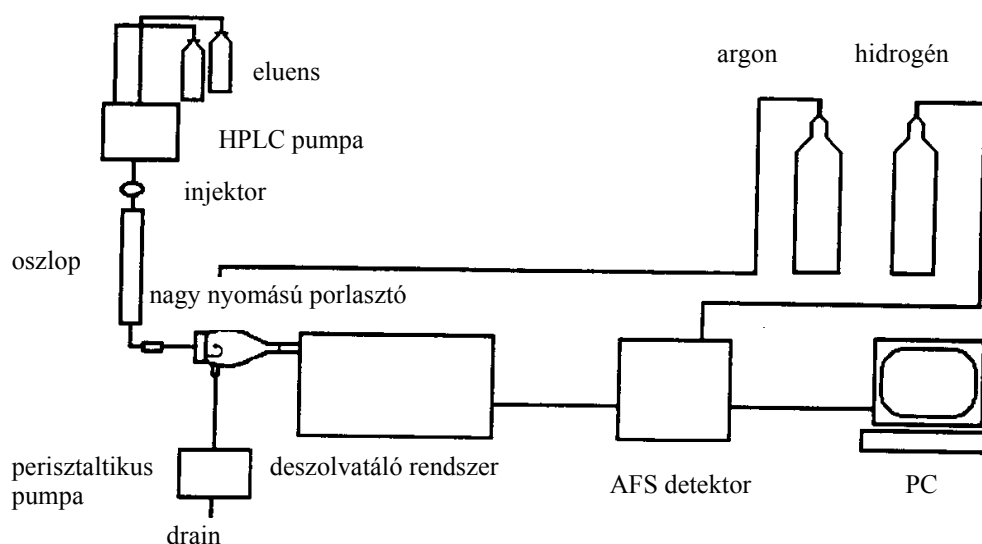
A minta-előkészítéshez használt K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Tris-HCl, HCl, NaOH és H_2O_2 vegyszereket a Reanaltól szereztem be. Az enzimes feltáráshoz tripszin és pepszin fehérjebontó enzimeket használtam (Fluka).

4.1.2 A HPLC-HHPN-AFS rendszer felépítése

Munkám egyik célkitűzése ún. kapcsolt analitikai rendszer kialakítása volt. A rendszer három fő részből áll:

- Nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfias elválasztás technika (HPLC)
- Nagy nyomású porlasztó (HHPN)
- Atomfluoreszcens detektor (AFS)

A rendszer sematikus rajza a **14. ábrán** látható.



14. ábra

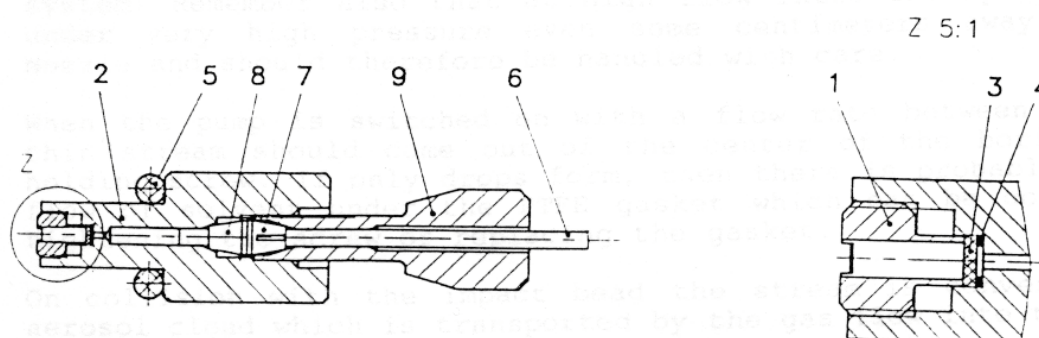
A speciációs analízishez használt HPLC-HHPN-AFS rendszer kísérleti elrendezése

Az elválasztáshoz Bio Separation Technologies gyártmányú fordított fázisú oszlopot használtam (BST Nucleosil 5 C-18, 250*4 mm). Az oszlopot a következő eljárással készítettem elő a mérésre: 500 ml $0,01 \text{ mol/dm}^3$ töménységű 50 v/v % metanolt tartalmazó didodecil-dimetil-ammónium-bromid (DDAB) oldatot vezettem át az oszlopon 1 ml/min sebességgel. Az eluens 0,5 térfogat százaléknyi metanolt és 10^{-5} mol/dm^3 DDAB-t tartalmazó ammónium-acetát oldat volt, melyet 0,1 M és 0,01 M töménységben használtam. A kétféle töménységű eluensre azért volt szükség, mert a szelenát a 0,01 M koncentrációjú ammónium-

acetát oldattal nem eluálódik (GONZÁLEZ 1998), ezért az elválasztáshoz gradiens elúciós módszert dolgoztam ki (STEFÁNKA 1999). A gradiens program lépéseit a **2. táblázat** tartalmazza. A program során hat percig 0,01 M ammónium-acetátot használtam, majd fokozatosan áttértem a 0,1 M ammónium-acetátra (6-6,9 min), és a program végéig ez a töménységű oldat maradt az eluens. A továbbiakban a nagy nyomású porlasztó működését ismertetem bővebben.

A nagynyomású porlasztó felépítése

Az atomspektrometriai technikák egyik legkényesebb lépése a mintabevitel. A folyadékkromatográfia és az atomspektrometria összekapcsolásakor a folyadék halmazállapotú mintát ill. a mozgó fázist kell az atomizációhoz megfelelő halmazállapotba juttatni. Ezt végzi el a porlasztó, amikor a folyadék fázist aeroszollá alakítja. A meghatározáshoz használt nagynyomású porlasztó felépítését az **15. ábra** mutatja.



1 szeleptartó csavar	4 tömítés (PTFE)	7 szorítógyűrű
2 szeleptartó	5 O-gyűrű	8 polimer tömítőgyűrű
3 szeleplap (Pt/Ir)	6 PEEK cső	9 Dinaseal-csavar

15. ábra

A nagynyomású porlasztó felépítése

Munkám során egy házi készítésű nagynyomású porlasztót használtam (Falussy Csaba, Debrecen), amely a következő módon működik: a porlasztóban a folyadék egy igen kis méretű lyukon keresztül nagy nyomással kilépve egy üveggömbnek ütközik, így a porlasztó ködkamrájában nagy mennyiségű aeroszol keletkezik, melyet a bejuttatott argon gáz segítségével szállítottam tovább a detektorba. A mérések során 15 mikrométer lyukátmérőjű szeleplapot használtam a porlasztóban. Közvetlenül a nagynyomású porlasztó előtt egy

szűrőegységet kapcsoltam a rendszerbe, megakadályozandó a kis átmérővel üzemelő porlasztó esetleges eldugulását. A szűrőegységet a porlasztóval egy flexibilis teflon vezetékkel kötöttem össze. A keletkezett nagy mennyiségű aeroszol a detektáláshoz használt kis térfogatú, alacsony hőmérsékletű hidrogén láng energiáját nagy mértékben csökkentené, tehát kötelező a deszolvatáció, különben az atomizálás nem vagy nem kielégítő mértékben menne végbe, szélsőséges esetben a láng elaludna. Ezért a porlasztó után egy deszolvatáló rendszert kapcsoltam, amely szintén házi készítésű volt (Falussy Csaba, Debrecen). A deszolvatáló rendszer egy fűtő és egy hűtő egységből állt. A fűtő egység hűtésére vízhűtést használtam, a hűtő egységben keletkezett kondenzátumot a porlasztóban lecsapódott drainnel együtt egy többcsatornás perisztaltikus pumpával (Raimin Instruments Co., Wolburn, MA) vezettem el. A hűtő egységből a minimális nedvességet tartalmazó gázt flexibilis polietilén csövön keresztül vezettem a detektorhoz. Ezen a ponton lépett be a hidrogén gáz egy Y-csatlakozón keresztül a rendszerbe (mintegy 25 cm-rel a láng előtt). A rendszer működési paramétereit a **2. táblázat** mutatja.

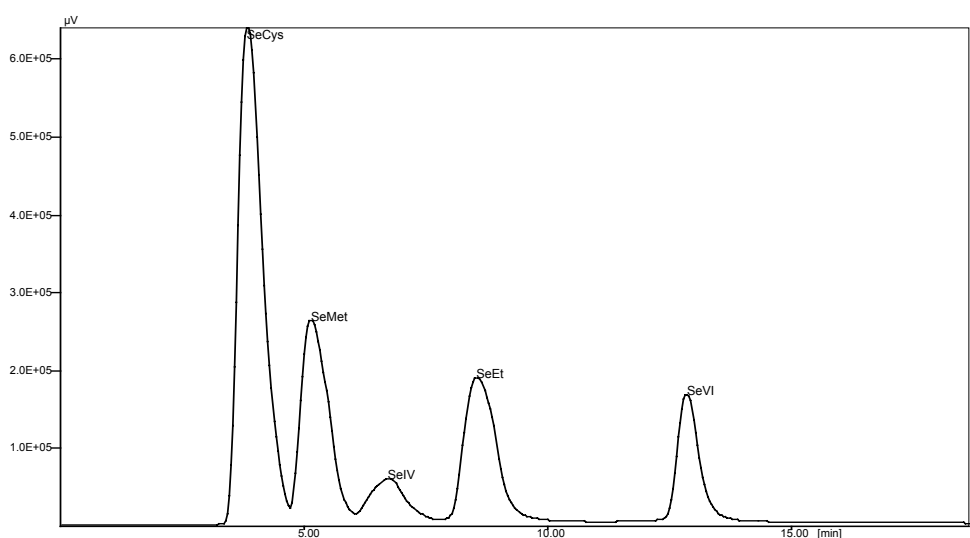
2. táblázat A HPLC-HHPN-AFS rendszer működési paramétereit

HPLC	
Oszlop	BST Nucleosil 5 C-18, 250*4 mm
Eluens	A: 10 mM ammónium-acetát 0,01 mM DDAB, 0,5 V/V% metanol, pH=4 B: 100 mM ammónium-acetát 0,01 mM DDAB, 0,5 V/V% metanol, pH=6,5
Mintabevivő hurok térfogata, µl	250
Eluens áramlási sebessége, ml min ⁻¹	1
Gradiens elúciós program	0-6 perc 100% A 6-6,9 perc 100% B fokozatos elérése 6,9-13 perc 100% B
Deszolvatálás	
Fűtés hőmérséklete, °C	160
Hűtés hőmérséklete, °C	10
AFS detektor	
Elsődleges áramerősség, mA	27,5
Emelt áramerősség, mA	30
Argon áramlási sebessége, ml/ min	390
Hidrogén áramlási sebessége, ml/ min	280

A detektálást PSA 10.003 atomfluoreszcens detektorral végeztem (PSA, Excalibur, Sevenoaks, Kent UK), amelyben emelt feszültségű szelén lámpát (Superlamp, Photron, Victoria, Ausztrália) helyeztem el. A mérést a szelén jellemző rezonancia-hullámhosszán (196 nm) multi-reflektancia szűrővel ± 20 nm-es tartományban végeztem. A detektor által kibocsátott jelet analóg-digitális konverteren keresztül számítógépen regisztráltam. A kapott kromatogramok kiértékelése Borwin szoftver (JMBS Developpements, Grenoble, Franciaország) segítségével történt.

4.1.3 A HPLC-HHPN-AFS rendszer analitikai teljesítőképességének vizsgálata

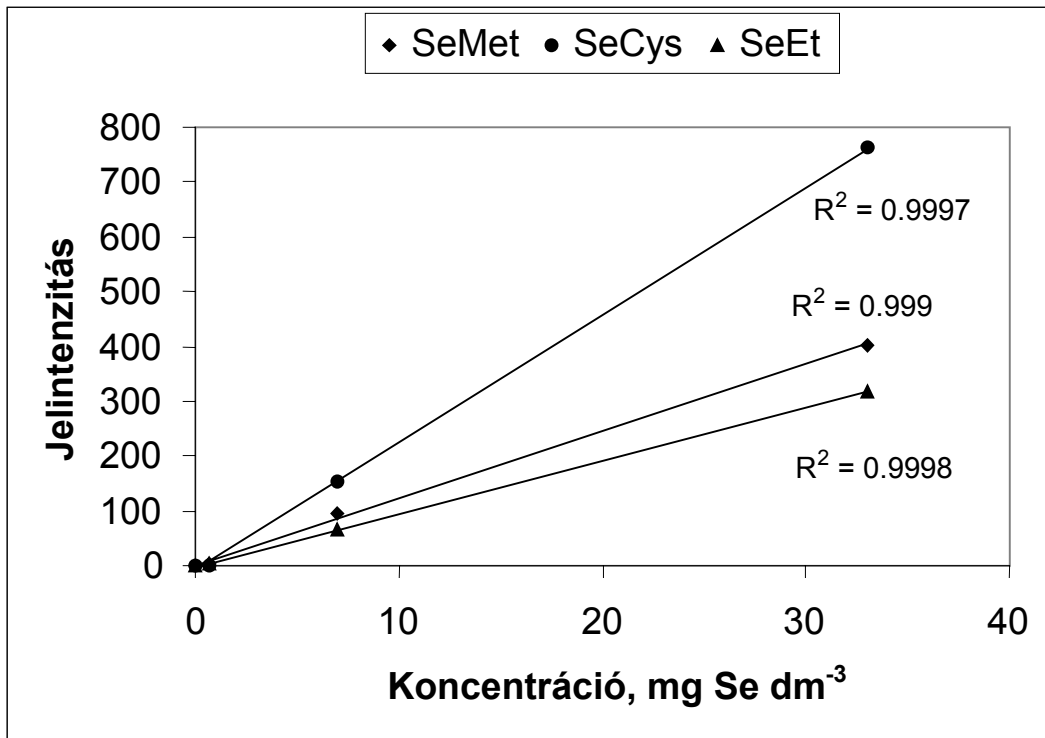
A fent ismertetett optimált paraméterekkel készült kromatogram a **16. ábrán** látható. A módszerrel SeCys₂, SeMet, SeEt, SeIV és SeVI specieszek elválasztása valósítható meg.



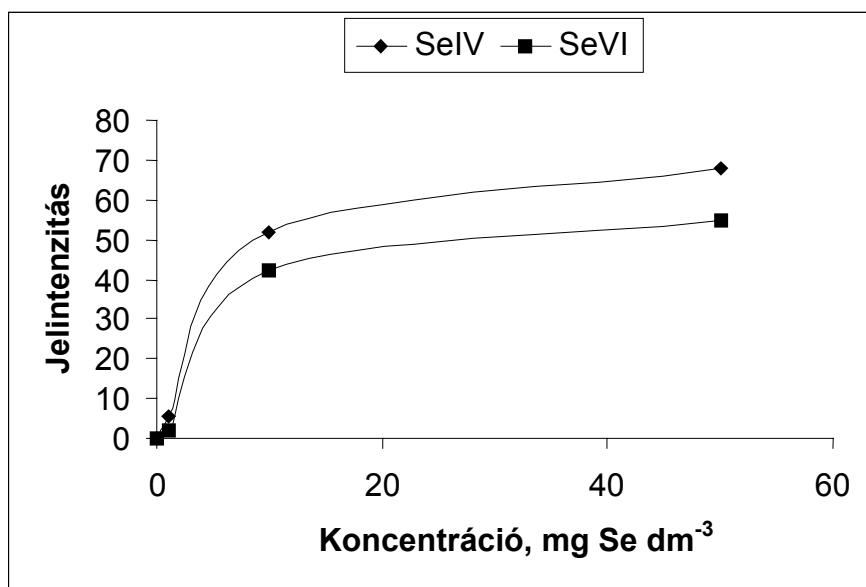
16. ábra

Szelén specieszek elválasztása (25 mg Se/dm^3). Eluens: 0,01 M ammónium-acetát és 0,1 M ammónium-acetát (mindkettőben 0,5 % MeOH és 10^{-5} M DDAB), gradiens elúció, áramlási sebesség 1 ml/min. Oszlop: BST Nucleosil 5 C-18, 250*4 mm.

Az analitikai paraméterek közül először a szelén-specieszek elemzőgörbéjének lineáris tartományát határoztam meg, mivel ez a paraméter igen fontos a mennyiségi meghatározás tervezésénél. Két nagyságrenden keresztül követtem nyomon a szelén-specieszek koncentrációjának és a jelintenzitásnak összefüggését. A kapott eredmények a **17. és 18. ábrákon** láthatók.



17. ábra
Szeleno-aminosavak jelének linearitása HPLC-HHPN-AFS rendszeren



18. ábra
Szervetlen szelénspecieszek jelének linearitása HPLC-HHPN-AFS rendszeren. A lineáris szakasz 10 mg Se dm⁻³ koncentrációig tart

A szeleno-aminosavak a vizsgált koncentráció tartományban (0,5-35 mg Se dm⁻³) lineáris jelet adtak. A szervesetlen szelénspecieszek esetében az összefüggés a jelintenzitás és a koncentráció között a vizsgált koncentráció tartománynak (0,5-50 mg Se dm⁻³) csak egy részében, a tartomány alsó szakaszán 10 mg Se dm⁻³ koncentrációig kaptam lineáris összefüggést. Ebben a koncentráció-tartományban szelenitre R²= 0,9998 ill. szelenátra R²= 0,9978 értékű a lineáris regresszió.

A szervesetlen és szerves specieszek linearitási tartományai között megfigyelt nagyarányú eltérés lehetséges magyarázata, hogy a kis energiájú argon-hidrogén diffúziós lángban a szervesetlen specieszek könnyebben gerjesztődnek, mint a szerves módosulatok, hiszen esetükben nem kell a szerves molekulák disszociációjára energiát fordítani, így az optimális megfigyelési magasságuk is a láng más-más területére esik. A detektor felépítéséből következik, hogy a megfigyelési magasságot nem lehet optimalni, mivel ez a készülék rögzített paramétere. Az AFS detektor észlelési magassága adott kísérleti elrendezés mellett a szerves specieszek mérésére jobban megfelel.

A módszer linearitási szakaszának meghatározása után, a rendszer kimutatási határának megállapítása volt vizsgálatom célja, melynek során az egyes szelénspecieszekre vonatkozóan meghatároztam mind a relatív, mind az abszolút kimutatási határokat. Kimutatási határnak a háttér átlagos jelintenzitásának a szórás háromszorosával megnövelt értékének megfelelő speciesz-koncentrációt vettem, melyet az elemzőgörbékből számítottam ki (3σ kritérium).

3. táblázat A HPLC-HHPN-AFS rendszer kimutatási határai egyes szelén specieszekre

Szelénspeciesz	Kimutatási határ	
	Relatív, mg/dm ³	Abszolút, ng
SeCys ₂	0,18	45
SeMet	0,20	43
SeEt	0,16	33
SeIV	0,13	25
SeVI	0,60	150

Az abszolút kimutatási határ megállapításakor a rendszerbe juttatott összes szelén mennyiségét számítottam ki, amely mennyiség természetesen függ az injektált térfogattól. Az eredményeket a **3. táblázat** tartalmazza.

Az eredményekből látható, hogy a rendszer kimutatási határai nem teszik lehetővé a ng/dm^3 koncentráció tartomány alsó részében történő elemzést. A viszonylag gyengébb kimutatási határ több okra vezethető vissza:

- Egyrészt a rendszer nagy holttere miatt a bejuttatott kis mennyiségű minta jelentősen felhígul, így csökken a detektorba jutó minta koncentrációja, rontva ezzel a kimutatási határt.
- Másrészt a nagy nyomású porlasztó optimális működési paraméterei nem illeszthetők össze az AFS detektor által megkívánt ml/perc nagyságrendű gázáramlási sebességgel, mivel a porlasztót induktív csatolású plazma spektrométerekhez tervezték, ahol a megkívánt vivőgázsebesség jellemzően l/perc tartományban van. Így ebben a kísérleti elrendezésben a porlasztó nagy mintabeviteli hatásfokát csak részben lehet kihasználni.

Az analitikai rendszerek fontos paramétere a mérés ismételhetősége. Mivel az általam használt rendszer egy folyadék kromatográfból és egy atomfluoreszcens detektorból álló kapcsolt rendszer volt, így mind a folyadék kromatográfiás elválasztás, mind az atomfluoreszcens detektor jelének ismételhetőségét vizsgáltam. Ez tulajdonképpen a kromatográfiás elválasztás esetében a retenciós idők, az atomfluoreszcens detektor esetében a csúcsok alatti területek mérésének ismételhetőségének meghatározásából állt, melyet mindkét esetben a mérési eredmények relatív szórásával, tehát az átlagtól való eltérés százalékos kifejezésével jellemeztem. A méréseket olyan koncentrációjú törzsoldatokkal végeztem, melyek a szerves és szervetlen szelénspecieszek esetében is a lineáris mérési tartományba estek és jól mérhető jelet adtak. A kapott eredményeket a **4. táblázat** tartalmazza, zárójelben az adott szelénspeciesz azon koncentrációja látható, amivel az ismételhetőséget vizsgáltam, minden adat 10 párhuzamos mérés eredménye.

4. táblázat A HPLC-HHPN-AFS rendszeren végzett mérés ismételhősége Zárójelben az egyes szelénspecieszek koncentrációja látható

szelénspecieszek	Relatív szórás, %	
	Retenciós idő	Csúcs alatti terület
SeMet (7µg/ml)	0,48	1,7
SeCys (7µg/ml)	0,24	5,7
SeEt (7µg/ml)	0,14	8,5
SeIV (5µg/ml)	0,57	11,8
SeVI (5µg/ml)	0,11	19,9

A rendszer az elválasztást tekintve megfelelő reprodukálhatósággal rendelkezik minden vizsgált szelénspecieszre. A relatív szórás értékei 1 % alattiak, így az egyes specieszek azonosítása nagy biztonsággal elvégezhető. A csúcs alatti területek mérésének ismételhősége a szeleno-aminosavak esetében szintén elfogadható, a szerves szelénspecieszek detektálása viszont nagy relatív szórású különösen a szelenát esetén, melynek oka a nagy retenciós idő és a rendszer viszonylag nagy holtterfoga okozta csúcsalak-torzulás (tailing).

4.1.4 A HPLC-HHPN-AFS rendszer alkalmazása élelmiszer minta speciációs elemzésére

A módszer optimálása után a rendszert élelmiszer minta speciációs elemzésére alkalmaztam, demonstrálva ezzel, hogy a módszer alkalmas napi gyakorlatban is speciációs analitikai problémák megoldására. Választásom a csiperkére esett, amely gomba a legnagyobb mértékben termesztett gombafajta a világon; évi 4 millió tonnát termesztnek belőle. A csiperke szeléntartalmát a talaj szeléntartalma alapvetően befolyásolja. A kísérletben olyan csiperke minta speciációs elemzésére került sor, amely kilogrammonként 10 mg szelenitet tartalmazó táptalajon nőtt. A mintákat Dr. Rácz László bocsátotta rendelkezésünkre (RÁCZ 1998). A mintát a több lépéses enzimes feltárás és az elemzés előtt megőröltem, leszitáltam, és csak a 125 µm-nél kisebb szemcseátmérőjű frakció került elemzésre. Az egyes mintaelőkészítési lépések végén a mintát 15 percig centrifugáltam (Hettich Micro 22R) (3700 g), a felülúszót 0,45 µm-es szűrőn leszűrtem, pH-ját 5,5-re állítottam szükség szerint 1 mol/dm³ koncentrációjú NaOH vagy HCl hozzáadásával, majd 5 ml-re töltöttem fel. Ezek után

elemeztem a mintát a HPLC-HHPN-AFS rendszeren, valamint az összes szeléntartalmat is meghatároztam ICP-AES (ICAP-61, Thermo Jarrel Ash, USA) módszerrel.

A teljes minta-előkészítési folyamat három lépésből állt:

- 1) 200 mg mintához $3,6 \text{ cm}^3$ ioncserélt vizet adtam, majd $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, percenként 200 fordulattal, 3 órán keresztül extraháltam.
- 2) A centrifugálás utáni maradékhoz $3,6 \text{ cm}^3$ 45 mg pepszint tartalmazó $0,05 \text{ mol/dm}^3$ Tris-HCl puffert ($\text{pH}=2,1$) adtam, és $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, 200 fordulattal percenként, 20 órán keresztül rázattam.
- 3) A centrifugálás utáni maradékhoz $3,6 \text{ cm}^3$ 45 mg tripszint tartalmazó $0,1 \text{ mol/dm}^3$ foszfát puffert ($\text{pH}=7,6$) adtam, és $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, 200 fordulattal percenként, 20 órán keresztül rázattam.

Az utolsó centrifugálás utáni maradék a következő minta-előkészítési lépésbe került. Az utolsó lépés után a maradékot 2 cm^3 tömény sósav és 2 cm^3 tömény salétromsav elegyében $100 \text{ }^\circ\text{C}$ -on 20 percig roncsoltam, majd az összes szeléntartalmat ICP-AES módszerrel mértem. Az egyes specieszek azonosításának ellenőrzésére ún. „spiking” eljárást alkalmaztam, amely eljárást az Európai Unió által szervezett körvizsgálat előírásának megfelelően végeztem el (GONZÁLEZ 1998): Egy gramm mintához 3 cm^3 ioncserélt vizet adtam és 30 percen keresztül rázattam. Ezután 3 cm^3 multielemes törzsoldatot adtam a mintához, amely $75 \text{ } \mu\text{g}$ szelenátot, szelenitet, SeCys_2 és SeEt specieszt tartalmazott. A mintát $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, 200 fordulattal percenként, 20 órán keresztül rázattam. Az eljárás végén a maradék nedvességet $100 \text{ cm}^3/\text{min}$ áramlási sebességű argon gázzal távolítottam el, miközben a mintát $50 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, 180 fordulattal percenként, 30 órán keresztül rázattam. A nedvesség eltávolítása után folyékony nitrogénben lefagyasztottam a mintát, majd megőröltem, szitáltam és a $125 \text{ } \mu\text{m}$ -nél kisebb szemcseátmérőjű frakciót használtam fel az elemzéshez.

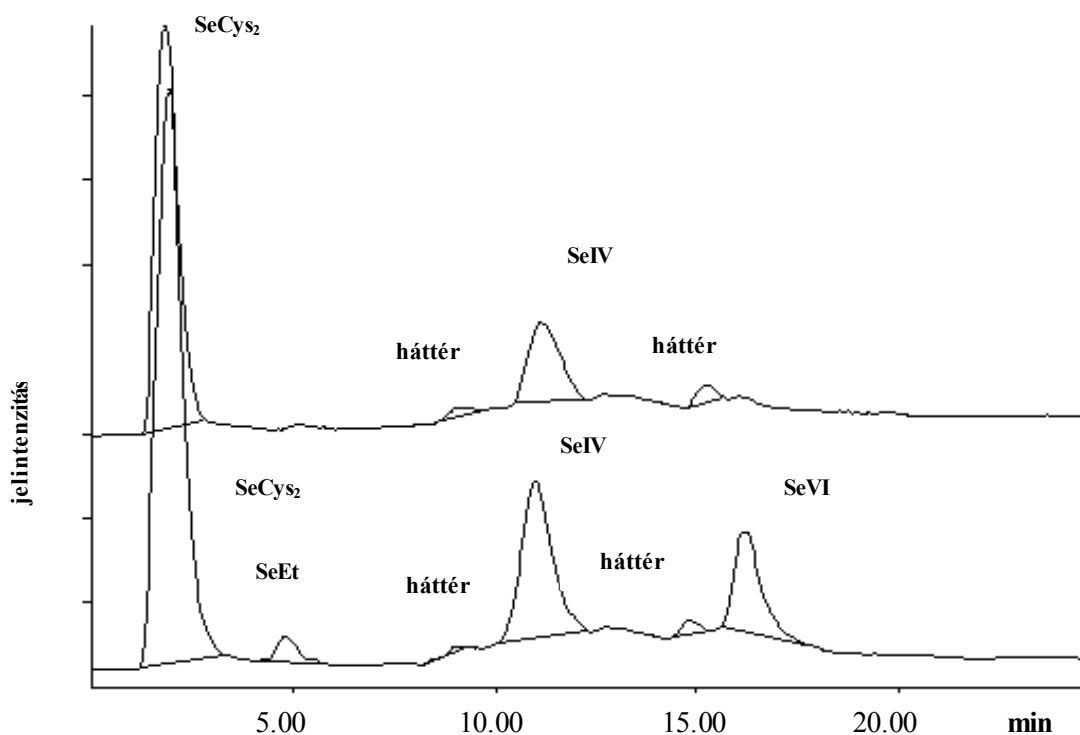
A speciációs analitika egyik központi kérdése a specieszek azonosítása, ugyanis a mintamátrix ill. a minta-előkészítési eljárások a retenciós idő változását okozhatják a módszerfejlesztéshez használt szintetikus oldatokhoz képest, ill. jelentős háttérjelet produkálhatnak, rontva ezzel az azonosítás megbízhatóságát. A mintamátrix okozta háttér vizsgálatára egy alacsony szeléntartalmú minta elemzését is elvégeztem ($4,3 \text{ } \mu\text{g Se/g}$ minta) ugyanolyan minta-előkészítést alkalmazva, mint a szelénrel dúsított minta esetén.

Az alacsony szeléntartalmú minta kromatogramjain, mindhárom minta-előkészítési lépés után detektálható jeleket kaptam, melyek nagy valószínűséggel nem a minta, vagy a vegyszerek szeléntartalmából eredtek, ugyanis:

- 1) Analitikai minőségű vegyszereket használtam az egész elemzés során, melyek szelén tartalma nem okozhatott mérhető jelet a rendszerben.
- 2) Az enzimek szeléntartalma 0,25 µg Se/g alatti volt.
- 3) A minta esetén 25-szörös hígítást használtam, így a minta szeléntartalma a HPLC-HHPN-AFS rendszer kimutatási határa alá esett, mindegyik vizsgált speciesz esetében.
- 4) Arzén vájtkatód lámpa használata esetén is megfigyelhetők voltak a jelek.

Ha a vájtkatód lámpát kikapcsoltam a háttérjelek nem voltak észlelhetők, melynek magyarázata lehet, hogy a láng energiája önmagában nem elégséges a megfigyelt emisszió létrehozására. A jelenséget előidézhetik a detektorlángba esetlegesen bekerülő molekulák, melyek a vájtkatód lámpa gerjesztésének hatására a detektor által leképezett hullámhossz intervallumban emittálnak (SYCHRA 1975).

Kísérletemben a minta-előkészítés okozta retencioidő-változás meghatározására a fent ismertetett „spiking” eljárást alkalmaztam. A **19. ábrán** láthatók a vizes extrakció kromatogramjai, melyek jól mutatják a vizsgálat eredményét. Az ábra felső részén a szelénrel dúsított minta „spiking” előtti, az alsón a „spiking” utáni kromatogramja látható. A mintában található specieszek csúcsterülete egyértelműen megnövekedett a „spiking” utáni kromatogramon, anélkül, hogy a csúcs bárminemű torzulást szenvedett volna. A mintához a „spiking” során hozzáadott, de abban eredetileg nem megtalálható specieszek csúcsai is jól detektálhatók a kromatogramon, míg a mátrix okozta csúcsok területei nem változtak a vizsgálat során. A vizsgálat bebizonyította, hogy az alkalmazott minta-előkészítés nem befolyásolja a specieszek retenciós idejét.



19. ábra

Csiperke minta vizes extrakció utáni kromatogramjai, „spiking” nélkül (felső ábra) és „spiking” után (alsó ábra)

A minőségi meghatározás kontrollja után a mennyiségi kiértékelés megfelelőségének vizsgálatát is elvégeztem, az eredményeket az **5. táblázat** tartalmazza. Mivel a mintaelőkészítési eljárás kidolgozása, és annak kritikai értékelése egy másik doktori munka témája, a táblázatban csak a három lépéses extrakciós eljárás összesített eredményeit mutatom be, a részletes eredmények Dernovics Mihály PhD értekezésében található ill. szakmai folyóiratban már publikálásra kerültek (STEFÁNKA 2001, DERNOVICS 2003).

A vizsgálatot a fent ismertetett „spiking” eljárással végeztem, a speciációs elemzésre került mintákat minden esetben ICP-AES módszerrel is elemeztem, valamint szintén ICP-AES technikával és a fent leírt $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ elegyet alkalmazó roncsolást követően meghatároztam a minta összes szeléntartalmát.

Bár e dolgozatnak nem célja különböző speciációs minta-előkészítési technikák összevetése, annyit mindenképpen meg kell állapítani, hogy a táblázatban látható 67 %-os kinyerési hatások speciációs analitikában igen jónak mondható. A „spiking” utáni 99 %-os hatások annak köszönhető, hogy a mesterségesen a mintához adott specieszek közel 100 %-os

hatásfokkal extrahálhatóak voltak, mivel csak felületi adszorpcióval kötődnek a minta részecskéihez, így százalékban kifejezve jobb kinyerési hatásfok adódott ez után a lépés után. Az alacsony szeléntartalmú gombában a „spiking” után minden speciesz koncentrációját az elméleti értéktől 6%-nál kisebb eltéréssel határoztam meg. A szelénnel dúsított csiperkében nem található szelenát és SeEt „spiking” utáni mennyiségét 7-10 százalékos eltéréssel sikerült meghatározni. A szelenit és SeCys₂ esetén az elméleti értéktől való eltérés viszonylag nagy volt, amely a minta inhomogenitásával magyarázható, hiszen az alacsony szeléntartalmú minta esetén nagyon jó visszanyerési hatásfokokat kaptam.

5. táblázat Szelénnel dúsított csiperke speciációs elemzésének eredményei, zárójelben az elméleti szelénkoncentrációk láthatók

Minta	HPLC-HHPN-AFS µg Se/g					ICP-AES µg Se/g	Összes szelén- tartalom µg Se/g	Kinyerési hatásfok %	
	SeCys ₂	SeEt	Se(IV)	Se(VI)	Sum				
Szelénnel dúsított csiperke „spiking”előtt	27,7	<D.L.	46,4	<D.L.	74,1	83,0 ^a	110,2 ^b	67 ^c	75 ^d
Szelénnel dúsított csiperke „spiking”után	116,5 (102,7)	68,0 (75,0)	151,7 (121,4)	69,9 (75,0)	406,0 (374,1)	372,6 ^a (383,0)	410,2 ^b	99 ^c	91 ^d
Alacsony szeléntartalmú csiperke „spiking”után	78,3 (75,0)	78,9 (75,0)	79,0 (75,0)	79,4 (75,0)	315,6 (300,0)	292,2 ^a (300,0)	304,2 ^b	103 ^c	96 ^d

a: A 3 lépéses minta-előkészítés utáni Se-tartalom ICP-AES módszerrel meghatározva

b: A HNO₃/H₂O₂ roncsolás utáni Se-tartalom

c: A speciáció eredményeiből számított kinyerési hatásfok

d: Az ICP-AES elemzés eredményeiből számított kinyerési hatásfok

4.1.5 Összefoglalás

A fent ismertetett munkában először írtam le olyan speciációs rendszert, amely HPLC-HHPN-AFS kapcsoláson alapul, és három szeleno-aminosav valamint két szervetlen szelén speciesz meghatározására alkalmas. A rendszer optimalása után megállapítottam annak analitikai teljesítő képességét. Kritikailag értékeltem a módszer korlátait speciációs analitikai felhasználás során. Fontos megjegyezni a komplex mintamátrix okozta háttér jelenségét, amit eddig az irodalomban ilyen kísérleti elrendezés mellett nem dokumentáltak. Ez megnehezíti a minta specieszeinek azonosítását, és körültekintő háttérkorrekciót tesz szükségessé. Mivel szelén specieszekre jelenleg nincs kereskedelmi forgalomban kapható hiteles anyagminta a

mennyiségi és minőségi kiértékelés ellenőrzésére „spiking” módszert használtam. Az eredmények értékelése után megállapítható hogy az elvégzett vizsgálat mind a minőségi mind a mennyiségi kiértékelés esetén kielégítő eredményt adott, így egyértelműen kijelenthető, hogy a kidolgozott HPLC-HHPN-AFS módszer valódi mintákban is alkalmas speciációs feladatok megoldására.

4.2 Nagy hatékonyságú folyadék-kromatográfia és atomfluoreszcens spektrometria kapcsolása hidridfejlesztéssel, HPLC-HG-AFS rendszer

Mivel az irodalomban nem található adat a szeleno-aminosavak közvetlen, előzetes kezelés nélküli hidridképzésére, az e fejezetben ismertetett munka célja, elsősorban olyan módszer kifejlesztése volt, amely alkalmas SeCys₂, SeMet és SeEt közvetlen hidridképzéssel történő meghatározására. Továbbá cél volt e módszer alkalmazhatóságának vizsgálata, melyet szeléntartalmú táplálék-kiegészítő készítmény speciációs elemzésének eredményein keresztül mutatok be.

4.2.1 Felhasznált eszközök és vegyszerek

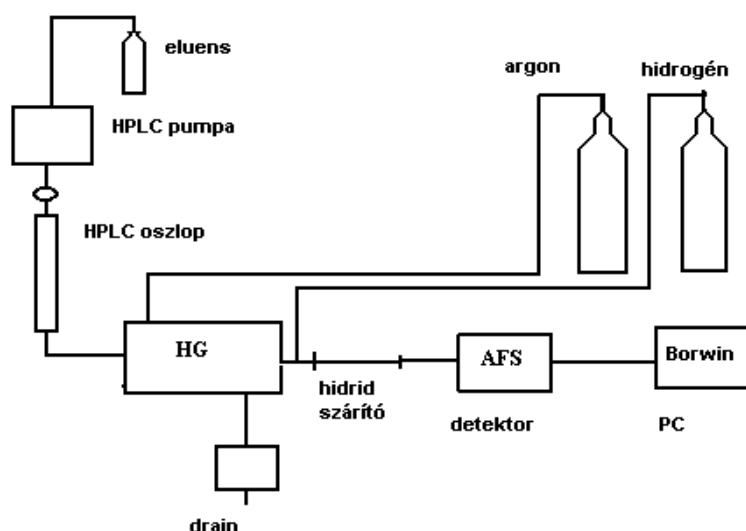
A HPLC-HG-AFS rendszer kifejlesztéséhez, az analitikai teljesítőképesség megállapításához valamint a szeléntartalmú táplálék-kiegészítő készítmény elemzéséhez felhasznált eszközök és vegyszerek közül azokat sorolom fel, melyek az előző részben ismertetettektől eltérnek.

A szelénspecieszek elválasztása LiChroCART 125-4 oszlopon történt, amely LiChrospher 100 RP-18 szilikagél állófázissal volt töltve (Merck, Darmstadt, Németország). Az eluens áramlását egy négy szívócsonkkal ellátott Merck pumpa (Hitachi, L-7100) biztosította amely a mintabejuttató-egységgel (LMIM, Budapest, Magyarország) összekapcsolva a mintát az oszlopra juttatta. Vizsgálataim során 100 µl térfogatú mintabejuttató hurkot használtam.

A sósavat és nátrium-tetrahydroborátot egy többcsatornás perisztaltikus pumpával (Rainin Instruments, Woburn, MA, USA) szállítottam a PEEK-ből készült reakciókamrába, ahonnan a mintával együtt egy házilagosan készült gáz-folyadék- szeparátorba jutott. Az AFS detektor és a gáz-folyadék-szeparátor közé egy Perma Pure gyártmányú hidrid-szárítót helyeztem (Perma Pure Products, Farmingdale, NJ, USA). A szárító egy duplafalú „cső a csőben” szerkezet, melynek belső csöve vízáteresztő membrán. A külső köpenyben áramló száraz argon gáz és a belső csőben áramló nedvesebb gáz között fennálló gradiens hatására a nedvességtartalom a membránon keresztül átdiffundál a köpenyben áramló szárítógáz felé. A gáz-folyadék-szeparátorból a szelénhidridet argonnal üztem ki, melyhez a hidridszárító után hidrogént kevertem. Ez a gázelegy alkotta a detektorban az atomizáláshoz szükséges lángot. Mindkét gáz térfogatáramát Cole-Parmer rotaméterrel mértem (Niles II, USA).

Az eluens készítéséhez szükséges DDAB (didodecil-dimetil-ammónium-bromid) oldatot Realsonic RS-16 F típusú ultrahangos készülékkel homogenizáltam.

A HPLC-HG-AFS rendszer sematikus felépítését az **20. ábra** mutatja.



20. ábra

HPLC-HG-AFS rendszer felépítése

Minden felhasznált vegyszer analitikai tisztaságú volt. A törzsoldatok készítéséhez szeleno-DL-metionint (SeMet), szeleno-DL-etionint (SeEt) és szeleno-DL-cisztint (SeCys₂) használtam (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). A kiindulási oldatok mindhárom szelénspeciesz esetén szelénre nézve 100 mg dm⁻³ töménységűek voltak. A szelenit esetén a törzsoldatot 1000 mg dm⁻³ atomabszorpciós törzsoldatból (Merck, Darmstadt, Németország) készítettem, tízszeres hígítással.

A nátrium-tetrahydroborát-oldatot (NaBH₄) naponta frissen készítettem úgy, hogy 2 m/v%-os nátrium-hidroxid (Merck, Darmstadt, Németország) oldatban annyi NaBH₄-ot oldottam fel, hogy 4 m/v%-os oldatot kapjak. A sósavoldatot 2 m/v%-os töménységűre készítettem, 37% sósavoldatból (Merck, Darmstadt, Németország) hígítással.

Az eluens 0,01 mol dm⁻³ koncentrációjú ammónium-acetát-oldat volt (Merck, Darmstadt, Németország), amely 0,5 v/v% metanolt (Carlo Elba, Milánó, Olaszország) és 10⁻⁵ mol dm⁻³ didodecil-dimetil-ammónium-bromidot tartalmazott. Az eluens pH-ját ecetsavval 4,0 értékre állítottam. Minden oldat készítéséhez ioncserélt vizet használtam (Elga Ltd., High Wycombe Bucks, Anglia; R> 10 MΩ).

4.2.2 Az elválasztás optimalása

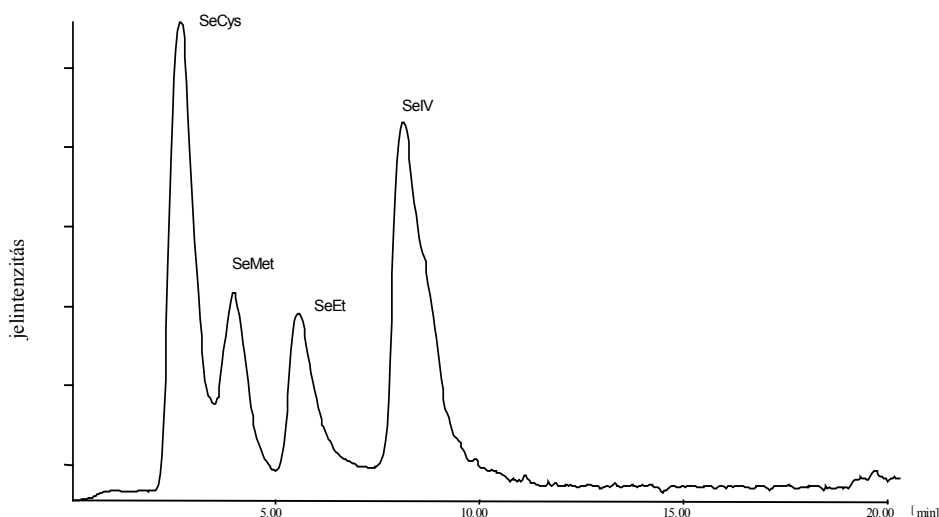
A módszerfejlesztés első lépése a kromatográfias elválasztás kidolgozása volt.

Az elválasztást az előző alfejezetben ismertetett munka eredményeit felhasználva dolgoztam ki. A vizsgált négy szelén speciesz elválasztásához nincs szükség gradiens elúcióra, így

izokratikus körülmények között csak az áramlási sebességet változtatva a **6. táblázatban** látható elúciós programot dolgoztam ki, mellyel az elválasztás időtartama 10 percre csökkenthető. Az így készített standard kromatogram a **21. ábrán** látható.

6. táblázat HPLC elúciós program SeCys, SeMet, SeEt és SeIV elválasztásához

Lépcső sorszáma	Időtartam, perc	Eluens áramlási sebessége, ml min ⁻¹
1	0-3,5	0,5
2	3,6-5	1,0
3	5,1-10	1,5



21. ábra

SeCys, SeMet, SeEt és SeIV kromatogramja a 6. táblázat programja szerint

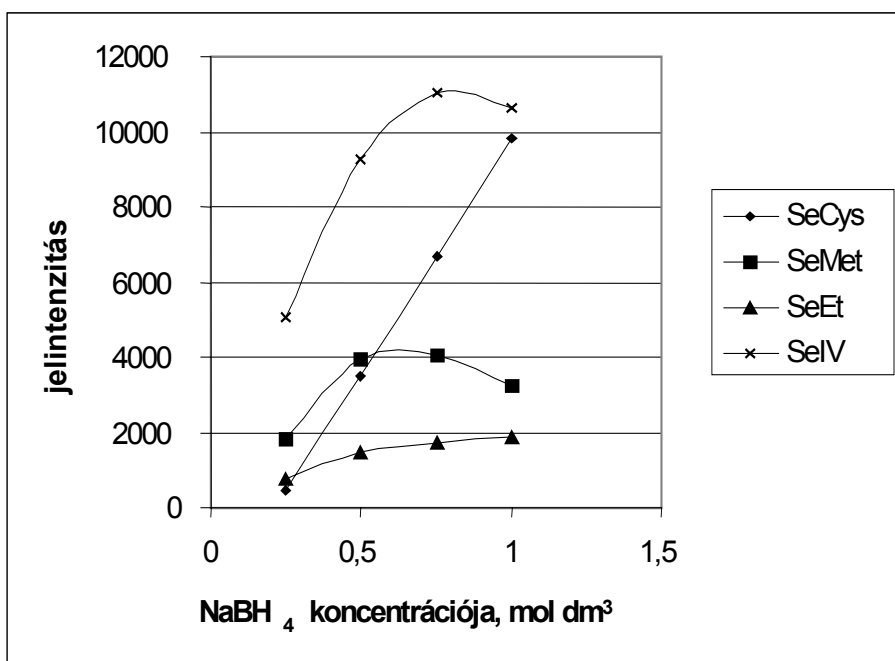
4.2.3 A hidridfejlesztés paramétereinek optimálása

A speciációs analitikában használatos kromatográfiai rendszerek és detektorok egymáshoz kapcsolása igen fontos kérdés, mert alapvetően meghatározza a detektorba jutó mintamennyiséget. Ezért a derivatizációs eljárást úgy szükséges megválasztani, hogy az a lehető legjobb mintabeviteli hatásfokkal rendelkezzen. Az általánosan használatos porlasztók hatásfoka 2-3 %-os, ez indokolta egy új, eddig nem próbált mintabeviteli technika, a szelenoaminosavak közvetlen, előzetes kezelés nélküli hidridfejlesztésének alkalmazását.

A keletkezett hidrid mennyiségét és így a jelintenzitást befolyásoló tényezők közül az optimalálás során a hidridképzéshez felhasznált nátrium-borohidrid és sósav koncentrációját vizsgáltam.

A sósavkoncentráció hatását 1-3 mol dm⁻³ koncentráció-tartományban vizsgáltam. Az optimális koncentráció 2 mol dm⁻³ volt. 1 mol dm⁻³-nél az elválasztást nem lehetett kivitelezni, és a jelintenzitás 60%-kal csökkent. A 3 mol dm⁻³ koncentrációnál az elválasztás megegyezett a 2 mol dm⁻³ sósav-koncentrációnál tapasztalattal, de 30%-os jelintenzitás-csökkenést tapasztaltam.

A nátrium-borohidrid mennyiségének hatását a fluoreszcens jel nagyságára a **22. ábra** mutatja. Az optimalálást 0,25-1 mol dm⁻³ nátrium-borohidrid koncentrációval végeztem. SeCys₂ jelintenzitása az egész vizsgált tartományban nőtt, míg a többi speciesz válaszjele 0,75 mol dm⁻³ koncentrációt követően jelentősen csökkent. Így az optimális koncentrációt 0,75 mol dm⁻³-nek választottam.



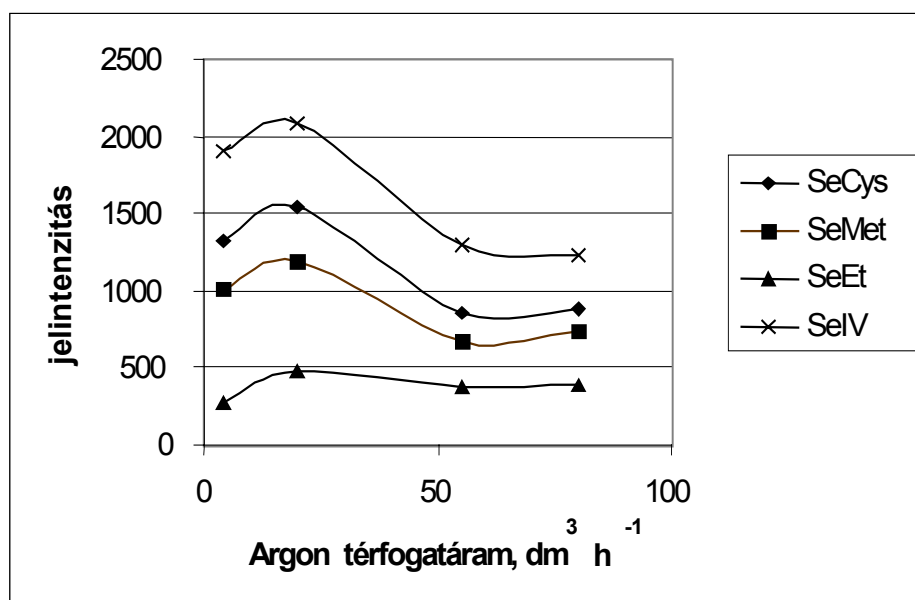
22. ábra

A nátrium-borohidrid mennyiségének hatása a fluoreszcens jel nagyságára. A szelénspecieszek koncentrációja 1 mg Se dm⁻³

Az optimalálás következő lépése során mind a gáz-folyadék szeparátorba bevezetett argon, mind a hidridszárító után a rendszerbe vezetett hidrogén térfogatáramának jelintenzitásra gyakorolt hatását nyomon követtem.

A hidrogén térfogatáramának vizsgálata során nem tapasztaltam jelentős változást a jelintenzitásban.

Az argon szerepe kettős a rendszerben: egyrészt a gáz-folyadék-szeperatorban keletkezett hidrid kihajtásáért felelős, másrészt a hidrogénnel keveredve az atomizálást végző lángot alkotja. Mivel a detektor rögzített észlelési magassággal dolgozik, ez utóbbi funkció sem elhanyagolandó, ugyanis az argon térfogatárama nagy mértékben befolyásolja a láng geometriáját (nagyobb térfogatáramnál a láng hígul és megváltozik az optimális észlelési magasság is), és így a kapott jel intenzitását. A vizsgált térfogatáram-tartomány $4\text{--}80\text{ dm}^3\text{ h}^{-1}$ volt. Az argon térfogatáramának hatását a fluoreszcens jel nagyságára a **23. ábra** mutatja. Az optimális érték $20\text{ dm}^3\text{ h}^{-1}$ volt.



23. ábra

Az argon térfogatáramának hatása a fluoreszcens jel nagyságára. A szelénspecieszek koncentrációja 1 mg dm^{-3}

4.2.4 A hidridképzés határfokának vizsgálata

Mielőtt ezen alfejezet tárgyának ismertetésére rátérnék előre kell bocsájtanom, hogy a hidridképzési reakció során a szeleno-aminosavakból képződő illékony szelén specieszek szerkezetét eddig nem határozták meg, és doktori munkám során nekem sem volt lehetőségem szerves tömegspektrometriás mérésekkel a specieszek struktúrájának meghatározását elvégezni. Ezért disszertációmban az eljárás elnevezéséből kiindulva hidridképzésről illetve

annak hatásfokáról beszélek, annak ellenére, hogy a reakció során a szelén-hidrid kizárólagos keletkezése nem bizonyított.

A hidridképzés hatásfoka nagymértékben befolyásolja a kapott atomfluoreszcens jel nagyságát. Mivel irodalmi adatok nem álltak rendelkezésre a szeleno-aminosavak közvetlen hidridképzéséről, szükséges volt a hatásfok megállapítása.

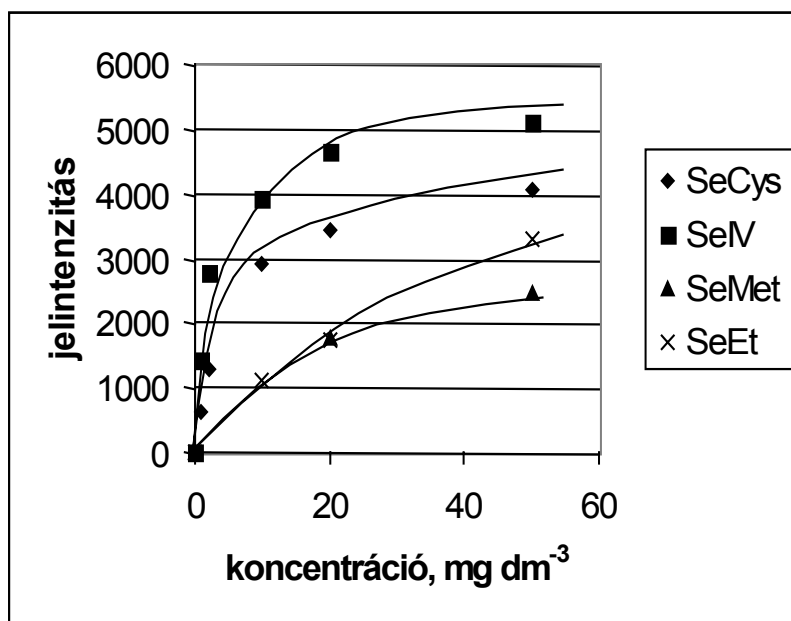
A vizsgálat úgy zajlott, hogy a rendszerbe ismert koncentrációjú szelénspeciesz-oldatot juttattam egy perisztaltikus pumpával, pontosan mért ideig és térfogatárammal, mialatt a gáz-folyadék-szeperatorból eltávozó draint felfogtam. A drain szeléntartalmát Thermo-Jarrel-Ash ICAP-61 induktív csatolású plazma spektrométerrel mértem. A kapott eredményekből számítottam ki a hidridképzési hatásfokot, melyeket a **7. táblázat** mutat (az RSD érték minden szelén-speciesz esetében $\pm 3\%$ alatti). Az eredményekből következik, hogy a szeleno-aminosavak közvetlen (előzetes kezelés nélküli) hidridképzésekor a szeléntartalom csak kis része alakul át illékony szelén vegyületté. A mintabeviteli hatásfok viszont így is jelentősen meghaladja az átlagos pneumatikus porlasztók hatásfokát.

7. táblázat Szelén-specieszek hidridképzési hatásfoka

Szelén-speciesz	Hidridképzés hatásfoka, %
SeCys	25
SeMet	18
SeEt	6
SeIV	92

4.2.5 Analitikai teljesítő képesség vizsgálata

A rendszer optimális paramétereinek mellett felvett elemzőgörbék linearitását a **24. ábra** mutatja. A linearitást $0,1-50 \text{ mg dm}^{-3}$ koncentrációtartományban vizsgáltam. A szelén specieszek esetében nem tapasztaltam egy korábbi munka során arzén specieszeknél megfigyelt önabszorpciót (MESTER 1997). A lineáris tartomány minden szelén-speciesz esetében $1,5$ nagyságrendnyi volt.



24. ábra

Szelén-specieszek elemzőgörbéje

A kimutatási határt a 4.1.3 alfejezetben leírt módon határoztam meg (3σ kritérium). Az így megállapított kimutatási határokat - összevetve az előző alfejezetben ismertetett HPLC-HHPN-AFS rendszerrel - a **8. táblázat** tartalmazza.

8. táblázat Egyes szelén-specieszek kimutatási határa HPLC-HG-AFS rendszeren

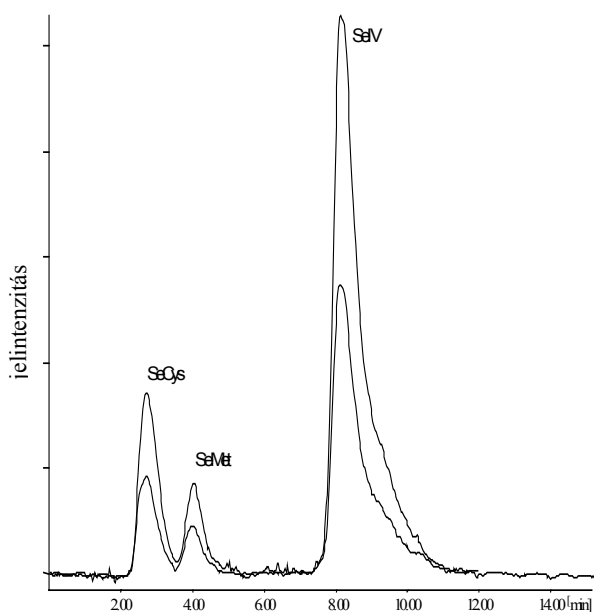
Szelén speciesz	Kimutatási határ, $\mu\text{g dm}^{-3}$	
	HPLC-HHPN- AFS	HPLC-HG-AFS
SeCys ₂	180	18
SeMet	200	70
SeEt	160	96
SeIV	130	16

4.2.6 Valódi minták szelén speciációja HPLC-HG-AFS rendszerrel

A rendszer optimalizálása és analitikai teljesítő képességének szintetikus oldatokkal történő meghatározása után a rendszer által szolgáltatott információ pontosságát is ellenőriztem, valódi minta speciációs elemzésével. A pontosság ellenőrzésére bizonylatolt hiteles anyagminta hiányában az előző alfejezetben is használt „spiking” eljárást alkalmaztam. A minta szelén tartalmú táplálékkiegészítő tabletta volt. Az eljárás során vizes extrakciót alkalmaztam a szelén specicszek kinyerésére a mintából, a következőkben leírtak szerint:

Egy tabletta mintához $3,6 \text{ cm}^3$ ioncserélt vizet adtam, majd $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, percenként 200 fordulattal, 3 órán keresztül extraháltam. Majd a mintát 15 percig centrifugáltam (Hettich Micro 22R, 3700 g), a felülúszót $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ -es szűrőn leszűrtem, és 5 cm^3 térfogatra töltöttem fel. Az így előkészített minta került elemzésre a HPLC-HG-AFS rendszeren.

A „spiking” eljárás során a centrifugálás után többelemes standard oldatot adtam az extraktumhoz, amely 125, 100 és $250 \text{ }\mu\text{g}$ -mal növelte meg dm^3 -enként az extraktum SeCys_2 -, SeMet - és szelenit-tartalmát.



25. ábra

Szelén tartalmú táplálék-kiegészítő kromatogramja. Az alsó ábra a „spiking” előtti a felső a „spiking” utáni eredményt mutatja

A **25. ábrán** látható a minta kromatogramja és a „spiking” utáni kromatogram. A három komponens elúciós sorrendben a következő: SeCys_2 , SeMet , szelenit. A kromatogram jól

mutatja, hogy a minta komponensei megegyeztek az addicionált standardokkal. A koncentráció-növeléssel előidézett csúcsnövekedés is jól látható, a csúcsok alakjának deformálódása nélkül. Ezen eredmények ismeretében kijelenthető, hogy a minőségi kiértékelés megfelelő.

A mennyiségi kiértékelés ellenőrzésére kiszámoltam az egyes specicszek kinyerési hatásfokát, melyeket a **9. táblázat** tartalmaz.

9. táblázat A mennyiségi meghatározás vizsgálatának eredményei

Szelén specicsz	Eredeti konc. $\mu\text{g dm}^{-3}$	Hozzáadott konc. $\mu\text{g dm}^{-3}$	Visszanyerés hatásfoka, %
SeCys	122±12	125	91,7 ± 3,1
SeMet	106±7	100	90,2 ± 4,6
SeIV	248±11	250	104,9 ± 5,3

A táblázat második oszlopa tartalmazza a táplálék-kiegészítőben talált szelén specicszek koncentrációit. A mennyiségi kiértékelés vizsgálata során a „spiking” eljárást úgy végeztem el, hogy a mért specicsz-koncentrációk körülbelül a kétszeresükre növekedjenek. Vagyis olyan mennyiségű standard oldatot adtam a mintához, amely 125, 100 és 250 μg -mal növelte meg dm^3 -enként az extraktum SeCys-, SeMet- és szelenit-tartalmát. A visszanyerési hatásfokok minden esetben 90 % felettiék. Szelenit esetén a hatásfok túllépi a 100 %-ot, de a bizonytalanság értékét figyelembe véve láthatjuk, hogy az intervallum része a 100 %, vagyis a visszanyerési hatásfok elfogadható.

4.2.7 Összefoglalás

A fent ismertetett munkában olyan új eljárást dolgoztam ki, amely lehetővé teszi szeleno-aminosavak és szelenit nagy érzékenységű meghatározását, az irodalomban előttem nem ismertetett előzetes kezelés nélküli hidridfejlesztést alkalmazva.

Munkámban egy olyan speciációs analitikai módszert fejlesztettem ki, amely mind az elválasztás mind a detektálás paramétereiben megfelel a gyakorlati analitikai követelményeknek. Mivel az eljárás során a szeleno-aminosavakból előzetes kezelés nélkül

fejleszhető hidrid, a rendszer lényegesen egyszerűbben kezelhető, üzemeltetése olcsóbb. Bár a hidridképzés hatásfoka elmarad a száz százaléktól, a rendszer mintabeviteli hatásfoka a hagyományos porlasztásos mintabevitel hatásfokát meghaladja. A módszert szeléntartalmú táplálék-kiegészítő készítmény speciációs elemzésére alkalmaztam, és megállapítottam, hogy mind a minőségi mind a mennyiségi meghatározás szempontjából megfelel az analitikai módszerekkel szemben támasztott követelményeknek.

4.3 Nagy hatékonyságú folyadék-kromatográfia és atomfluoreszcens spektrometria kapcsolása előzetes roncsolással kombinált hidridfejlesztéssel, HPLC-TD-UV-HG-AFS rendszer

Az előző alfejezetben ismertetett közvetlen hidridfejlesztésen alapuló módszer megfelelő ugyan speciációs elemzésekhez, de a módszer nagy hátránya, hogy szelenát mérése nem oldható meg segítségével, valamint a szerves szelén specieszek hidridképzési hatásfoka messze elmarad a száz százaléktól. Ezen tények felvetik a módszerben rejlő, eddig kiaknázatlan lehetőségek felszínre hozásának jogos igényét. Ez csak előzetes roncsoló, redukáló lépés (termikus roncsolás, thermal digestion, TD és ultraibolya besugárzás ultraviolet irradiation, UV) alkalmazásával lehetséges. Az itt bemutatandó munka egy ilyen módszer kifejlesztésére koncentrált, a módszer optimalálása után és az analitikai teljesítő képesség meghatározását követően a módszert sikeresen alkalmaztam brazil dió minták szeléntartalmának speciációs elemzésére.

4.3.1 Felhasznált vegyszerek és eszközök

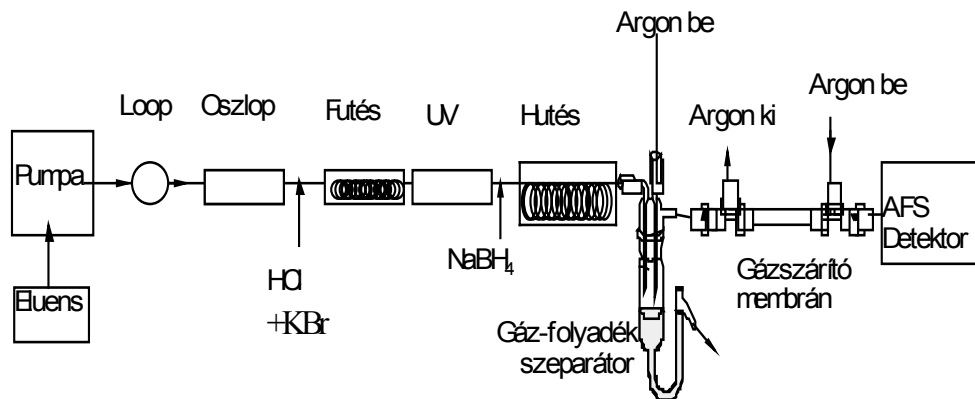
A felhasznált eszközök és vegyszerek közül csak azokat sorolom fel, melyeket az előző alfejezetekben még nem ismertettem.

Minden felhasznált vegyszer analitikai tisztaságú volt. A kromatográfias elválasztáshoz szükséges eluens összetevői a következők voltak: ammónium-hidrogén-karbonát (Riedel-de Haen, Seelze, Németország), tömény hangyasav (Reanal, Budapest, Magyarország), HPLC tisztaságú metanol (Carlo Erba, Milánó, Olaszország), tetrabutil-ammónium-acetát (TBAA; Sigma).

A hidridfejlesztéshez a Merck cég által gyártott sósavat, valamint kálium-bromidot (Reanal), nátrium-borohidridet (Sigma) és nátrium-hidroxidot (Reanal), a minta-előkészítéshez kálium-dihidrogén-foszfátot (Reanal), dikálium-hidrogén-foszfátot (Reanal) és pronáz enzimet (4000 U/mg; Merck) használtam.

A szelén-specieszek elválasztása LiChroCART 250-4 oszlopon történt, amely LiChrospher 100 RP-18 szilikagél állófázissal volt töltve (Merck, Darmstadt, Németország).

Az oszlopot követően a minta a termikus roncsolóba jut, ami egy szilikonolajjal töltött edény, melyben az olaj hőmérsékletét kontakthőmérő által szabályozott fűtőszál biztosítja. Az egyenletes hőeloszlásról egy beépített keverő gondoskodik. A berendezés arra a célra szolgál, hogy a mintát adott hőmérsékletre melegítse, illetve azon tartsa meghatározott ideig, abból a célból, hogy az előzetesen adagolt sósav és kálium-bromid a mintában lévő szelenátot szelénitá redukálja. Az eszköz további előnye, hogy a következő lépésben szereplő UV roncsoló hatásfokát javítja.



25.ábra
A HPLC-TD-UV-HG-AFS rendszer felépítése

A készülék következő része egy alacsony nyomású higany lámpa, amelyre 2 méter hosszúságú tefloncső van spirálisan feltekerve. Az UV sugárzással ($\lambda = 253,7$ nm) a szelena-aminosavak roncsolása végezhető el, javítva a szerves szelén specieszek hidridképzési hatásfokát.

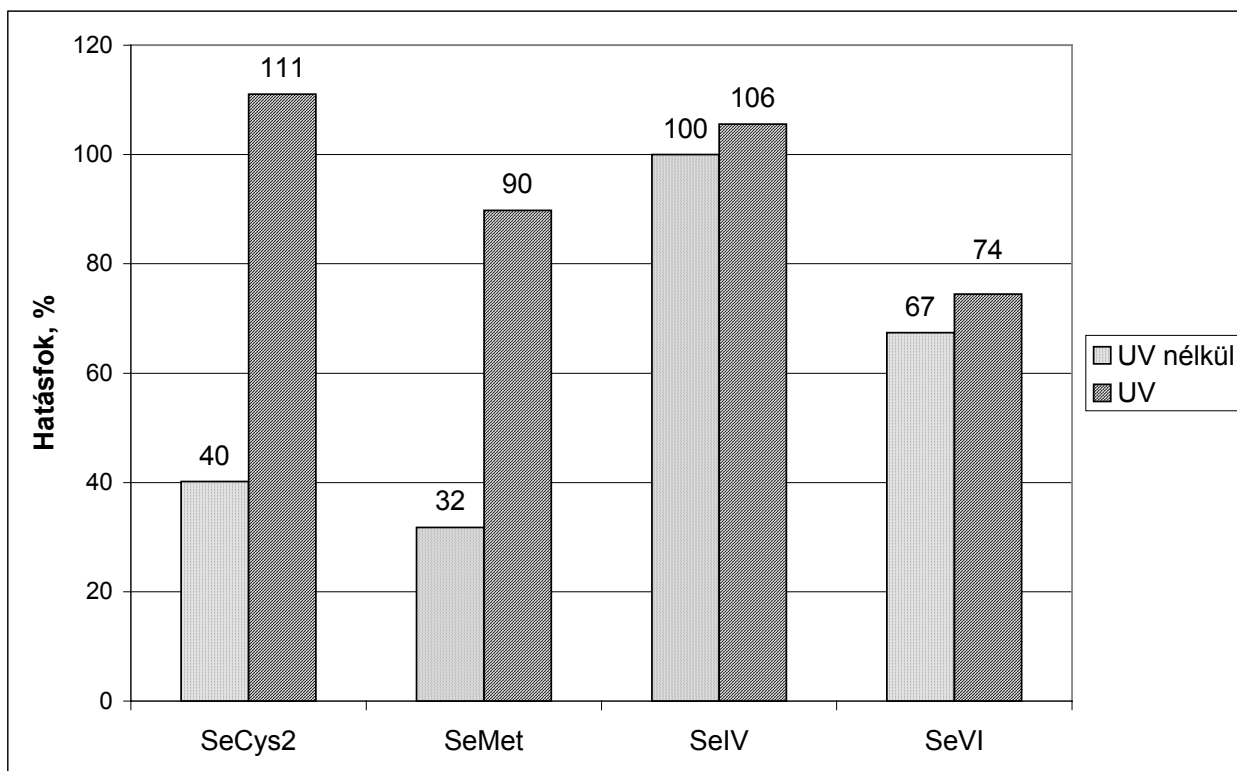
A hidridfejlesztés sósavas közegben nátrium-borohidrid segítségével megy végbe. A nátrium-borohidridet a sósavhoz hasonlóan többcsatornás perisztaltikus pumpa (Rainin Instruments, Woburn, MO, USA) szállítja az UV roncsolóból érkező mintához. A reakciópartnerek összekeverése egy poliéter-éter-ketonból (PEEK) készült néhány ml térfogatú reaktorban történik. A gázfejlődés pillanatszerű reakciója már a reaktorban, illetve a tefloncsőben megindul. Mivel a reakció exoterm folyamat, a mintaszállító cső egy 0 °C-os, jeges vizet tartalmazó hűtőn vezet keresztül, így a hidridképzés hatásfoka javul. A hűtést a további előnye, hogy a vegyes halmazállapotú elegy gáz fázisából a víz jelentős része kondenzál. A hűtést a folyadék és gáz fázis szétválasztása követi, amit egy házi készítésű gáz-folyadék szeparátor valósít meg. A gáz-folyadék-szeparátorból a szelénhidridet argongázzal űztem ki.

A gáz-folyadék-szeparátor és a detektor közé egy Perma Pure gyártmányú hidrid-szárítót helyeztem. (Perma Pure Products, Farmingdale, NJ, USA). A HPLC-TD-UV-HG-AFS rendszer sematikus felépítését a **25. ábra** mutatja.

4.3.2 Hidridképzés optimalálása

A termikus és UV roncsoló ill. a hidridfejlesztés megfelelő paramétereinek optimalálását a kromatográfias rész kiiktatásával végeztem.

A termikus roncsolóban a lehető legmagasabb hőmérsékletet célszerű alkalmazni, mivel a szelenát redukciója a hőmérséklet növekedésével egyenes arányban javul. Ez az érték 122°C, ennél magasabb olajhőmérsékletnél a minta a csőben forrásnak indul és két fázisúvá válik, ebből adódóan az addig a kapillárisban dugószerűen haladó mintakomponensek összekeveredhetnek, és az így detektált jelek retenciós ideje valamint a csúcsterület használhatatlan paraméterré válik. Az olajfürdő hőmérsékletét $\pm 2^\circ\text{C}$ pontossággal állandó értéken tartottam.



26.ábra

Az UV roncsoló hatása a szelénspecieszek jelintenzitására

Az UV roncsoló paraméter-beállítási lehetőséggel nem rendelkezett, az UV sugárzás intenzitása állandó volt. Az UV roncsolásnak elsősorban a szerves szelénspecieszek mérésénél van jelentősége, ugyanis a szerves kötésben lévő szelenatomok UV hatására leszakadnak, hidridképzésre alkalmassá válnak, így ezen komponensekre kapott jel nagyobb mértékben növekszik. Az UV roncsoló hatását az adott kísérleti elrendezésben és körülmények között a **26. ábra** mutatja. Az ábrán a szelenit UV nélkül kapott jelterületét száz százaléknynak feltüntetve jól látszik a szerves szelénspecieszek megnövekedett jelintenzitása. A SeCys₂ 111 %-os, a SeMet 90 %-os eredményt adott. A kapott eredmény összhangban van az irodalomban található adatokkal (LAFUENTE 1996), ahol KBrO₃

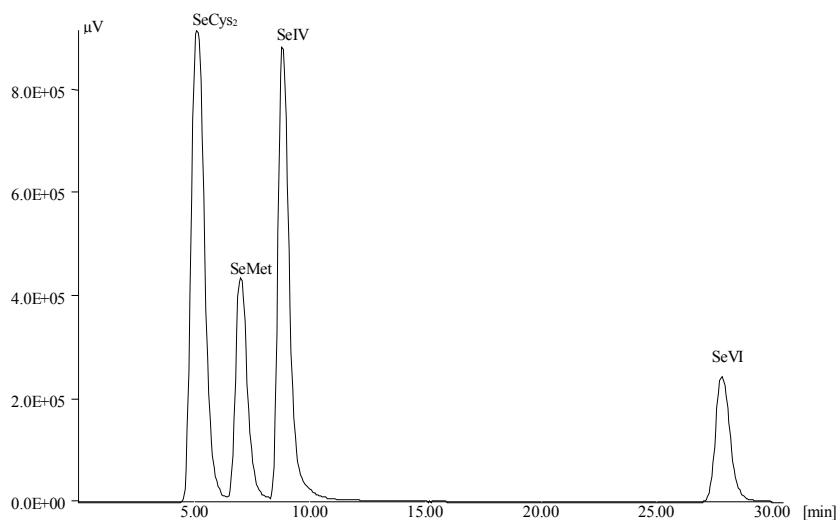
alkalmazásával érték el a szerves szelén specieszek hidridképzési hatásfokának növekedését. Az idézett munkában SeCys₂ esetén 120 míg SeMet esetén 122 %-os hidridképzési hatásfokot dokumentáltak. A száz százalékot meghaladó hatásfok valószínűleg a H₂Se-nél illékonyabb specieszeknek köszönhető (LAFUENTE 1996). Az általam alkalmazott UV besugárzás, a hivatkozott eljárásnál annyiban előnyösebb, hogy nincs szükség vegyszer (KBrO₃) hozzáadására, amely újabb szennyezési lehetőség, nem beszélve az idő- és költség-igényéről. A hidridképzéshez használt reagensek koncentrációinak és áramlási sebességeinek beállításait egy korábbi tanulmány alapján hajtottam végre (IPOLYI 2001). A rendszer működési paramétereit az **10. táblázat** mutatja.

10.táblázat
A HPLC-TD-UV-HG-AFS rendszer működési paramétereit

HPLC	
Oszlop	LiChroCART 250-4, LiChrospher 100 RP-18 (5µm)
Eluens	30 mM ammónium-formiát 3 mM TBAA 1 V/V% metanol pH=3
Mintabevivő hurok térfogata	100 µl
Eluens áramlási sebessége	0,0-10,5 min. 0,75 ml min ⁻¹ 10,6-30,0 min 1,2 ml min ⁻¹
HG	
Na-borohidrid koncentráció	2 m/v %, 1 m/v%-os NaOH oldatban oldva
Sósav koncentráció	50 v/v%, 5 m/v%-os KBr-ban oldva
Termikus roncsoló hőmérséklete	122 °C
Kihajtó gázáram	300 ml min ⁻¹
Ellenáramú szárító gázáram	2500 ml min ⁻¹
AFS	
Elsődleges áramerősség	25 mA
Megemelt áramerősség	25 mA

Az elválasztás során izokratikus körülmények között sikerült elválasztani a négy szelén-specieszt, mindössze az eluens áramlási sebességét növeltem meg a szelenit elúciója

után, az analízis idejét csökkentendő. Az izokratikus elválasztásnak a gradiens elúcióval szemben megvan az az előnye, hogy nem szükséges a komponensek elválasztása után a gyengébb eluenssel mosni az oszlopot a kiindulási feltételek visszaállításához, így az analízis ideje jelentősen csökkenthető. Az optimált paraméterekkel nyert standard kromatogram a **27. ábrán** látható.

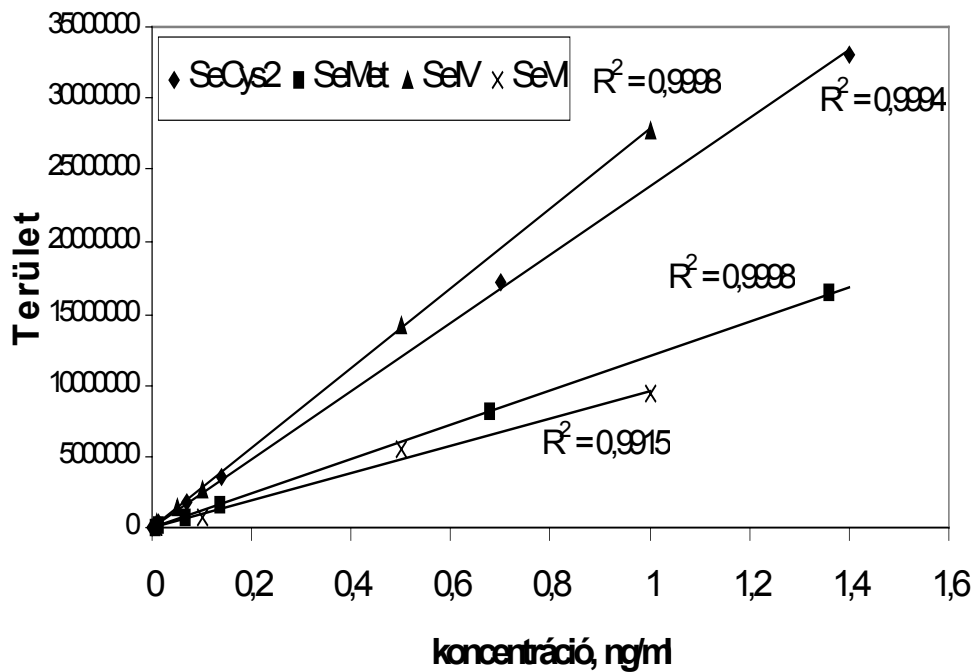


27.ábra

Szelén-módosulatok elválasztása LiChroCART 250-4 oszlopon. Koncentrációk szelénre nézve ($\mu\text{g/ml}$) SeCys₂:1,4 – SeMet:1,36 – Se(IV):1 – Se(VI):1

4.3.3 A HPLC-TD-UV-HG-AFS módszer analitikai teljesítőképességének vizsgálata

A rendszer linearitását a **28. ábra** mutatja. A linearitás vizsgálata során $0,0014\text{-}1,4 \text{ mg l}^{-1}$ koncentrációtartományban dolgoztam. A rendszer válaszjele speciesztől függetlenül 3 nagyságrenden keresztül lineáris összefüggést mutatott a vizsgált speciesz koncentrációjával. A kimutatási határ meghatározásakor a **28. ábrán** látható analitikai elemzőgörbék segítségével a háttérszórás háromszorosának megfelelő értéket tekintettem kimutatási határnak. Az így megállapított kimutatási határokat - összevetve a korábbi alfejezetekben ismertett HPLC-HHPN-AFS ill. HPLC-HG-AFS rendszerekkel - a **11. táblázat** tartalmazza. A táblázatból egyértelműen látszik, hogy a módszerfejlesztés meghozta a kívánt hatást, a rendszer kimutatási határa mindegyik speciesz esetében három nagyságrendet javult. Ezt kisebb mértékben a hidridképzés hatásfokának javulása, nagyobb részben a rendszer zajszintjének csökkenése okozza.



28.ábra
Szelén-specieszek elemzőgörbéje

Az ismételhetőség megállapításához olyan standard oldatot használtam, amely a kimutatási határ tízszeresének megfelelő koncentrációban tartalmazta az egyes specieszeket. Az ismételhetőséget tíz párhuzamos mérésből számítottam, az eredményeket szintén a **11. táblázat** tartalmazza. A táblázatból kitűnik, hogy a rendszer képes teljesíteni az ilyen metodikáktól elvárható megbízhatósági kritériumot. Mind a négy speciesz esetében a bizonytalansági érték 4 % alatt maradt.

11.táblázat A HPLC-TD-UV-HG-AFS rendszer kimutatási határa összehasonlítva két korábban kifejlesztett rendszerrel és a módszer ismételhetősége

Komponens	Kimutatási határ, ng/ml			Ismételhetőség, %
	HPLC-HHPN-AFS	HPLC-HG-AFS	HPLC-TD-UV-HG-AFS	
SeCys ₂	180	18	0,20	3
SeMet	200	70	0,58	3,9
SeIV	130	16	0,13	2,8
SeVI	600	-	0,40	3,4

4.3.4 Brazil dió minta elemzése HPLC-TD-UV-HG-AFS rendszerrel.

Munkám célja - mint az ezen dolgozat keretében ismertetésre kerülő fejlesztések során mindig - olyan kapcsolt technika létrehozása, amely teljesíti a korszerű speciációs analitikai technikákkal szemben támasztott követelményeket, és alkalmas szeléntartalmú minták speciációs analízisére. Ezért a rendszer optimalása és analitikai teljesítőképességének meghatározása után egy szeléntartalmú élelmiszer minta elemzését végeztem el. Az elemzéshez a brazil diót *Bertholletia excelsa* választottam, mely magas szeléntartalmú talajról származó növény, az Amazonas medencéjében szétszórta terem. A szelénspeciációval foglalkozó szakemberek érdeklődése nemrégiben fordult e felé a növény felé, ugyanis a dió fehérjéire a nagy metionin-tartalom jellemző, így várható volt a talajban előforduló és a növény számára felvehető szelén/kén aránya által szabályozott SeMet/Met arány eltolódása a szeléntartalmú aminosav irányába. Ez felveti a szelénhiány esetén kiegészítő táplálékként történő alkalmazás lehetőségét is.

A brazil dió minta-előkészítéséhez egy már korábban közölt módszer speciálisan erre a mintafajtára továbbfejlesztett változatát alkalmaztam. Az enzimes minta-előkészítés kidolgozása nem képezi disszertációm tárgyát, ez részletesen megtalálható Dernovics Mihály PhD értekezésében (DERNOVICS 2003). E helyet csak a végleges módszert ismertetem.

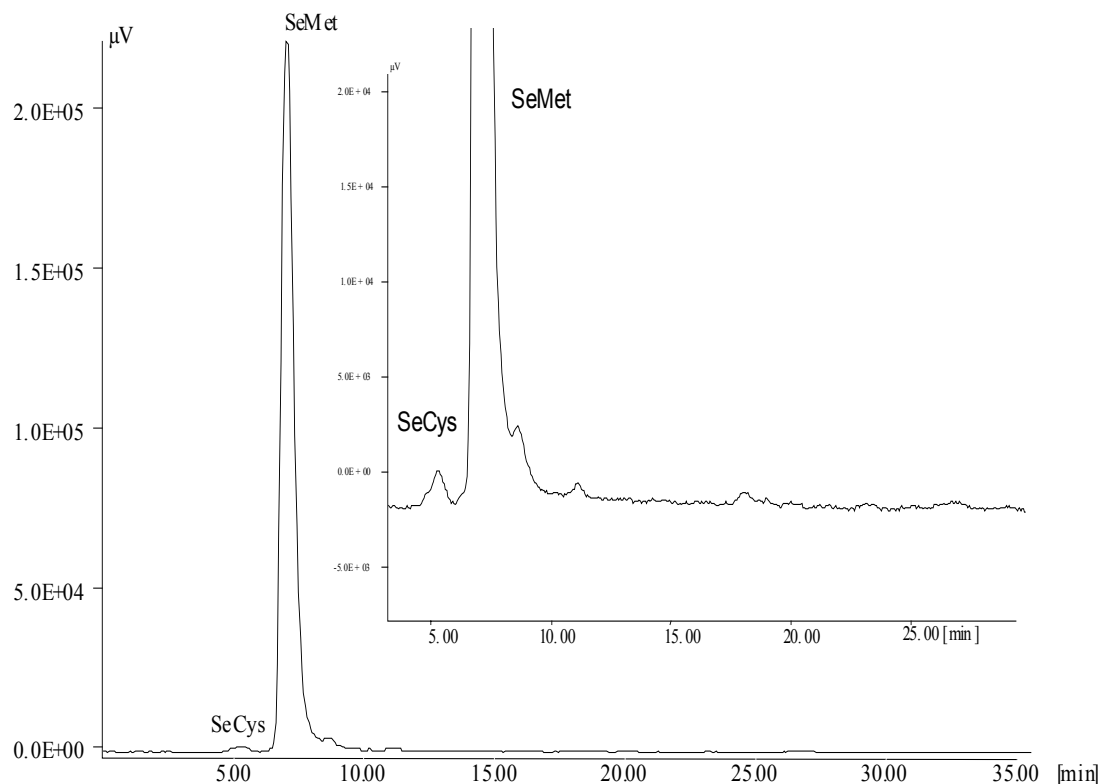
Az elemzésre szánt diókat megtörtem, héjukat eltávolítottam, majd lehámoltam a fehér dióbelet fedő vékony barnás takaróréteget is. Ezt követően a kb. 70%-os zsírtartalmú dióbelsőket (kb. 10 g-ot) felaprítottam, majd a kapott törmelékét 1,5 mm-es szitán ráztam át. Az áthulló frakciót (kb. 4g) Soxhlet-extrahálóküvelybe öntöttem, és – a zsíros fázist elválasztandó – 150 ml ciklohexánnal (Reanal) 15 átbukásig extraháltam. Ezután a zsírtalanított dió szemcséit porcelántégelyben dörzsölve tovább aprítottam, és 0,125 mm-es szitán átszitáltam. Az így előkészített, enzimes mintaelőkészítésre alkalmas minta tömege 1,1 g volt.

Az előkészített diómintából – 3 párhuzamossal dolgozva – kimértem 0,130 gramm körüli mennyiséget, amelyet 15 mg pronáz, fehérjebontó enzimet tartalmazó, 3,6 ml 50 mM-os foszfátpufferben (pH=7,4) oldottam fel. Az elegyet 37°C hőmérsékleten, 24 órán keresztül, 180 1/perc fordulatszámú rázógépen ráztam. Ezt követően a mintákat 15 ml-es centrifugacsőbe töltöttem át, és 25 percig centrifugáltam (4000 g, 10°C; Hettich Micro 22R centrifuga, Hettich, Tuttlingen, Németország). A centrifugálás után a felülúszót gyűjtőedénybe öntöttem le, és a centrifugálást még kétszer, 0,6-0,6 ml pufferral történő szuszpendálás után megismételtem.

A három centrifugálási lépés után az azonos mintához tartozó felülúszókat egyesítettem, 0,45 μm -es cellulóz-nitrát (Whatman; Anglia) fecskendőszűrőn átszűrtem és 5 ml-re egészítettem ki ioncserélt vízzel. A kapott oldatot a HPLC mérés megkezdéséig hűtőben tároltam.

A centrifugálás után kapott üledéket a cellulóz-nitrát szűrőpapírral együtt 2 ml tömény HNO_3 és 2 ml cc. H_2O_2 elegyében, zárt teflonbombában kukta segítségével 100°C -on roncsoltam 20 percen keresztül. A roncsolás végeztével az elegyet 5 ml-es mérőlombikban ioncserélt vízzel jelre töltöttem. Az eredmények ellenőrzéséhez a 3 párhuzamos minta, illetve a maradékok összes szeléntartalma induktív csatolású plazma-atomemissziós spektrométerrel (ICP-AES; Thermo Jarrel Ash ICAP-61, Franklin, MA, USA), mint független módszerrel megmérésre került.

A fent ismertetett minta-előkészítés után a kifejlesztett módszerrel elemeztem a brazil dió mintát, a kapott kromatogramot a **29. ábra** mutatja, a bal felső sarokban kiemelve a SeCys_2 csúcsot. A várakozásoknak megfelelően a szeléntartalom legnagyobb részét a szeleno-metionin alkotja, mellette még azonosítható komponensként szeleno-cisztin található a mintában.



29. ábra

Brazil dió minta kromatogramja HPLC-TD-UV-HG-AFS rendszeren

Mivel a vizsgált mintatípusra speciesz-tartalomra hitelesített CRM nem áll rendelkezésre, a módszer ellenőrzésére az elemzést mind külső kalibrációval, mind standard addícióval elvégeztem, ill. az összes szeléntartalmat független módszerként ICP-AES technikával is meghatároztam. Az eredményeket a **12. táblázat** tartalmazza.

12.táblázat A brazil dió minta elemzésének eredményei, három párhuzamos minta-előkészítéssel

Minta	Maradék Se-tartalma (µg)	HPLC-TD-UV-HG-AFS mg/kg						ICP-AES mg/kg
		Külső kalibráció szerint			Standard addíció szerint			
		Speciáció		Összes Se	Speciáció		Összes Se	Összes Se
		SeCys ₂	SeMet		SeCys ₂	SeMet		
A	0,17	0,15	54,13	54,28	0,20	52,77	52,97	69,21
B	0,41	0,12	66,10	66,22	0,14	71,90	72,04	68,23
C	0,40	0,22	70,02	70,24	0,30	74,83	75,13	68,37
Átlag	-	0,16	63,42	63,58	0,21	66,50	66,71	68,60
Szórás	-	0,05	8,28	8,30	0,08	11,98	12,00	0,53
RSD%	-	31,4	13,1	13,1	37,9	18,0	18,0	0,8

Az elemzés azt mutatja, hogy mind a külső kalibráció, mind a standard addíció alkalmazásával az ICP-AES technikával közel azonos eredményeket kaptam. A legnagyobb bizonytalanság a SeCys meghatározásánál mutatkozott, ennek oka e speciesz igen kis koncentrációja a mintában. A speciációs mérések bizonytalanságát legjobban a mintában legnagyobb mennyiségben található SeMet meghatározásának bizonytalansága befolyásolta. A speciációs mérések bizonytalansága nagyobb, mint az ICP-AES méréseké, ami eredhet az azonosíthatatlan komponensek eltérő mennyiségéből a párhuzamos mintákban. Ezt a bizonytalansági forrást a minta tökéletesebb homogenizálásával lehet kiküszöbölni, az erre irányuló kísérletek már folyamatban vannak. Az eltérés másik lehetséges magyarázata a speciációs minta-előkészítés bonyolultsága, amely során jóval több a hibalehetőség, mint az ICP-AES méréshez használt salétromsav, hidrogén-peroxid elegyében történő roncsolás során. A táblázatból kitűnik az is, hogy az eredményeket nem befolyásolja a kalibráció módja, tehát a módszer nagyfokú zavartűrést mutat a minta mátrixával szemben.

4.3.5 Összefoglalás

Munkámban HPLC elválasztáson és AFS detektáláson alapuló speciációs módszerfejlesztés végső eredményeként egy olyan speciációs analitikai módszert fejlesztettem ki, amely mind az elválasztás mind a detektálás paramétereiben megfelel a gyakorlati analitikai

követelményeknek. A módszerrel - összehasonlítva korábban kifejlesztett speciációs technikákkal – jelentős érzékenység- és kimutatási határ-javulás érhető el. A módszerrel elvégezhető a biológiai mintákban leggyakrabban előforduló két szeleno-aminosav, a szeleno-cisztin ill. a szeleno-metionin, és a két szerves szelén-speciész (szelenit, szelenát) analízise. Speciációs hitelesített anyagminta hiányában a módszert szeléntartalmú élelmiszerminta (brazil dió) standard addíciós elemzésével ill. független módszerrel ellenőriztem, és megállapítottam, hogy az alkalmas gyakorlati analitikai feladatok megoldására.

4.4 Elektrotermikus elpárolgatás és induktív csatolású plazma repülési idő tömegspektrométer kapcsolása, WETV-ICP-TOFMS

A következő alfejezetekben az induktív csatolású plazma tömegspektrometriának az izotóp meghatározásban, mint a speciáció egy egyedi esetében történő felhasználására mutatok be alkalmazási példákat. Az alkalmazott tömegspektrometria technika minden esetben ICP-TOFMS, mely egyben determinálta a fejlesztési célokat is. Mivel az ICP-TOFMS a quadropól tömegspektrométereknél egy nagyságrenddel rosszabb érzékenységű, a fejlesztések egyik fő célkitűzése olyan mérőrendszerek létrehozása, amelyek a nagy mintabeviteli hatásfokuk folytán javítják a detektálás érzékenységét, közvetve a kimutatási határt. A fejlesztések következő sarokpontja szintén az alkalmazott detektorhoz köthető; az ICP-TOFMS ellentétben más használatban lévő tömegspektrométerekkel közel szimultán módon detektálja a teljes tömegspektrumot, vagyis tranziens jelek mérése esetén a mért tömegszámok számát nem korlátozza az alkalmazható integrálási idő (lásd 3.2 fejezet). Ezt kihasználva a módszerfejlesztés során tranziens jeleket előállító technikák szimultán multielemes (multi-izotópos) meghatározásban történő alkalmazására törekedtem. A harmadik szempont az volt, hogy a fejlesztések eredményeképp létrejött rendszerek, későbbi munkák során elválasztás-technikákkal összekapcsolhatók legyenek, így a speciáció más területén is felhasználható kapcsolt készülékeket lehessen kiépíteni, egyesítve az elválasztás-technika és az izotóp detektálás biztosította előnyöket.

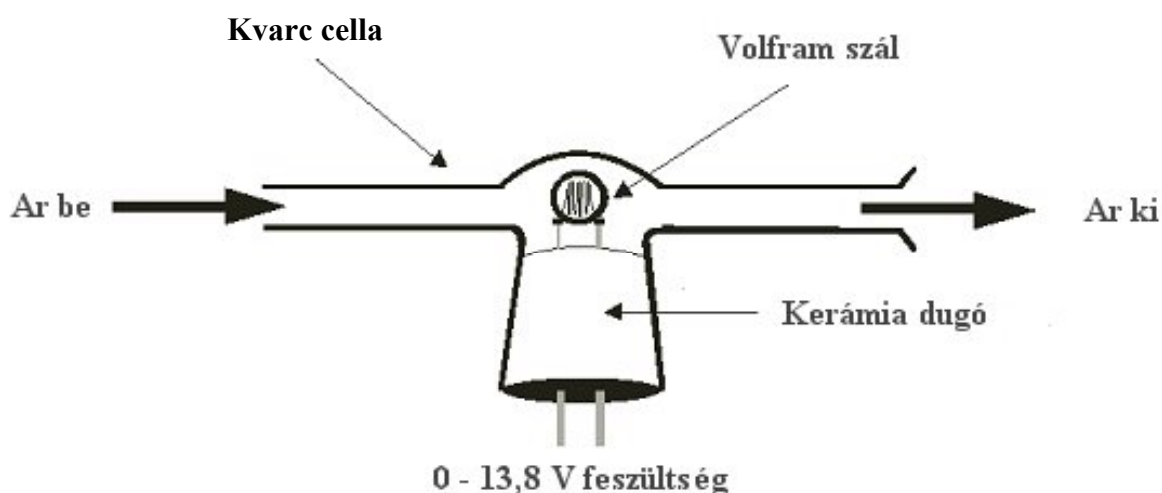
Elsőként elektrotermikus elpárolgatás (ETV) és ICP-TOFMS kapcsolását írom le. A bemutatott rendszerben az elpárolgatás egy volframszál segítségével megy végbe (WETV), melynek egyik előnye az általánosan használt grafitkemencés technikával szemben, hogy egy egyszerű világítótest áramforrása elég a rendszer működtetéséhez, nincs szükség nagy teljesítményű áramforrásra (CODDING 1980).

4.4.1 Felhasznált vegyszerek és eszközök

Minden felhasznált vegyszer analitikai tisztaságú volt. A kalibrációs törzsoldatokat 1000 mg dm⁻³ töménységű egyelemes standardeből készítettem (Merck, Darmstadt, Németország), az alábbi elemek felhasználásával: Ag, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, Li, Mn, Ni, Pb, Pd és Sr. A módszer validálását humán vészérum (SRM 909, „Human Serum”, National Institute of Standards & Technology, USA) és teljes vér (SeronormTM 404108, „Trace Elements in Human Whole Blood”, Nycomed Pharma, Norvégia) hiteles anyagminta elemzésével végeztem. A vér és szérum minták 10 µl-jét réz és króm meghatározáshoz ezerszeresen hígítottam, míg lítium esetén tízezerszeres volt a hígítás, a legkisebb – tízszeres - hígításra az ólom elemzéséhez volt szükség. A hígított hiteles anyagminták 50 µl-jéhez,

Parsons és munkatársai munkája nyomán (PARSONS 1995), 450 μl mátrix módosítót adtam, amely a következő összetevőket tartalmazta: 0,2 m/v% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Merck, Darmstadt, Németország), 0,5 v/v% Triton-X 100 (Merck, Darmstadt, Németország) és 0,2 v/v% HNO_3 (Merck, Darmstadt, Németország). Minden kísérlethez nagytisztaságú vizet használtam (ModuPure Plus, Modulab, Németország).

A méréseket Leco Renaissance ICP-TOFMS (Leco, St. Joseph, MI, USA) készüléken végeztem. Az elektrotermikus elpárolgató-cella házi tervezésű és készítésű 7,3 ml térfogatú üvegcella, amely csiszolatos csatlakozón keresztül közvetlenül az ICP torch-hoz csatlakozik. A cella belsejében található a volframszál, amely felmelegítésével megy végbe az elpárolgató. A szigetelést egy kerámia test biztosította, amelyen két réz szál vezetett keresztül, a volframszál ezekhez csatlakozik csavarok segítségével. A cella tetején található a zárható mintaadagoló nyílás, melyen keresztül mikropipetta segítségével a mintát a volframszálra jutattam. Az elektrotermikus elpárolgató felépítését a **30. ábra** mutatja.



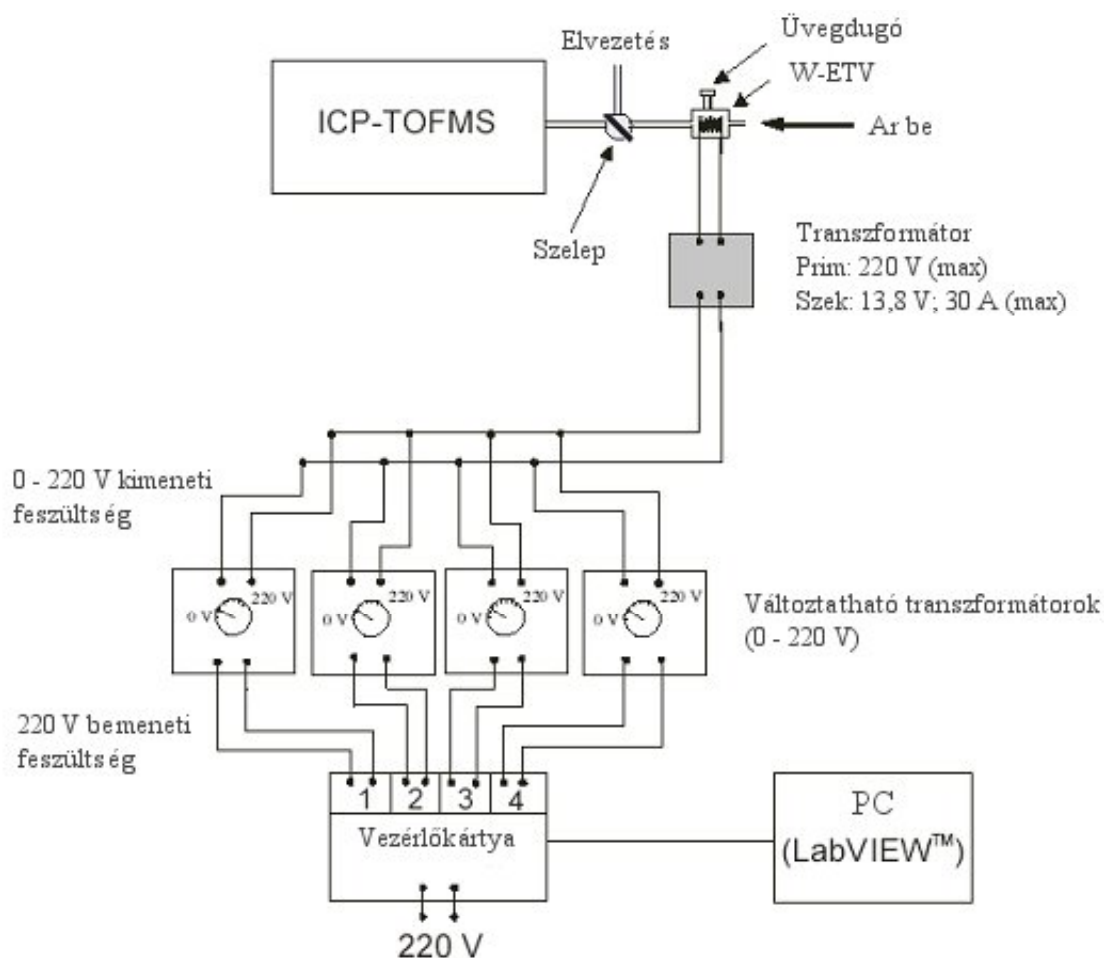
30. ábra

A WETV cella felépítése

A volframszálat 30 A áramerősségű általánosan használt halogén áramforráshoz kapcsoltam, amely egy, a laboratóriumban tervezett négy csatornás LabVIEW szoftver vezérelt (National Instruments, USA) kapcsolótáblához kapcsolódott. Mindegyik csatorna egy-egy 0-220 V tartományban vezérelhető transzformátorhoz (SST 250/10, RFT, Németország) csatlakozott, lehetővé téve az elpárolgató program egyes lépéseinek 0-13,8 V közötti független beállítását, melyeket ezt követően a szoftver segítségével vezéreltem. A keletkezett füst egy 8

cm hosszú 3 mm belső átmérőjű csövön keresztül jutott a plazmába, a szállító gáz argon volt. A szárítási, pirolizációs és tisztítási lépés során a cella és a torch között elhelyezett szelepet nyitva tartottam, így minimalizálva a detektort ért mátrixion terhelést. A mérés során a 12 (C^+) 52 (ArC^+) és 56 (ArO^+) tömegszámokat nem volt szükséges kizárni (ion deflection), mivel a szén és oxigén tartalmú mintamátrix nagy része elpárolgott a szárítási és pirolizációs lépés során, így lehetővé vált a ^{52}Cr és ^{56}Fe mérése is.

Mivel optikai pirométer ill. IR-termométer nem állt rendelkezésre, hőmérséklet adatok helyett a feszültség és áramerősség adatok szolgálták támpontul az optimalálás és a minták analízise során, melyeket két digitális multiméterrel mértem (Voltcraft, Németország). A rendszer felépítését a **31. ábra** mutatja.



31. ábra

WETV-ICP-TOFMS rendszer felépítése

4.4.2 A WETV-ICP-TOFMS paramétereinek optimalálása

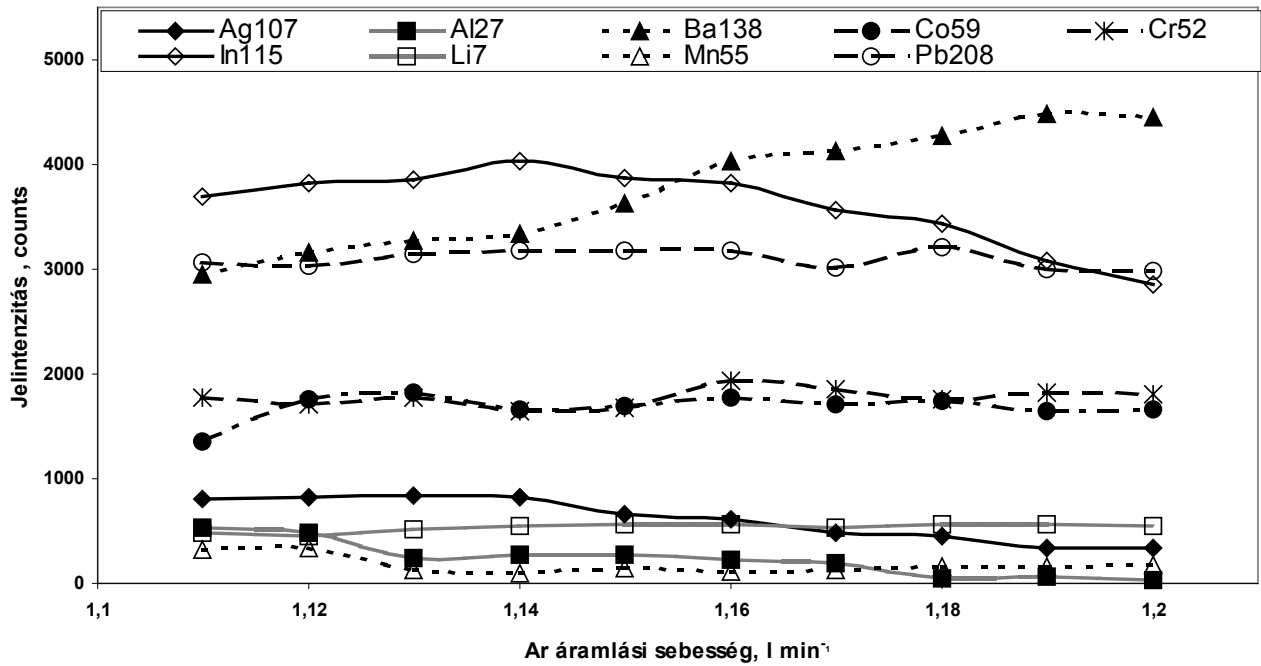
A plazmapozíció, generátor teljesítmény és az ionoptika optimalálását a volframszál szennyezéseként jelen lévő molibdén ^{98}Mo jelének maximumára végeztem, folyamatos 6,0 V feszültséget alkalmazva. Azért esett erre az izotópra a választásom, mert szemben a volfram izotópjaival a tömegszám tartomány közepén helyezkedik el. A vivőgáz sebesség, a szárítás időtartama valamint az elpárologtatás feszültségének optimalálását tranziens módban végeztem, 1 ng ml^{-1} koncentrációjú Ag, Co, Li, Al, Cr, Mn, Ba, In és Pb tartalmú többelemes oldattal. Az integrációs idő 38 ms volt. A modulációs időt, egy korábbi munka eredményét felhasználva (BINGS 2003) a készülék gyári beállításától eltérően 5 μs -ra állítottam, így növelve a készülék érzékenységét.

Az elpárologtatás ideje (3s), a volframszál kifűtéséhez használt feszültség (9,3 V) és idő (1 s) a teljes mérési sorozat alatt állandó volt, mivel ezek a paraméterek nem mutattak hatást a vizsgált elemek jelintenzitására.

A vivőgáz áramlási sebessége

Az elektrotermikus elpárologtató rendszerek sarkalatos pontja az elpárologtatott minta detektorba juttatása, amely nagy mértékben befolyásolja a rendszer teljesítő képességét. Az ETV rendszer geometriai felépítésén kívül a vivőgáz sebessége van a legnagyobb hatással a mintabeviteli hatásfokra. Nemcsak az esetleges kondenzáció mértékét csökkentheti, hanem a részecskék sebességét is meghatározza a plazmában, ami befolyásolja az ionizáció mértékét is.

Az optimalálás során 7,0 V feszültség mellett 1,11-1,20 l/perc tartományban változtattam a vivőgáz sebességét. Amint azt a **32. ábra** mutatja Ba esetén 1,19 l/perc térfogatáramnál tapasztaltam a legnagyobb jelintenzitást, míg az Ag és In 1,14 l/perc felett jelintenzitás-csökkenést mutatott. A többi vizsgált elemre nem volt jelentős hatással az argon áramlási sebesség. Az optimum értéket 1,16 l/percben határoztam meg.

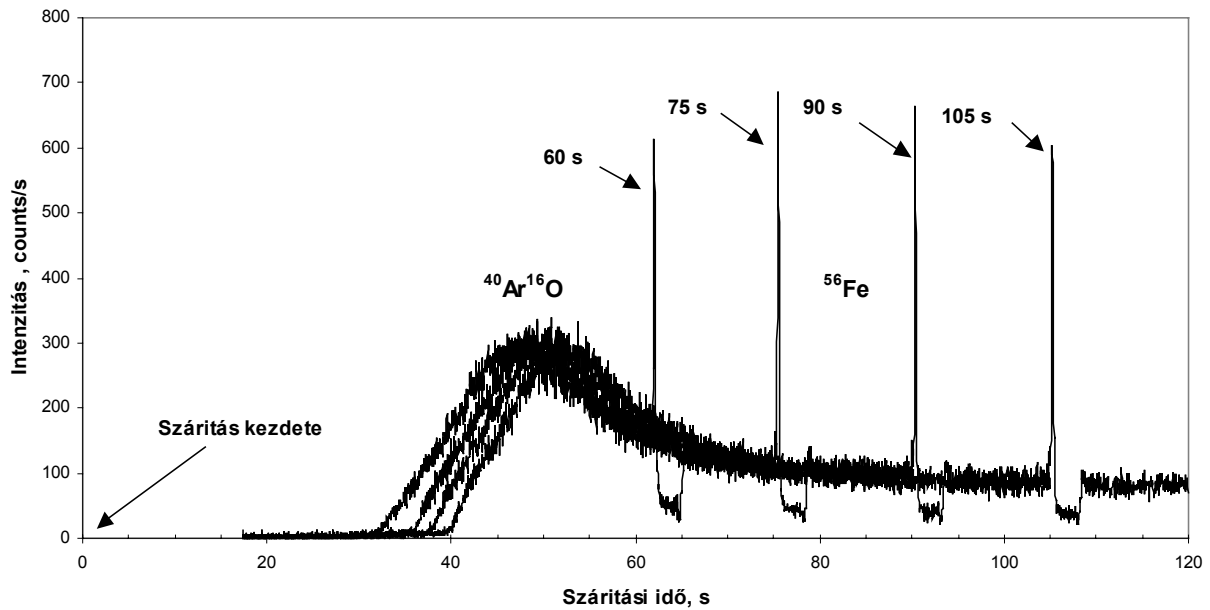


32. ábra

A vivőgáz sebességének hatása a jelintenzitásra WETV-ICP-TOFMS rendszerben

A szárítás időtartama

Mint azt korábbi ETV módszerfejlesztési munkák eredményei alátámasztják az elektrotermikus mintabevitel segítségével néhány izobár interferencia kiküszöbölhető ill. jelentősen csökkenthető (MAHONEY 1999, WHITTAKER 1989). Ilyen interferencia többek között az 56-os tömegszámra jelentkező ArO^+ zavarás, amely a vas mérését teszi nehézkesé, nagyfelbontású tömegspektrométer híján lehetetlenné. Munkám során ezt a zavaró hatást használtam a szárítás időtartamának optimalizálására, kihasználva azt a tényt, hogy a plazmába jutó oxigén a volframszállra juttatott minta nedvességtartalmából ered, és jóval alacsonyabb hőmérsékleten elpárologtathatóvá válik, mint a vas. Amint azt a 33. ábra mutatja az 56-os tömegszámot figyelve a szárítás időtartama alatt, először az ArO^+ okozta jel látható, majd a minta nedvességtartalmának elpárologtatása után a ^{56}Fe jele. A 60 ill. 75 másodperces szárítási szakasz során a ^{56}Fe jele az ArO^+ csúccsal egy időben vagy annak tailingjén detektálható, míg a 115 másodperc szárítás feleslegesen hosszú, csak a meghatározás időtartamát növeli, hiszen 90 s után is ugyanakkora az alapvonal értéke, mint 115 másodperc időtartamú szárítást alkalmazva. E módszert alkalmazva pontosan meg lehet határozni a szárítási lépéshez szükséges és elégséges időtartamot, amely ez esetben 90 másodperc volt.



33. ábra

A szárítás időtartamának hatása az $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ ill. a ^{56}Fe jelintenzitására

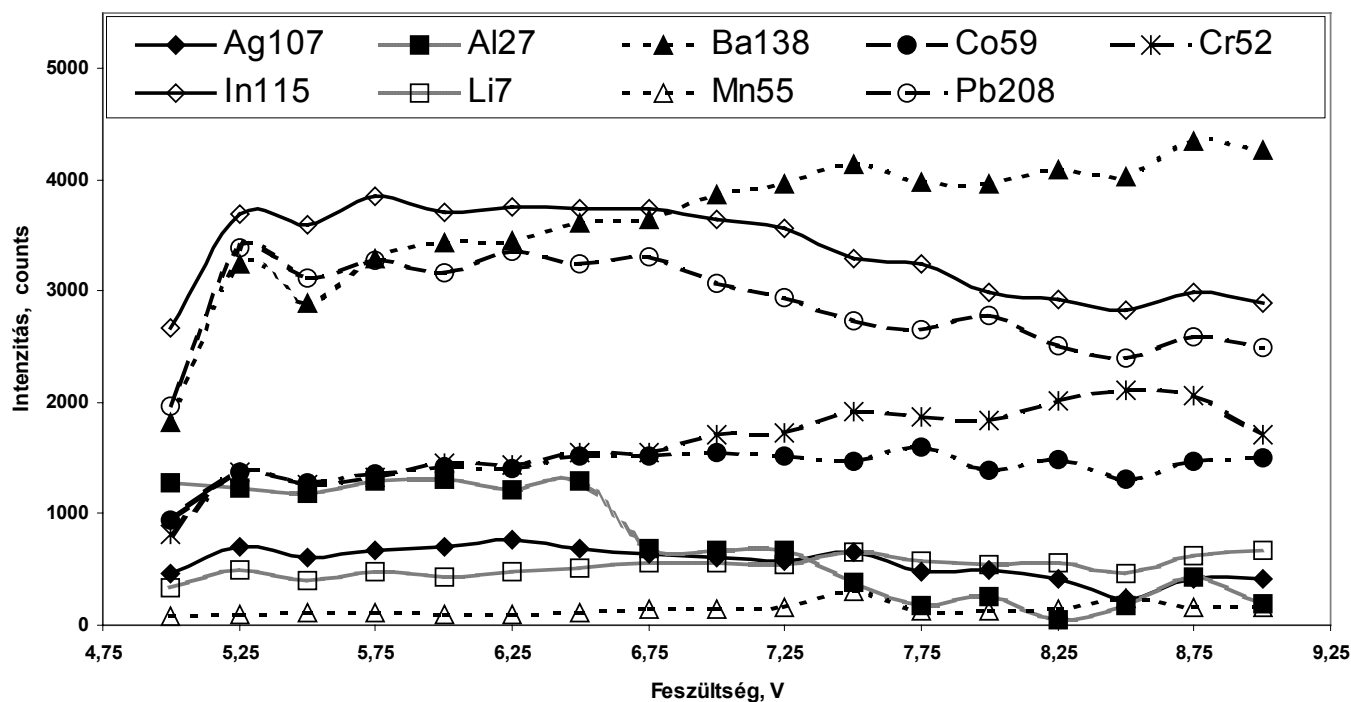
Az elpárolgatás feszültsége (hőmérséklete)

Az elpárolgatási hőmérséklet nagyon fontos paraméter, amely körültekintő optimalizációt igényel. Az egyik oldalról megfelelően magas hőmérsékletre van szükség ahhoz, hogy az összes meghatározandó elem elpárolgatása egy lépésben megtörténjen, amely hőmérsékletet az egyes elemek forráspontja határoz meg. Másrészt az alkalmazandó hőmérsékletnek határt szab a volfram forráspontja, ugyanis túl magas hőmérséklet esetén a volframszárlól nagy mennyiségű volfram kerülhet a plazmába, ami nem csak az ETV cella szennyeződéséhez vezet, hanem a nagy mennyiségű plazmába került részecske miatt jelintenzitás csökkenés léphet fel.

Természetesen az optimalizálható paraméter az elpárolgatás hőmérséklete volt, de mivel optikai pirométer ill. IR-termométer nem állt rendelkezésre, hőmérséklet adatok helyett a feszültség és áramerősség adatok szolgálták támpontul az optimalizálás során, így a továbbiakban ezekre az adatokra hivatkozom.

Az optimalizálás során a feszültséget 5 – 9 V között változtattam. Az elpárolgatás ideje 3 másodperc volt, mivel a csúcshélességek az egyes elemekre 1 másodpercnél nem voltak hosszabbak, és hosszabb elpárolgatási időtartam sem okozott csúcshévesedést, vagy csúcsalak javulást.

Amint azt a **34. ábra** is mutatja, a feszültség növelése Ba (Fp= 1870 °C) és Cr (Fp= 2671 °C) esetén 8,75 V-ig jelintenzitás növekedést okozott, míg In (Fp= 2072 °C), Pb (Fp= 1749°C) és Al (Fp= 2519 °C) esetében 6,75 V felett jelintenzitás csökkenés volt megfigyelhető. Az Ag (Fp= 2162°C), Co (Fp= 2927 °C), Li (Fp= 1342 °C) és Mn (Fp= 2061 °C) nem mutatott jelentős hőmérsékletfüggést. A kapott eredmények csak a vizsgált elemek illékonyságát figyelembe véve nem magyarázhatóak.



34. ábra

Az elpárolgatás során alkalmazott feszültség hatása a jelintenzitásra

Lehetséges magyarázatként szolgálhat Kántor és munkatársai által grafitkemencés elpárolgatás során leírt jelenség, mely szerint egy elem nem csak tiszta elemi formában párologhat el, hanem az adott körülmények között keletkezett vegyületek formájában is. Az elpárolgatás során keletkezett vegyület kémiai minőségét a mintában jelenlévő esetleges reakciópartnerek, a fűtési program, a kihajtó gáz és az elpárolgató felület anyagi minősége befolyásolja (DAMINELLI 1999). Kompromisszumos optimumként 7,25 V elpárolgatási feszültséget állapítottam meg.

Az esetleges részleges elpárolgatás ellenőrzése végett egymás után két elpárolgatási lépést alkalmaztam, az elsőt a megállapított 7,25 V optimum feszültségen, míg a másodikat 8,0 V-on. A második lépés során nem tapasztaltam mérhető jelintenzitást egyik vizsgált tömegszámra sem, így megállapítható, hogy az optimált paraméterek mellett teljes elpárolgatás megy végbe. A rendszer működési paramétereit a **13. táblázat** mutatja.

13. táblázat A WETV-ICP-TOFMS optimált működési paramétereit

ICP-TOFMS	<i>Renaissance (Leco)</i>		
<i>ICP paraméterek</i>			
Frekvencia / MHz	40,68		
Kicsatolt teljesítmény / kW	1,00		
Plazma (segéd) gáz sebesség / l min ⁻¹	14 (0,70)		
<i>Tömegspektrométer paraméterek</i>			
Reflectron low (high) / V	202 (1513)		
Ion lencse 1 (2) / V	-575 (-575)		
Einzel lencse 1 (2) / V	-1243 (-915)		
Detektor feszültség / V	-2000		
Spektrális frekvencia/ kHz	20		
Modulációs pulzus szélessége / μs	5		
Integrációs idő / ms	38		
<i>Ion deflektálás</i>	kezdet / μs	szélesség / μs	
14 – 19 amu	0,992	0,11	
28 – 36 amu	1,311	0,108	
40 amu	1,483	0,1	
80 amu	2,096	0,03	
92 – 100 amu	2,271	0,11	
180 – 186 amu	3,091	0,1	
196 – 202 amu	3,174	0,11	
212 – 218 amu	3,236	0,11	
<i>Elektrotermikus elpárolgató</i>			
Kvarc cella térfogata / ml	7,3		
Vivőgáz sebessége / l min ⁻¹	1,16		
Minta térfogata / μl	10		
Volframszál	<i>OSRAM Inc.</i>		
Volframszál tömege / mg	106,5 ± 0,13		
Volframszál hossza /cm (átmérő / mm)	9,76, 10 tekercsben feltekerve (0,27)		
Áramforrás	<i>12 V világítási rendszer</i>		
Elsődleges oldali feszültség / V	220		
Másodlagos oldali fesz. (áramerősség) / V (A)	13,8 (30)		
Transzformátor	<i>SST 250/10 (RFT)</i>		
Elsődleges oldali feszültség / V	220		
Másodlagos oldali fesz. / V	0 – 220, változtatható		
Fűtési program vezérlője	<i>Saját tervezésű; LabView által vezérelt</i>		
<i>Fűtési program</i>	Fesz. /V	Áramer. /A	idő / s
Szárítás	0,6	2,5	90
Pirolízis; szérum minta	1,40	3,3	4
Pirolízis; vér minta	1,60	3,6	5
Elpárolgató; vizes minta	7,25	7,3	3
Elpárolgató; szérum minta	7,00	6,9	3
Elpárolgató; vér minta	7,10	7,1	3
Kifűtés	9,30	8,3	1

4.4.3 A WETV-ICP-TOFMS rendszer analitikai teljesítőképességének vizsgálata

Az analitikai teljesítőképesség vizsgálata során a kimutatási határokat és az ismételhetőséget ill. a módszer lineáris tartományát, valamint az izotóparány meghatározás ismételhetőségét határoztam meg. A vizsgálathoz különböző koncentrációjú többelemes vizes oldatokat használtam, amelyek az alábbi elemeket tartalmazták: Ag, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, Li, Mn, Ni, Pb, Pd és Sr. Mind a kimutatási határ, mind az ismételhetőség meghatározásához a tranziens jelek csúcsterületeit használtam.

Az eredményeket a **14. táblázat** tartalmazza. A kimutatási határok 0,7 és 19 pg ml⁻¹ (vas esetén 1,1 ng ml⁻¹) közöttiek, amely a 10 µl injektált mintatérfogatot figyelembe véve 0,007 – 0,1 pg (Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ga, In, Mn, Ni és Sr esetén) ill. 0,11 – 0,19 pg (Ag, As, Bi, Li, Pb és Pd esetén) közötti abszolút kimutatási határt jelent.

14. táblázat A WETV-ICP-TOFMS rendszeren vizsgált
17 elem kimutatási határa és ismételhetősége

Elemek	LOD / pg ml ⁻¹	RSD / %
⁷ Li	11	2,8
⁵² Cr	8	2,3
⁵⁵ Mn	1	2,9
⁵⁶ Fe	1,1*	3,8
⁵⁸ Ni	7	3,8
⁵⁹ Co	3	1,9
⁶³ Cu	1	3,0
⁶⁹ Ga	4	1,8
⁷⁵ As	19	3,1
⁸⁸ Sr	1	1,7
¹⁰⁶ Pd	17	3,4
¹⁰⁷ Ag	13	3,3
¹¹⁵ In	2	2,4
¹³⁸ Ba	0,7	2,6
¹⁴⁴ Cd	9	5,5
²⁰⁸ Pb	14	2,1
²⁰⁹ Bi	17	2,4

* ng ml⁻¹

A vas esetében kapott viszonylag magas kimutatási határt a csökkentett, de teljesen meg nem szüntetett ArO⁺ zavarás okozza (lásd 33. ábra)

Az ismételhetőséget 5 ng ml^{-1} koncentrációjú többelemes oldattal vizsgáltam, tíz egymás utáni injektálás eredményét figyelembe véve. A rendszer igen jó ismételhetőséggel rendelkezik, a vizsgált 17 elemre 2 és 6 % közötti eredményeket kaptam. Az ismételhetőséget nagy valószínűséggel tovább lehetne javítani hőmérséklet-kontrollált elpárolgatót alkalmazva.

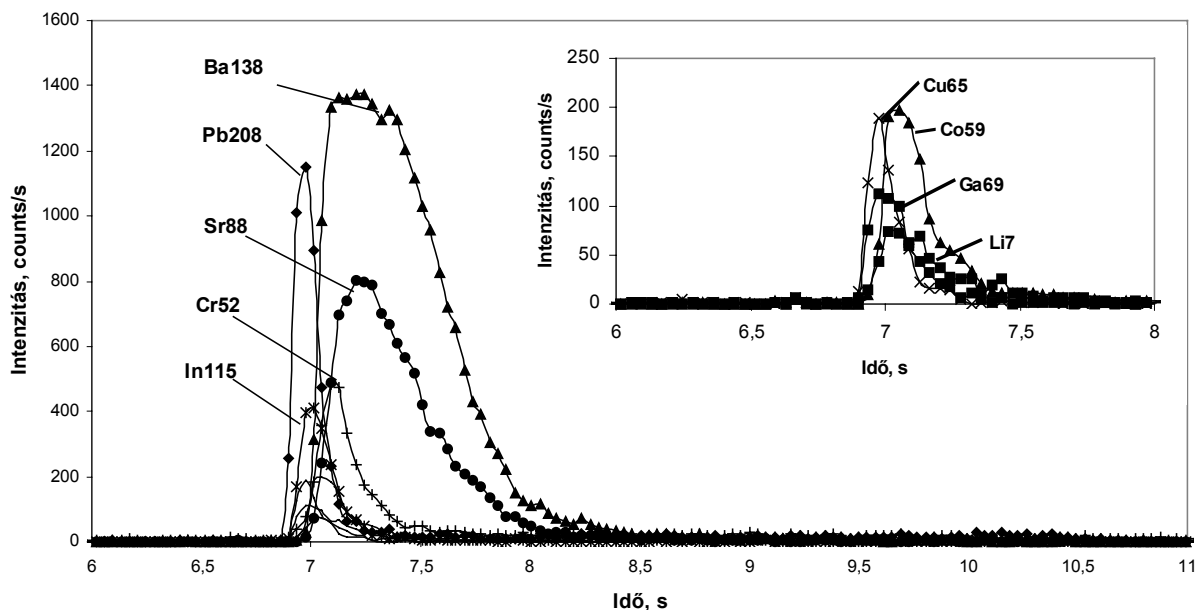
Bárium esetén, amely az adott kísérleti elrendezésben a legérzékenyebb elemnek bizonyult, a lineáris tartomány 8 ng ml^{-1} koncentrációig tartott ion számlálási módban (ion counting mode). Ha a detektort analóg módban használtam, a lineáris tartomány 50 ng ml^{-1} -ig kiterjeszhető volt.

Az izotóp arány meghatározást három elemre végeztem el: Ag, Cu, Pb. Ismert izotóp-arányú standard hiányában csak az izotóparány meghatározás ismételhetőségét tudtam vizsgálni, a pontosságát nem. A méréseket 5 ng ml^{-1} koncentrációjú többelemes vizes oldatokkal 10 ismétléssel végeztem. Az eredményeket a **15. táblázat** mutatja, amelyben jól látszik, hogy a módszerrel 2 % alatti ismételhetőség érhető el. Ez a tranziens jelek esetén igen jónak számító eredmény a repülési idő tömegspektrométer gyorsaságának köszönhető. Más típusú ICP-MS készülékkel (kivéve a multicollector ICP-MS-t) ilyen gyors jelek esetén lehetetlen elérni az izotóparány meghatározásnál követelménynek számító 2 %-os értéket.

15. táblázat Izotóparány meghatározás ismételhetősége WETV-ICP-TOFMS rendszerrel, 5 ng ml^{-1} koncentrációjú többelemes vizes oldatból.

Izotópok	Ag107/Ag109	Cu63/Cu65	Pb206/Pb207	Pb207/Pb208	Pb206/Pb208
RSD%	1,06	1,83	1,94	0,83	2,00

A **35. ábrán** egy Ba, Co, Cr, Cu, Ga, In, Li, Pb és Sr tartalmú 5 ng ml^{-1} koncentrációjú oldattal készült WETV-ICP-TOFMS jelet mutatok be. A jelek átlagos félértékszélessége 0,1 és 0,6 s közötti, jól mutatva a repülési idő tömegspektrométer egyik nagy előnyét, hogy igen gyors tranziens jelek esetén sem okoz problémát nagyszámú - jelen esetben kilenc - tömegszám (komponens, izotóp) megfigyelése. A gyors detektornak köszönhetően az eltérő forráspontú elemek elpárolgása közti időkülönbség is jól nyomon követhető. A mérés teljes időtartama kevesebb, mint 100 másodperc.



35. ábra

WETV-ICP-TOFMS rendszeren megfigyelhető tranziens jel 9 elem egyidejű mérése során

4.4.4 Hiteles anyagminták vizsgálata WETV-ICP-TOFMS rendszerrel

A módszer megbízhatóságának vizsgálatára hiteles anyagmintákat használtam. Mivel a módszer nagy előnye a kis mintatérfogat és a pirolízis során a mintamátrix jelentős részének eltávolítása, olyan biológiai mintára esett a választásom, amely viszonylag bonyolult mátrixszal rendelkezik. A vizsgálat során egy vérszérum (SRM 909, „Human Serum”, National Institute of Standards & Technology, USA) és egy vérminta (Seronorm™ 404108, „Trace Elements in Human Whole Blood”, Nycomed Pharma, Norvégia) hiteles anyagminta elemzését végeztem el. A mérések előtt a 3.4.1 alfejezetben ismertetett minta-előkészítést alkalmaztam. Minden esetben standard addíciót használtam az eredmények kiértékelésére. A pirolízis-lépés lehetővé teszi a mintamátrix mérés előtti elpárologtatását, mivel ez a lépés eddig nem szerepelt a fűtési programban a működési paramétereket mindkét mintára optimalni kellett. Az optimális értékeket a **13. táblázat** tartalmazza.

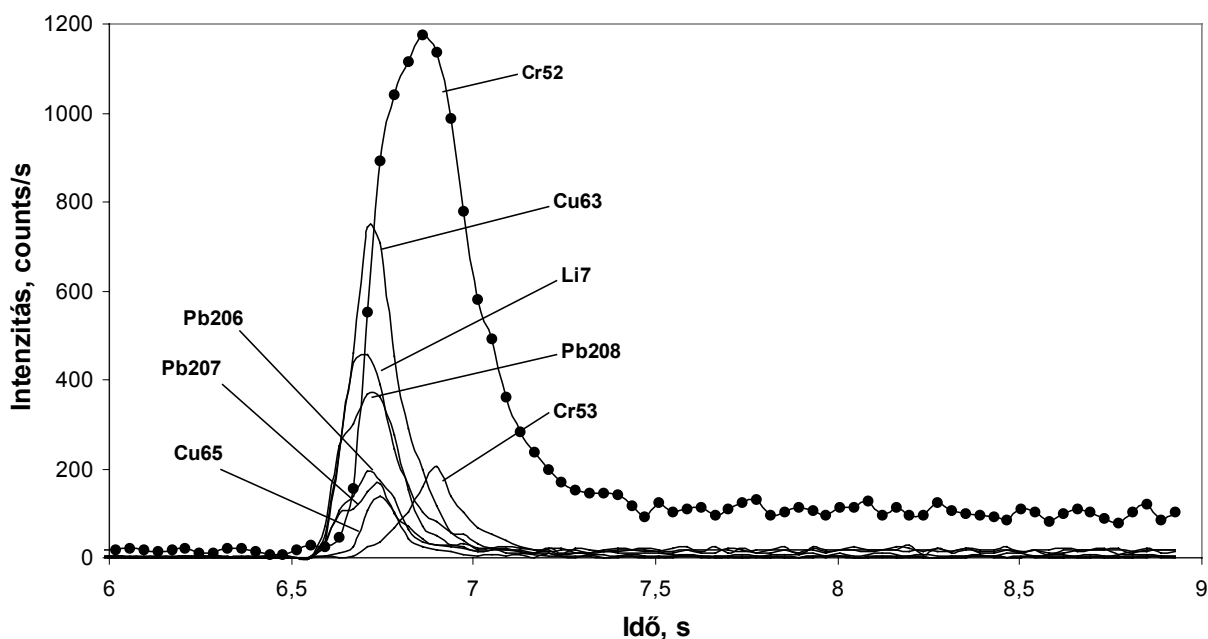
A hiteles anyagminták csak Li, Cu, Pb és Cr tartalomra rendelkeztek bizonylatolt értékkel, ezért csak ezen elemek mérését végeztem el. Amint az a **16. táblázatból** is látszik, vérszérum esetén nagyon jó megfelelést tapasztaltam mind a négy vizsgált elemre, és a vérminta mért ólom tartalma is megfelelt a bizonylatolt értéknek. Króm esetén a bizonylatolt érték a rendszer kimutatási határa alá esett, aminek oka a nagyfokú hígítás. Kisebb mértékben hígítva a mintát a pirolízis nem ment végbe teljesen, és a volframszál néhány mérés után használhatatlanná vált.

16. táblázat Hiteles anyagminták mérési eredményei WETV-ICP-TOFMS rendszeren

Elemek	Vérszérum (SRM 909)		Vérminta (404108)	
	Koncentráció			
	Mért	Hiteles	Mért	Hiteles
Li	11,1 ¹ ± 0,9	11,45 ¹	9,85 ¹ ± 0,07	--
Cu	1,46 ¹ ± 0,09	1,10 ¹	4,83 ¹ ± 0,09	--
Pb	19,0 ² ± 1,8	20,0 ²	379 ² ± 11	385 ² ± 5
Cr	84,7 ² ± 8,1	91,3 ²	--	7,5 ² ± 0,9

¹μg ml⁻¹, ²ng ml⁻¹

A 36. ábrán a vérszérum hiteles anyagminta 1:100 hígításban WETV-ICP-TOFMS rendszeren kapott jele látható. Igen gyors tranzienis jelek figyelhetők meg (félértékszélesség 0,1 – 0,3 s) melyek során a Cr, Cu, Li, Pb összesen nyolc izotópja volt meghatározható. A minta magas szerves anyag tartalma ellenére az 52 tömegszámon (⁵²Cr⁺/⁴⁰Ar¹²C⁺) nem volt jelentős zavaró hatás megfigyelhető, mivel a mátrix a pirolízis során eltávozott. A WETV rendszer nem csak egyszerű módszer kismennyiségű minták elemzésére, hanem - mint azt az előbbieken bemutattam – izobár interferenciák csökkentésére is alkalmas (⁵²Cr⁺/⁴⁰Ar¹²C⁺) ill. ⁵⁶Fe⁺/⁴⁰Ar¹⁶O⁺).



36. ábra

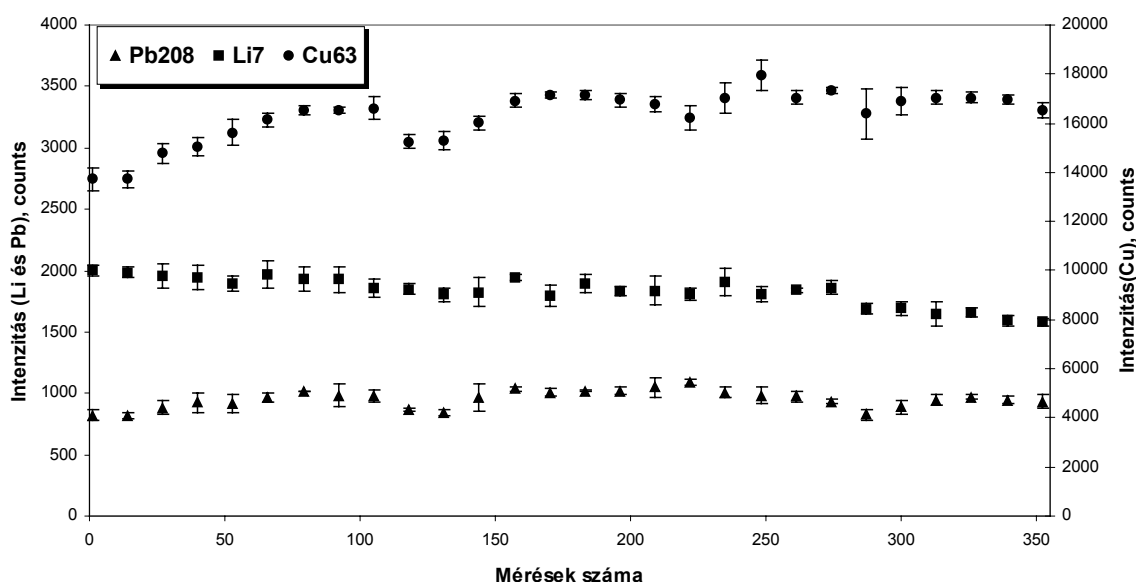
Vérszérum hiteles anyagminta (SRM 909) mérése során kapott tranzienis jelek

A volframszál stabilitásának vizsgálata

Mivel a fűtési program során a volframszál felületéről volfram is szabadabbá válik, és ez jól megfigyelhető volt az általam használt rendszer esetén is, szükségesnek tartottam annak megvizsgálását, hogy nagyszámú mérési ciklus során változnak-e az egyes elemek intenzitás értékei, ill. hány mérés végezhető el egyetlen volframszál felhasználásával.

A volfram olvadás- és forráspontja igen magas ($o_p=3410\text{ °C}$, $fp\sim 5700\text{ °C}$) ezért valószínűsíthető, hogy ez esetben a fűtési program során a minta komponenseivel (víz, salétromsav, ill. oxigén tartalmú vegyületek) történt reakció során képződött volfram vegyületek elpárolgása megy végbe. Lehetséges reakció termékek lehetnek a WO_3 ($o_p=1472\text{ °C}$, $fp=1750\text{ °C}$) és a WO_2 (bomlási hőmérséklet $1500 - 1700\text{ °C}$ között) (HOLLEMAN 1985, LIDE 1995), mely vegyületek sárga és kékes lila színe egybeesik a WETV cella és csatlakozó falán megfigyelt lerakódás színével.

Ezen megfigyelések ellenére a volframszál nagyfokú igénybevételt bírt ki, mind az optimalást, mind a minták mérését egy szál felhasználásával végeztem el. A stabilitás pontos dokumentálására egy új szállal 350 egymás utáni mérést végeztem el, mintának 1:100 hígítású vérszérumot használva. A vizsgálat eredményei a **37. ábrán** láthatóak, minden mérési pont három ismétlés eredménye, az ábrán a könnyebb áttekinthetőség kedvéért csak minden tizedik mérési pontot ábrázoltam.



37. ábra

Az elektrotermikus elpárolgató rendszer volframszáljának stabilitása 350 egymás utáni mérés során

Az eredmények alapján megállapítható, hogy 350 ismételt elpárologtatási ciklusnak nincs számottevő hatása sem a volframszál élettartamára, sem a jelintenzitás stabilitására. A vizsgált elemek (Li, Cu és Pb) 9 – 15 % közötti ismételhetséget mutatnak a vizsgálat során. Míg lítium esetén csökkenés tapasztalható, addig a réz kismértékű intenzitás-növekedést mutat; az ólom jelintenzitása volt a legstabilabb a vizsgálat során. A kismértékű változást a volframszál eltérő felmelegedése okozhatja, melyet kiválthat az esetleges volfram-karbid képződés ill. a volfram veszteség okozta változó elektromos ellenállás. E két hatás kiküszöbölésére kis mennyiségű hidrogén adagolható a vivőgázba ill. pirométerrel kombinált elpárologtató alkalmazható (BARTH 1997, HAUPTKORN 1997).

4.4.5 Összefoglalás

Ezen alfejezetben egy saját fejlesztésű, eddig az irodalomban még nem ismertett rendszert mutattam be, amely volfram szálon alapuló elektrotermikus elpárologtató rendszer (WETV) és egy induktív csatolású plazma repülési idő tömegspektrométer (ICP-TOFMS) kapcsolásán alapul. A rendszer jól ötvözi a WETV nagy mintabeviteli hatásfokát ill. az ICP-TOFMS nagyfokú alkalmasságát gyors tranziens jelek mérésére. A módszerfejlesztés során 17 elem egyidejű mérésére alkalmas WETV eljárást dolgoztam ki, amely igen gyors (0,6 s-nál kisebb félértékisélességű) jelek esetén is alkalmas ng - pg ml⁻¹ koncentráció tartományban történő nyomelem analízisre. A módszer megbízhatóságát összetett mátrixszal rendelkező vészérum és teljes vér hiteles anyagmintán ellenőriztem, és jó megfelelést találtam a bizonylatolt értékekkel.

A módszer további előnye, hogy segítségével egyes zavaró hatások kiküszöbölhetők ill. jelentősen csökkenthetők, amennyiben a zavaró komponens és a meghatározandó elem között illékonyág különbség van. Ezt kihasználva a mérés előtt a zavaró komponens elpárologtatható, és a meghatározás zavaró hatás mentesen elvégezhető. Mátrixmódosító vegyületeket alkalmazva a módszer szelektivitása tovább növelhető.

A WETV-ICP-TOFMS módszer szilárd elválasztás-technikával kombinálva (pl. gél elektroforézis) alkalmassá tehető szerves nagymolekulák pl. metallothioneinek meghatározására ill. azonosítására, kihasználva a szerves vegyületekhez kötött különböző fémek (pl. Cu, Cr, Fe) egyidejű meghatározásának lehetőségét.

4.5 Nagynyomású porlasztó és induktív csatolású plazma repülési idő tömegspektrométer kapcsolása flow-injection módban, FI-HHPN-ICP-TOFMS

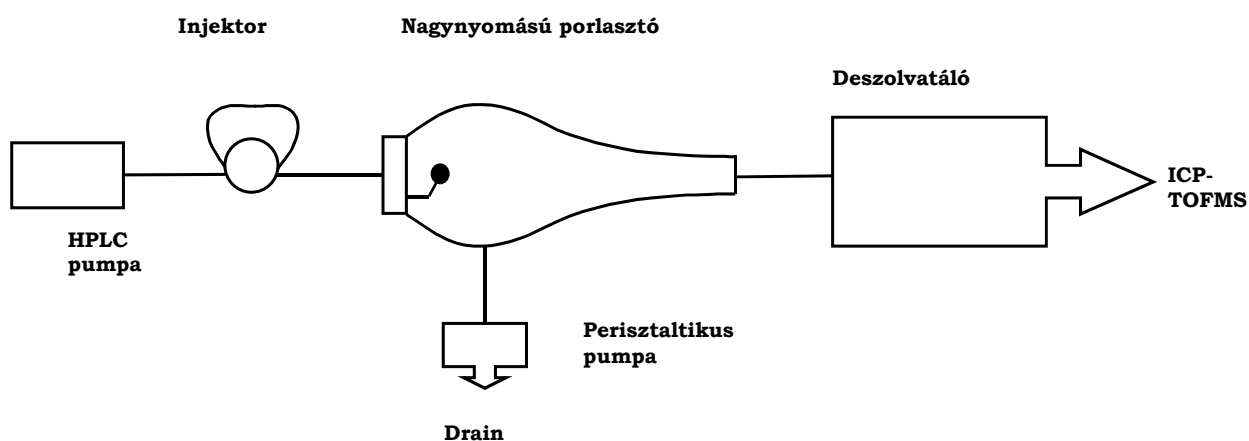
Az eredmények ismertetésének utolsó fejezetében egy olyan szimultán többelemes nyomelem meghatározásra alkalmas rendszert mutatok be, amely a nagynyomású porlasztó nagy mintabeviteli hatásfokának ill. az ICP-TOFMS gyorsaságának előnyeit használja ki. A módszer további előnye a flow-injection kísérleti elrendezés, amely jelentősen csökkenti a mérés időszükségletét.

4.5.1 Felhasznált vegyszerek és eszközök

Minden felhasznált vegyszer analitikai tisztaságú volt. A kalibrációs törzsoldatokat 1000 mg dm⁻³ töménységű egyelemes standardeből készítettem (Merck, Darmstadt, Németország), az alábbi elemek felhasználásával: Ag, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cu, Ga, In, Li, Mn, Mo, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, Tl, V és Zn. A minta-előkészítéshez hidrogén-peroxidot (Merck) és tömény salétromsavat használtam (Scharlau Chemie, Barcelona, Spanyolország). A módszer validálását három hiteles anyagminta elemzésével végeztem:

- TORT-2, („Lobster Hepatopancrease”, National Research Center, Halifax, Canada)
- BCR-422 (“Cod Muscle”, Community Bureau of Reference, Belgium)
- IAEA MA-B-3/TM (“Fish Homogenate” International Atomic Energy Agency, Austria)

Minden méréshez nagytisztaságú ioncserélt vizet használtam (Elga Ltd., High Wycombe Bucks, Anglia; R>10 MΩ). A szállító közegként használt ioncserélt víz gázmentesítéséhez Realsonic RS 16-F ultrahangos vízfürdőt használtam (Realsonic, Budapest, Magyarország).



38. ábra

FI-HHPN-ICP-TOFMS rendszer sematikus felépítése

16. táblázat FI-HHPN-ICP-TOFMS rendszer működési paraméterei

HHPN paraméterek

Minta áram	1,4	ml min ⁻¹
Fűtés	170	°C
Hűtés	-5	°C

ICP paraméterek

Frekvencia	40,68	MHz
Kicsatolt teljesítmény	1250	W
Porlasztó gázáram	1,35	l min ⁻¹

Tömegspektrométer paraméterek

Ion lencse 1	-451	V
Ion lencse 2	-426	V
Reflectron low	191	V
Reflectron high	1523	V
Detektor feszültség	-2150	V
Y steering	-1680	V
Einzel lencse 1	-1460	V
Einzel lencse 2	-895	V
X steering	-1507	V

Tranziens paraméterek

Mérés időtartama	60	s
Integrációs idő	1	s
Injektált mintamennyiség	200	µl

Ion kizárás

kezdet [µsec]	Szélesség [µsec]	amu
0,916	0,118	12-16
1,204	0,360	23-40
1,781	0,030	56
2,089	0,030	80

A méréseket Leco Renaissance ICP-TOFMS (Leco, St. Joseph, MI, USA) készüléken végeztem, a mátrix ionokat (pl. N⁺, O⁺, ArO⁺, Ar⁺, ArAr⁺) a detektor megóvása érdekében kizártam az ioncsomagból (ion deflection). A detektor feszültségét -2150 V-ra állítottam, mivel a detektor élettartama a feszültség növelésével arányosan csökken. A mintabeviteli egység a 3.1 alfejezetben ismertetett HPLC pumpából, injektorból ill. nagynyomású

porlasztóból állt. A mérésekhez 200 µl térfogatú mintabevivő hurkot használtam. Az esetleges szennyeződések elkerülése végett a rendszerben található fém alkatrészeket PEEK kiegészítőkre cseréltem, csak az injektor és a porlasztó tartalmazott fémből készült részeket. A **38. ábra** a rendszer felépítését, a **16. táblázat** az optimált működési paramétereket mutatja.

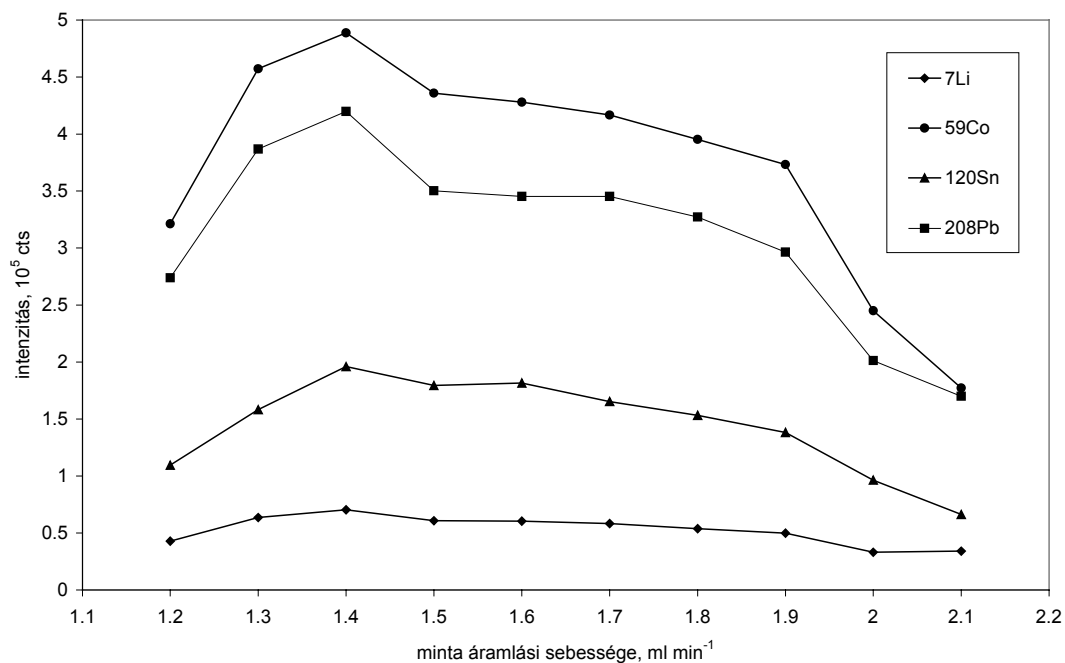
4.5.2 FI-HHPN-ICP-TOFMS paramétereinek optimalálása

A plazma pozíció, generátor teljesítmény és az ionoptika optimalálását folyamatos mintabevitel mellett végeztem el. Ezen előzetes optimalálás során a HPLC pumpa áramlási sebessége 1,2 ml min⁻¹, a porlasztó gázárama 1,3 l min⁻¹, a deszolvatáló rendszer fűtési és hűtési hőmérséklete 160 °C és 0 °C volt.

A minta és a porlasztó gáz áramlási sebességének, valamint a deszolvatáló rendszer fűtési és hűtési hőmérsékletének optimalálása szintén folyamatos módban történt. Az optimaláláshoz 5 ng ml⁻¹ koncentrációjú többelemes oldatot használtam, amely az alábbi elemeket tartalmazta: Ag, As, Ba, Cd, Co, Cu, Ga, In, Li, Mn, Mo, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, Tl, V és Zn. Az optimált paraméterek hatását a ⁵⁹Co, ⁷Li, ²⁰⁸Pb és ¹²⁰Sn jelintenzitás változásán keresztül mutatom be. Optimumnak minden esetben a háttérkorrekció utáni maximális jelintenzitást tekintettem.

A minta áramlási sebességének optimalálása

A mintabevitel hatásfokát meghatározó egyik legfontosabb tényező a folyadék áramlási sebessége. Növekvő áramlási sebességnél a keletkezett aeroszol mennyisége, így a bejuttatott mintamennyiség is növekedik. Ezen túl az áramlási sebesség flow-injection kísérleti elrendezés esetén a csúcsalakot is meghatározza (ABRANKÓ 2003). Az optimalálás során 1,2 – 2,1 ml min⁻¹ között változtattam a folyadék áramlási sebességét. Az eredmények a **39. ábrán** láthatók. Maximális jelintenzitást 1,4 ml min⁻¹ áramlási sebességnél tapasztaltam, e fölött az érték fölött csökkent a vizsgált izotópok jelintenzitása. Ennek oka lehet a nagyobb fokú aeroszol kondenzáció a porlasztó kamra falán, ami a porlasztó felépítéséből következik. Okozhatja továbbá, hogy a deszolvatáció ilyen mértékű aeroszol bevitelnél már nem kielégítő, így a plazmába jutó nagy mennyiségű nedvesség elpárologtatásához jóval nagyobb energia szükséges, csökkentve ezzel az ionizációra fordítható energia mennyiségét.



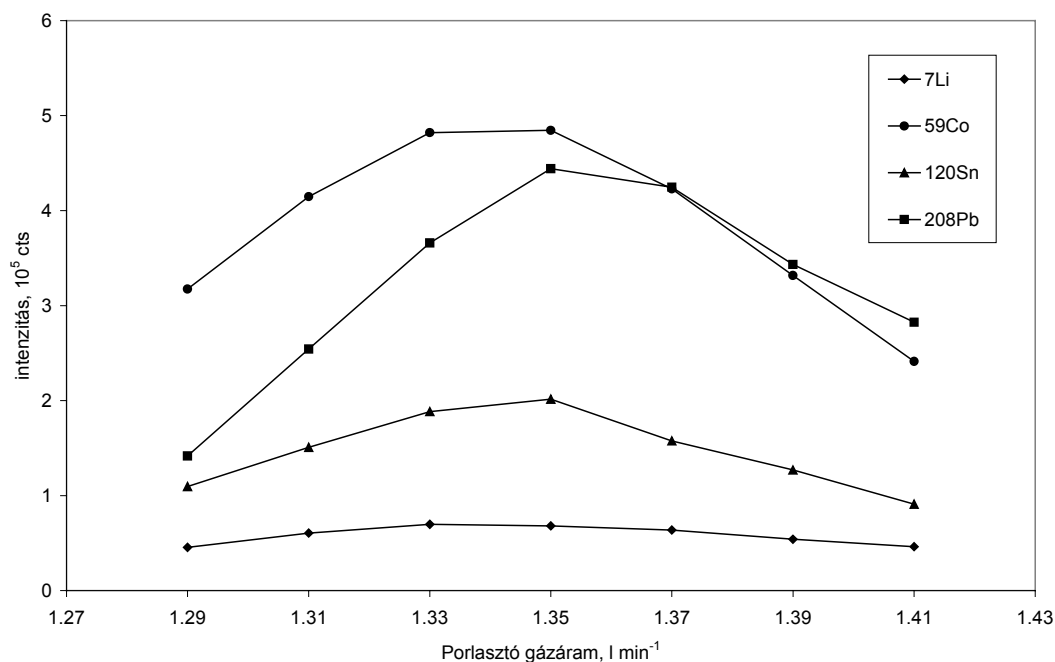
39. ábra

A minta áramlási sebességének hatása a ⁵⁹Co, ⁷Li, ²⁰⁸Pb és ¹²⁰Sn jelintenzitására

A porlasztó gázáram optimálása

A porlasztó gáz szerepe kettős; egyrészt a ködkamrában keletkező aeroszol plazmába juttatását végzi, így megszabja a plazmába jutó mérendő anyag mennyiségét, másrészt a részecskék plazmában való tartózkodási idején keresztül befolyásolja az ionizáció mértékét. A kettős hatás jól látható a 40. ábrán, melyen a porlasztó gáz áramlási sebességének jelintenzitásra gyakorolt hatását mutatom be.

Az optimálás során 1,29 és 1,41 l min⁻¹ intervallumot vizsgáltam. Mindegyik vizsgált izotóp esetén klasszikus optimum görbe volt megfigyelhető, melyek magyarázatául a fent leírt két, egymással ellentétes hatás szolgál.



40. ábra

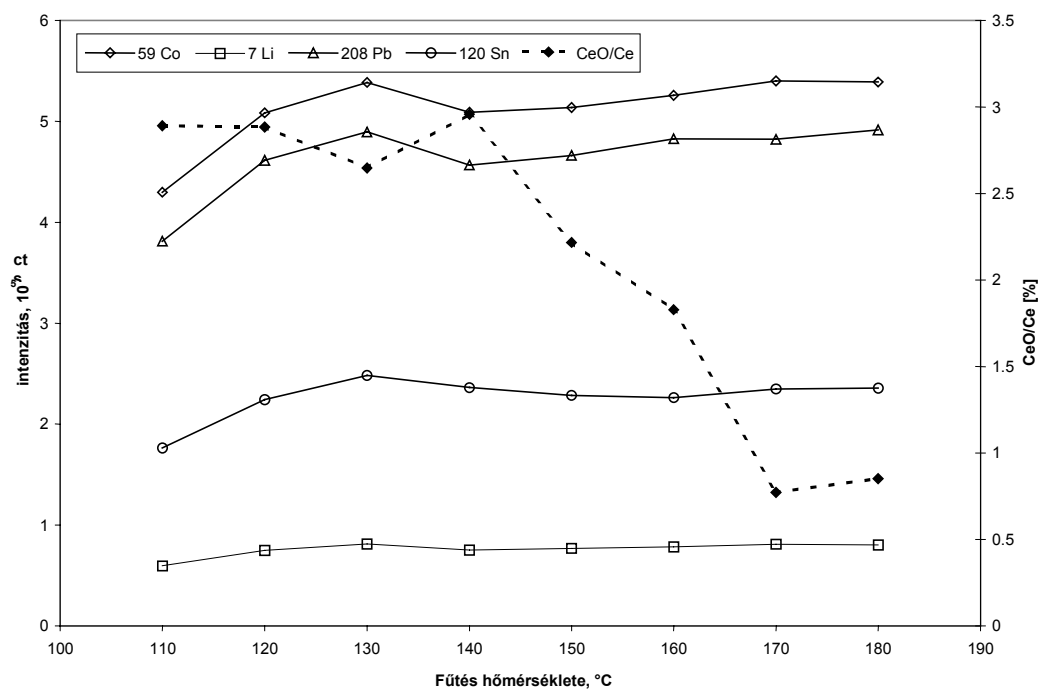
A porlasztási gázáram sebességének hatása a ⁵⁹Co, ⁷Li, ²⁰⁸Pb és ¹²⁰Sn jelintenzitására

A deszolvatáció fűtési és hűtési hőmérsékletének optimalizálása

A nagynyomású porlasztó nagy mintabeviteli hatásfoka egyben nagy folyadékterhelést is jelent az ionforrásnak, ezért a plazmába történő bevezetés előtt mindenképpen szükséges a deszolvatáció, mely jelen esetben egy egymás után kapcsolt fűtő és hűtő egységből állt. Mivel a plazmában jelen lévő oxigén - mely a plazmába jutó víz egyik legjobb indikátora - és a képződő oxidok mennyisége között szoros összefüggés van, az optimalizálást a háttérkorrekció utáni maximális jelintenzításra, valamint a CeO/Ce arány minimumára végeztem el.

A hűtés hatásának vizsgálata során 5 és –10 °C között változtattam a hőmérsékletet. Mivel nem találtam összefüggést a vizsgált jellemzők között, így az irodalomban ajánlott – 5 °C-os hűtési hőmérsékletet választottam a további vizsgálatokhoz (LUO 1994).

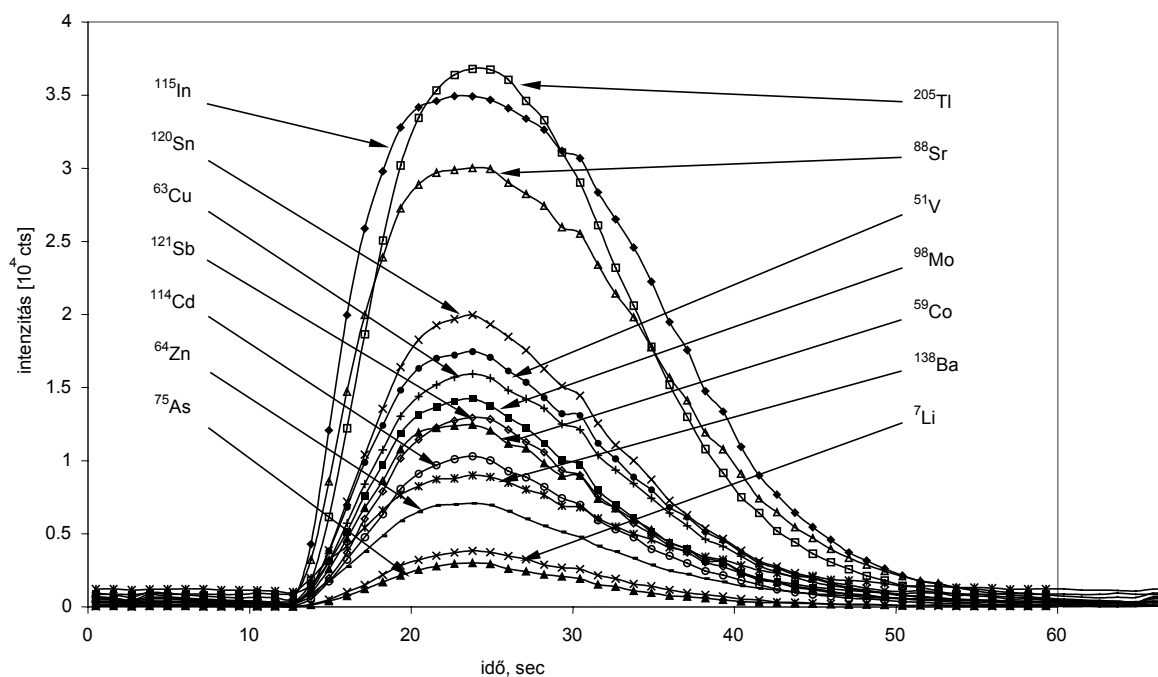
A fűtési egység hőmérsékletét 110 – 180 °C tartományban változtattam. Az eredmények a 41. ábrán láthatók. A jelintenzitás 150 °C felett nem nő számottevően, míg a CeO/Ce arány 140 °C-tól 170 °C-ig folyamatosan csökken, így optimális értéknek a 170 °C-ot vettem, és ezt használtam a további munka során.



41. ábra

A deszolvatáció fűtési hőmérsékletének hatása a ^{59}Co , ^7Li , ^{208}Pb és ^{120}Sn jelintenzitására

A FI-HHPN-ICP-TOFMS rendszer alkalmasságát tranziens jelek esetén szimultán nyomelem meghatározásra jól példázza a 42. ábrán látható tranziens jel, amely 14 elem együttes meghatározását mutatja 5 ng ml^{-1} koncentrációjú többelemes oldatban. Az átlagos félértékszélesség 15 másodperc, a teljes mérés 60 másodpercnél kevesebb időt vesz igénybe.



42. ábra

FI-HHPN-ICPTOFMS rendszeren kapott tranziens jel 5 ng ml⁻¹ koncentrációjú többelemes oldat injektálása után

4.5.3 A FI-HHPN-ICP-TOFMS rendszer analitikai teljesítőképességének vizsgálata

Az analitikai teljesítőképesség vizsgálata során a kimutatási határokat és az ismételhetőséget ill. a módszer lineáris tartományát határoztam meg. A vizsgálathoz különböző koncentrációjú többelemes vizes oldatokat használtam, amelyek az alábbi elemeket tartalmazták: Ag, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cu, Ga, In, Li, Mn, Mo, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, Tl, V és Zn. Mind a kimutatási határ, mind az ismételhetőség meghatározásához a tranziens jelek csúcsterületeit használtam.

A kimutatási határokat és ismételhetőséget a 17. táblázat tartalmazza. A kapott eredményeket olyan irodalmi adatokkal hasonlítottam össze, melyek szintén ICP-TOFMS detektáláson, de elérő mintabeviteli technikákon – Meinhard porlasztó (folyamatos üzemmódban) ill. hidridfejlesztés (flow-injection) – alapulnak (TIAN 1999, CENTINEO 2000). A kimutatási határokat összevetve láthatjuk, hogy a folyamatos pneumatikus porlasztással egy nagyságrenddel jobb eredmények érhetők el, ami egybevág korábbi irodalmi megfigyelésekkel (TIAN 1999). Ennek oka, hogy folyamatos üzemmódban több idő áll rendelkezésre, hogy a plazma a minta bejutása után stabilizálódjon ill. annak is köszönhető,

hogy az összehasonlításban szereplő munkában jóval nagyobb detektor feszültséget alkalmaztak (-2750 V), amit én a minél hosszabb detektor élettartam érdekében elkerültem. Néhány elem esetén, mint Cu, Mn, Pb a kimutatási határok több nagyságrenddel is rosszabbak, mint pneumatikus porlasztót használva, ennek oka lehet az injektor ill. a porlasztó fém alkatrészei által okozott szennyezés, amely teljes egészében fémmentes kiegészítővel kiküszöbölhető. A hidridképző elemek, pl. As, Sb, Sn kimutatási határai megegyeznek a pneumatikus porlasztó és a hidridfejlesztés során kapott kimutatási határokkal, amely bizonyítja a HHPN nagy mintabeviteli hatásfokát.

17. táblázat Különböző mintabeviteli módszerek összehasonlítása ICP-TOFMS detektálás esetén

	ICP-TOFMS ^a	FI-HG-ICP-TOFMS ^b		FI-HHPN-ICP-TOFMS	
	LOD (ng ml ⁻¹)	LOD (ng ml ⁻¹)	RSD% (100 ng ml ⁻¹) (n=5)	LOD (ng ml ⁻¹)	RSD% (10 ng ml ⁻¹) (n=5)
¹⁰⁷ Ag	0,007			0,098	1,3
⁷⁵ As	0,053	0,1	2,4	0,064	2,5
¹³⁸ Ba	0,004			3,748	5,4
¹¹⁴ Cd	0,007			0,029	1,3
⁵⁹ Co	0,017			0,128	3,2
⁶³ Cu	0,004			1,101	6,5
⁶⁹ Ga	0,006			0,024	1,3
¹¹⁵ In	0,001			0,011	1,0
⁷ Li	0,001			0,023	1,8
⁵⁵ Mn	0,002			1,184	9,6
⁹⁸ Mo	0,019			0,558	3,9
²⁰⁸ Pb	0,004			0,898	3,7
¹²¹ Sb	0,014	0,04	0,5	0,026	1,8
⁷⁷ Se				0,473	2,2
⁷⁸ Se		5,5	2,0	3,401	0,5
¹²⁰ Sn	0,021	0,4	3,9	0,067	2,0
⁸⁸ Sr	0,004			0,023	1,0
²⁰⁵ Tl	0,002			0,011	1,3
⁵¹ V	0,011			0,126	3,4
⁶⁴ Zn	0,057			0,799	3,9

a: TIAN, 1999

b: CENTINEO, 2000

Az ismételhetséget 10 ng ml⁻¹ koncentrációjú többelemes törzsoldat öt egymást követő injektálásából számoltam, és a tranziens jelek területeit vettem alapul a kiértékeléskor. Az

eredmények 0,5-9,6 % között változnak, az elemek többségénél 1-3 % közötti RSD értékeket kaptam. A módszer lineáris tartománya ion számlálási módban (ion counting mode) 4 nagyságrendnyi, amely az analóg módot is használva tovább növelhető.

4.5.4 Hiteles anyagminták vizsgálata FI-HHPN-ICP-TOFMS rendszerrel

A módszer validálását három különböző biológiai eredetű hiteles anyagminta elemzésével végeztem el. Minden minta az alábbi minta-előkészítési eljáráson esett át az elemzést megelőzően: 0,2 g mintát 2 ml tömény HNO₃ és 2 ml cc. H₂O₂ elegyében, zárt teflonbombában kukta segítségével 110°C-on roncsoltam 20 percen keresztül. A roncsolás végeztével az elegyet 10 ill. 100 ml-es mérőlombikban (Lásd. 18. táblázat magyarázat) ioncserélt vízzel jelre töltöttem. Minden mintát háromszor elemeztem külső kalibrációt használva. Bár a kidolgozott FI-HHPN-ICP-TOFMS módszerrel 19 elem együttes elemzése is elvégezhető, a validálás során csak tíz elemet tudtam vizsgálni, mivel a hiteles anyagminták gyártói csak ennyi elemre adtak meg hiteles értékeket.

Az elemzés eredményei a 18. táblázatban láthatók. A minták nagy részét 500-szoros hígításban tudtam mérni, a FI-HHPN-ICP-TOFMS igen jó kimutatási határainak köszönhetően, így az összetett mátrix zavaró hatását is csökkenteni lehetett. Megállapítható, hogy a mért elemek nagy része mindhárom hiteles anyagminta esetén hibahatáron belül volt. A TORT-2 jelzésű mintában a Mn és Mo viszonylag nagy eltérést mutat, amely a rendszer fent említett szennyezési forrásainak tudható be. Összegezve megállapítható, hogy a módszer alkalmas szimultán többelemes nyomelem meghatározásra kis mennyiségű, összetett mátrixú mintákból.

18. táblázat Hiteles anyagminták elemzésének eredményei FI-HHPN-ICP-TOFMS rendszeren Az értékek mg kg⁻¹ mértékegységben vannak megadva.

	TORT-2		BCR 422		IAEA MA-B-3/TM	
	Homár hepatopankreáz (Lobster Hepatopancreas)		Tőkehal izom (Cod Muscle)		Hal őrlemény (Fish homogenate)	
	mért érték	hiteles érték	mért érték	hiteles érték	mért érték	hiteles érték
As	27,2 ± 5,4	21,6 ± 1,8	33,9 ± 2,4	21,1 ± 0,5	3,4 ± 1,6	2,11 (1,42-2,51)
Cd	24,0 ± 2,6	26,7 ± 0,6	0,02 + 0,004 ^b	0,017 ± 0,002	1,6 ± 0,4	nc
Co	0,64 ± 0,03	0,51 ± 0,09	0,3 ± 0,03	nc ^a	0,3 ± 0,09	nc
Cu	109 ± 5,1	106 ± 10	1,11 + 0,06 ^b	1,05 ± 0,07	3,64 ± 0,19	3,08 (2,85-3,57)
Li	0,7 ± 1,3	2,5 ± 0,19	1,7 ± 1,5	nc	0,5 ± 0,4	nc
Mn	23,3 ± 1,6	13,6 ± 1,2	0,63 + 0,13 ^b	0,543 ± 0,028	4,2 ± 1,38	2,62 (2,22-3,03)
Mo	0,3 ± 0,1	0,95 ± 0,1	0,6 ± 0,1	nc	1,2 ± 0,08	nc
Pb	0,41 + 0,07 ^b	0,35 ± 0,13	0,12 + 0,03 ^b	0,085 ± 0,01	5,2 ± 0,9	4,62 (3,85-5,13)
Sr	45,4 ± 3,3	45,2 ± 1,9	3,4 ± 1,1	nc	32,4 ± 0,2	29,9 (24,9-37,9)
Zn	179 ± 12	180 ± 6,0	21,9 ± 4,5	19,6 ± 0,5	108 ± 8,8	109,2 (106,4-110,9)

a: nem hitelesített

b: 50-szeres hígításban mért

4.5.5 Összefoglalás

A bemutatott munka során a nagynyomású porlasztó és az ICP-TOFMS előnyeit egyesítve egy, eddig nem publikált, gyors, nagy érzékenységű nyomelem analitikai módszert fejlesztettem ki. A módszer egyrészt a HHPN nagy mintabeviteli határfokát kihasználva úgy alkalmas flow-injection mintabevitelre, hogy a kis mintamennyiség ellenére a kimutatási határok nem romlanak jelentősen a jóval több mintát igénylő folyamatos Meinhard porlasztással összevetve. Az ICP-TOFMS kvázi szimultán detektálási képessége miatt a gyors tranziens jelekből is lehetőség van nagyszámú mérendő izotóp (19 elem) meghatározására, ami más (pl. quadrupól) tömeganalizátort használó ICP-MS esetén nem lenne kivitelezhető. A bemutatott kísérleti elrendezésben körülbelül ötször kisebb a mintaigény, mint konvencionálisan használt porlasztókkal (egy méréshez 200 µl mintára van szükség), így a tömegspektrométer mintavevő kónuszainak (sampler, skimmer) és a detektor terhelése

jelentősen csökkenthető, akár igen összetett mátrixú minta esetén is, ahol folyamatos módban a kónuszok gyakori tisztítására lenne szükség.

Hiteles anyagminták elemzésével bizonyítottam a módszer alkalmasságát összetett mátrixú mintákból történő nyomelem meghatározásra. A deszolvatáció paramétereinek gondos megválasztásával a plazmában keletkező oxidok okozta zavaró hatás jelentősen csökkenthető. A módszer tovább bővíthető folyadék kromatográfiás elválasztás-technikával, amely nem csak az izotóp meghatározás, hanem a szerves molekulákhoz kötött fémek speciációjának lehetőségét is magában rejti.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Olyan HPLC elválasztáson és AFS detektáláson alapuló szelénspeciációs rendszert fejlesztettem ki, amely a meghatározandó specieszek minőségétől, mennyiségétől ill. az adott minta mátrixától függően eltérő mintabeviteli módszerekkel használható. Igazoltam, hogy a rendszerfejlesztés egyre javuló eredményekhez és az adott rendszerből kihozható elméletileg legjobb kimutatási határokhoz vezet. A módszerfejlesztés végső eredményeként jelentős, három nagyságrendnyi kimutatási határ javulást értem el.
2. A HPLC-AFS rendszerben alkalmazott mintabeviteli módszereknél megállapítottam, hogy:
 - a) A HHPN atomfluoreszcens detektorhoz csatolása egyszerűen kivitelezhető, de rendszertechnikai szempontból nem optimális, az így kialakított rendszer viszonylag rossz kimutatási határral és kis zavartűréssel rendelkezik. A HPLC-HHPN-AFS rendszer háttérjele mátrixfüggő, ezért a helyes kiértékeléshez elengedhetetlen az AFS technikánál nem szokványos háttérkorrekció.
 - b) Szeleno-aminosavak előzetes derivatizációs eljárás nélkül is képesek illékony szelén specieszeket képezni. Meghatároztam - az irodalomban elsőként – az egyes szeleno-aminosavak hidridképzési hatásfokát, amely ugyan elmarad a száz százaléktól, de a hagyományos pneumatikus porlasztók mintabeviteli hatásfokát jelentősen meghaladja.
 - c) Az ibolyán túli fénnel történő besugárzás a szeleno-aminosavak hidridképzési hatásfokát jelentősen javítja, míg a szervesetlen szelén specieszekét csekély mértékben befolyásolja.
 - d) Azonos szelén koncentráció mellett a különböző szelén specieszek atomfluoreszcens jelének intenzitása eltér egymástól, ami megköveteli az elemzőgörbék specieszenkénti hitelesítését. A jelenség az egyes szelén specieszek hidridképzési hatásfokának és atomizációs sajátosságainak eltéréseivel magyarázható.
3. A kifejlesztett HPLC-AFS csatoláson alapuló speciációs rendszerekkel az öt leggyakrabban vizsgált szelén speciesz (SeMet, SeEt, SeCys₂, szelenát, szelenit) meghatározására alkalmas módszereket dolgoztam ki, melyeket sikeresen alkalmaztam élelmiszer minták (brazil dió, csiperke, szelén tartalmú táplálék-kiegészítő) szelén speciációjára. Nemzetközi hiteles speciációs anyagminták hiányában a kidolgozott módszerek pontosságát standard addíciós és spiking

technikákkal ellenőriztem, és megállapítottam, hogy azok kielégítik a speciációs analitikával szemben támasztott követelményeket.

4. A kifejlesztett ICP-TOFMS detektáláson alapuló rendszereknél a mintabeviteli technikákkal kapcsolatosan megállapítottam, hogy:

a) Az először általam leírt WETV-ICP-TOFMS rendszerben a WETV mind rendszertechnikai mind analitikai oldalról ideális mintabeviteli technika, amely nagy mintabeviteli hatásfokkal rendelkezik, rendkívül kis mintaigényű és igen gyors elemzést tesz lehetővé.

b) A HHPN összehasonlítva más mintabeviteli eljárásokkal (pneumatikus porlasztás, hidridképzés) a rendszer analitikai teljesítőképességének javulását okozza. A HHPN nagy mintabeviteli hatásfokának köszönhetően flow-injection üzemmódban is használható, ami jelentős mintaigény és analízis idő csökkenést eredményez.

c) Más mintabeviteli technikákkal szemben mind a WETV mind a HHPN módszer alkalmas az ICP-MS technikában megjelenő bizonyos zavaró hatások kiküszöbölésére ill. mérséklésére. Ezen zavaró hatások csökkentésének lehetőségét gyakorlati példákon keresztül is igazoltam. Bebizonyítottam az 56-os tömegszámon az ArO^+ ill. az 52-es tömegszámon a ArC^+ zavaró hatásának csökkenthetőségét WETV rendszerrel, ill. a CeO/Ce arány csökkentésének példáján megmutattam, hogy a HHPN utáni deszolvatáció paramétereinek gondos megválasztásával a plazmában keletkező oxidok okozta zavaró hatás jelentősen csökkenthető.

5. Megállapítottam, hogy az ICP-TOFMS az izotópok kváziszimultán detektálása miatt ideális gyors lefutású tranziens jelek mérésére, különösen nagyszámú mérendő izotóp esetén. Ilyen esetben a meghatározandó izotópok száma nem befolyásolja a mérés megbízhatóságát.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során a speciációs analitika két területével foglalkoztam: a szerves molekulákhoz kötött szelén specieszek meghatározására alkalmas módszerek kidolgozásával, valamint az elemek különböző izotópjainak mérésére alkalmazható rendszerek fejlesztésével. Mindkét esetben a nagyhatásfokú mintabevitel alkalmazhatóságának vizsgálata állt kutatásaim középpontjában.

Szelén speciációra HPLC elválasztáson és AFS detektáláson alapuló speciációs rendszert fejlesztettem ki, melyet három különböző mintabeviteli technikával (nagynyomású porlasztó, közvetlen hidridfejlesztés és előzetes derivatizációs eljárással kombinált hidridfejlesztés) alkalmaztam szeleno-cisztin, szeleno-metionin, szeleno-etionin, szelenit és szelenát meghatározására. Mindegyik módszert sikerrel alkalmaztam élelmiszerminták (csiperke, szelén tartalmú táplálék-kiegészítő és brazil dió) szelén speciációjára.

Az izotóp meghatározást ICP-TOFMS készülékkel végeztem, melyet két nagy hatásfokú mintabeviteli technikával: volfram szálon alapuló elektrotermikus elpárologtatással (WETV) és nagynyomású porlasztóval, „flow-injection” üzemmódban (FI-HHPN) kapcsoltam össze. Mindkét módszer jól ötvözi a WETV és a HHPN nagy mintabeviteli hatásfokát ill. az ICP-TOFMS nagyfokú alkalmasságát gyors transziens jelek mérésére. Mindkét esetben jó analitikai teljesítőképességgel rendelkező rendszert kaptam, melyek alkalmasságát nyomelem analitikai feladatok megoldására hiteles anyagminták elemzésével igazoltam.

SUMMARY

Two different fields of speciation, the topic of covalently bound selenium species (selenoamino acids) and the isotopic composition of different trace elements were studied in the presented work. The work was focused on the application of high efficiency sample introduction methods in the above mentioned fields of speciation.

A hyphenated system based on HPLC separation and AFS detection was used for selenium speciation employing different sample introduction techniques, i.e. hydraulic high pressure nebulizer, direct hydride generation and hydride generation combined with thermal digestion and ultraviolet irradiation. It has been shown that by using the developed methods it is possible to separate and detect the five most important seleno species, namely seleno-cystine, seleno-methionine, seleno-ethionine, selenite and selenate. The methods were applied to the selenium speciation of different food samples, i. e. champion, brazil nuts and food supplement.

ICP-TOFMS combined with WETV and FI-HHPN was used for the determination of isotopic composition of different trace elements. The developed methods provide a perfect combination of the high sample introduction efficiency of the WETV and HHPN and the capability of the ICP-TOFMS for the simultaneous detection of a large number of isotopes in short transient signals.

The capability of the system for trace element analysis in samples with complicated matrices was demonstrated by the analysis of certified reference materials indicating good agreement between the measured and the certified values.

IRODALOMJEGYZÉK

- ABALOS M. (1997): Analytical procedures for the determination of organotin compounds in sediment and biota: a critical review, *Journal of Chromatography A*, 788 1-49
- ABOUL DAHAB O. (1997): Chromium distribution in waters and sediments of the eastern side of The Qatari Peninsula, *The Science of The Total Environment* 196 1-11
- ABRANKÓ (2003): Possibilities and limits of the simultaneous determination of As, Bi, Ge, Sb, Se, and Sn by flow injection hydride generation - inductively coupled plasma – time of flight mass spectrometry (FI-HG-ICP-TOFMS), *Analytica Chimica Acta*, (submitted for publication)
- ABRANKÓ L. (2002): Induktív csatolású plazma – repülési idő tömegspektrometria (ICP-TOFMS) élelmiszeranalitikai alkalmazhatósága, Diplomamunka, Szent István Egyetem, Alkalmazott Kémia Tanszék
- ALFTHAN G. (1995): The geochemistry of selenium in groundwaters in Finland, *The Science of The Total Environment* 162 93-103
- BARBASTE M. (2001): Evaluation of the accuracy of the determination of lead isotope ratios in wine by ICP-MS using quadrupole, multicollector magnetic sector and time-of-flight analyzers, *Talanta*, 54 307-317
- BAREFOOT (2001): Speciation of platinum compounds: a review of recent applications in studies of platinum anticancer drugs, *Journal of Chromatography B* 751 205-211
- BARTH P. (1997): Improved Slurry Sampling Electrothermal Vaporization System Using a Tungsten Coil for Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12, 1351-1358
- BENDAHL L. (2001): Interfacing capillary electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometry by direct injection nebulization for selenium speciation, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16 38-42
- BINGS N. H. (2003): Flow injection electrochemical hydride generation inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry for the simultaneous determination of elements forming hydride, *Analytica Chimica Acta*, 479, 203-214
- BUFFLE J.(Szerk) (1993): In Environmental Particles II, IUPAC Series on Environmental Analytical and Physical Chemistry, Lewis, Boca Raton, 117-164

- CASIOT C (1998): Simultaneous speciation of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in waters and soil extracts by capillary electrophoresis and UV detection, *The Analyst* 123 2887-2894
- CENTINEO G (2000): Flow injection analysis with inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry for the simultaneous determination of elements forming hydrides and its application to urine, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry.*, 15, 1357-1362.
- CHERY C.C. (2002): Detection and quantification of selenium proteins by means of gel electrophoresis and electrothermal vaporization ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 576-580
- CODDING E. G. (1980): Atomic absorption spectrometry with a photo-diode array spectrometer, *Analytical Chemistry*, **52**, 2133-2140
- CORNS W.T. (1993): Development of an Atomic Fluorescence Spectrometer for the Hydride-forming Elements, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 8 71-77
- COSTA-FERNANDEZ J. M. (2000): Rapid simultaneous multielemental speciation by capillary electrophoresis coupled to inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1063-1067
- DAMINELLI G. (1999): Atomic and molecular spectra of vapours evolved in a graphite furnace. Part 2: Magnesium chloride, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 54, 683-697
- DAY J.A. (2002): A study of method robustness for arsenic speciation in drinking water samples by anion exchange HPLC-ICP-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373 664-668
- DERNOVICS M. (2002): Improving selenium extraction by sequential enzymatic processes for Se-speciation of selenium-enriched *Agaricus bisporus*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **372**, (2002), 473-480
- DERNOVICS M.(2003): Mintaelőkészítési módszerek kidolgozása és referenciaanyagok előállítása módosult analitikai célokra, PhD értekezés, Szent István Egyetem, Alkalmazott Kémia Tanszék
- EISLER R. (1986): Chromium hazards to fish, wildlife and invertebrates. A synoptic review: Biological Report 85 (1-6)
- EVANS E.H. (1993): Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 8 1-18
- FODOR P. (1995): Problems of the speciation of chromium in soil samples, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 351 454-455

- GODOI A. F. L. (2002): Determination of butyltin compounds in surface sediments from the ~ Sao Paulo State coast (Brazil) by gas chromatography–pulsed flame photometric detection, *Journal of Chromatography A*
- GÓMEZ M.M. (1998): Determination of five selenium compounds in urine by liquid chromatography with focused microwave assisted digestion and hydride generation- atomic absorption spectrometric detection, *Analytica Chimica Acta* 374 241-251
- GÓMEZ-ARIZA J.L. (2000): Column-switching system for selenium speciation by coupling reversed-phase and ion-exchange high-performance liquid chromatography with microwave-assisted digestion-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 889 33-39
- GONZÁLEZ J. M. (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, 423-429
- HANN S. (2001): HPIC-UV-ICP-SFMS study of the interaction of cisplatin with guanosine monophosphate, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 370 581-586
- HAUPTKORN S. (1997): Determination of Trace Impurities in High-purity Quartz by Electrothermal Vaporization Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Using the Slurry Sampling Technique, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12, 421-428.
- HE B. (2000): Arsenic speciation based on ion exchange high-performance liquid chromatography hyphenated with hydride generation atomic fluorescence and on-line UV photo oxidation, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 368 803-808
- HERTEL R. F. (1991): IPCS Environmental Health Criteria 108: Nickel, Genova: World Health Organisation
- HEUDI O. (1998): Kinetic studies of the reactivity between cisplatin and its monoaquated species with L-methionine, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 71 61-69
- HOLLEMAN A. F. and WIBERG E. (1985): Lehrbuch der anorganischen Chemie, de Gruyter, 100th edn
- HYMER C.B. (1998) Comparison of four nebulizer-spray chamber interfaces for the high-performance liquid chromatographic separation of arsenic compounds using inductively coupled plasma mass spectrometric detection *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 855-858
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogen Risk of Humans (1990): Chromium, Nickel and Welding, IARC, Lyons

IPLYI I.(2001): Speciation of inorganic selenium and selenoamino acids by an HPLC-UV-HG-AFS system, *Journal of Automated Methods and Management*, **23**, 167-172, 2001.

KOTREBAI M. (1999): Characterization of selenium species in biological extracts by enhanced ion-pair liquid chromatography with inductively coupled plasma-mass spectrometry and by referenced electrospray ionization-mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B*, **54** 1573-1591

KRIEGER R.E. (Szerk) (1986): In the Hydrolysis of Cations, Malabar, FL

LAFUENTE J. M. G. (1996): On-line focused microwave digestion-hydride generation of inorganic and organic selenium: Total determination and inorganic selenium speciation by atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B*, **51** 1849-1857,

LAFUENTE J.M (1996): Speciation of inorganic selenium and selenoaminoacids by on-line reversed phase high-performance liquid chromatography-focused microwave digestion-hydride generation-atomic detection, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **11** 1163-1169

LATKOCZY C. 1998): Strontium isotope ratio measurements in prehistoric human bone samples by means of high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICP-MS), *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **13** 561-566

LEACH (2001): Standardless semiquantitative analysis of metals using single-shot laser ablation ICP-TOFMS, *Analytical Chemistry*, **73**, 2959-2967

LEENAERS J. (2002): Gas chromatography-inductively coupled plasma-time-of-flight mass spectrometry as a tool for speciation analysis of organomercury compounds in environmental and biological samples, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **17** 1492-1497

LIDE D. R. (szerk) (1995): Handbook of Chemistry and Physics, CRC press, 76th edn.

LONDESBOROUGH S. (1999): Separation of organic and inorganic arsenic species by HPLC-ICP-MS, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **363** 577-581

LONGERICH H. P. (1987): Determination of lead isotope ratios by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), *Spectrochimica Acta Part B*, **42** 39-48

LUO S. K. (1994): Sample introduction in ICP spectrometry by hydraulic high-pressure nebulization, *Spectrochimica. Acta Part B* **49**, 485-492.

LUSTIG S. (1998): Platinum speciation with hyphenated techniques: high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis on-line coupled to an inductively coupled plasma mass spectrometer – application to aqueous extracts from platinum treated soil *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **360** 18-25

- MAHONEY P. P. (1999): Preliminary investigation of electrotherma vaporization sample indtroduction for inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **71**, 1378-1383
- MARCHANTE-GAYON J.M (2000): Comparison of different nebulisers and chromatographic techniques for the speciation of selenium in nutritional commercial supplements by hexapole collision and reaction cell ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **15** 1093-1102
- MARSHALL P. (2002): The determination of protein phosphorylation on electrophoresis gel blots by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry, *The Analyst*, **127** 459-461
- Martell A.E. (1992): *The determination and Use of Stability Constants*, New York, VCH
- McSHEEHY (2000): Identification of dimethylarsinoyl-riboside derivatives in seaweed by pneumatically assisted electrospray tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **410** 71-84
- McSHEEHY (2001): Analysis for selenium speciation in selenized yeast extracts by two-dimensional liquid chromatography with ICP-MS and electrospray MS-MS detection, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **16** 68-73
- McSHEEHY (2002a): Speciation of seleno compounds in yeast aqueous extracts by three-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray mass spectrometric detection, *The Analyst* **127** 223-229
- McSHEEHY (2002b): Identification of selenocompounds in yeast by electrospray quadrupole-time of flight mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **17** 504-517
- MESTER Z. (1996): High-performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectroscopic determination of arsenic species in water, *Journal of Chromatography A* **756** 292-299
- MESTER Z. (1997): Characteristic of the atomic fluorescence signals of the arsenic in speciation studies, *Spectrochimica Acta Part:B*, **52**, 1763-1771
- MESTER Z. (1999): *Analitikai módszer- és rendszerfejlesztés környezeti minták speciációs analizisére. Doktori (PhD) értekezés*, Budapest, Kertészet és Élelmiszer-ipari Egyetem
- MESTER Z. (2000): Speciation of dimethylarsinic acid and monomethylarsonic acid by solid phase microextraction-gas chromatography-ion trap mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* **873** 129-135
- MESTER Z. (2001): Detection of volatile arsenic chloride species during hydride generation: a new prospectus, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **16** 470-474

- MICHALKE B (1995): Capillary electrophoretic methods for a clear identification of selenoamino acids in complex matrices such as human milk, *Journal of Chromatography A*, 716 323-329
- MICHALKE B (1997): Selenium Speciation in Human Milk with Special Respect to Quality Control, *Biological Trace Element Research* 59 45
- MICHALKE B. (1998): Application of capillary zone electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry and capillary isoelectric focusing- inductively coupled plasma mass spectrometry for selenium speciation, *Journal of Chromatography A* 807 71-80
- MICHALKE B. (1999a): Capillary electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (CE/ICP-MS) and to electrospray ionization mass spectrometry (CE/ESI-MS): An approach for maximum species information in speciation of selenium, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 363 456-459
- MICHALKE B. (1999b): Potential and limitations of capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14 1297-1302
- MYERS (1993): Preliminary Design Considerations and Characteristics of an Inductively Coupled Plasma-Time-of-Flight Mass Spectrometer, *Microchemical Journal*, 48 259-277
- MYERS (1995): An inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometer for elemental analysis. Part III. Analytical performance, *Journal of American Society for Mass Spectrometry* 6 411-420
- NAGEOTTE S.M. (1998): Lead concentrations and isotope ratios in street dust determined by electrothermal atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry, *The Analyst*, 123 59-62
- NEILSEN J.L. (1998): Laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry in combination with gel electrophoresis: a new strategy for speciation of metal binding serum proteins, *Spectrochimica Acta Part B* 53 339-345
- ORTNER H. M. (1998): Chemical characterization of environmental and industrial particulate samples, *Analyst*, 123, 833-842
- PANTSAR M. (1996): Speciation of chromium by coupled column HPLC-ICP-MS –the effects of interfering ions, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 355 716-718
- PARSONS P. J. (1995): A low-cost tungsten filament atomizer for measuring lead in blood by atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B*, 50, 1475-1480
- PELÁEZ M. V. (2000): A comparison of different derivatisation approaches for the determination of selenomethionine by GC-ICP-MS *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 15 1217-1222

- POLEC K (2000): Identification of cadmium-bioinduced ligands in rat liver using parallel HPLC-ICP-MS and HPLC-electrospray MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 15 1363-1368
- POLEC K (2002): Investigation of metal complexes with metallothionein in rat tissues by hyphenated techniques, *Journal of Inorganic Biochemistry* 88 197-206
- POLEC K. (2001): Investigation of metal binding by recombinant and native metallothioneins by capillary zone electrophoresis (CZE) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) via a self-aspirating total consumption micronebulizer *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16 567-574
- POSTA J. (1996): On-line separation and preconcentration of chromium species in seawater, *Analytica Chimica Acta* 325 185-193
- POTIN-GAUTIER M (1996): *Journal of European Hydrology* 27 27
- PRANGE A (2001): Species analysis of metallothionein isoforms in human brain cytosols by use of capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma-sector field mass spectrometry, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 371 764-774
- PRANGE A. (1999): Determination of element species at trace levels using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma sector field mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14 1329-1332
- PROHASKA T. (1999): Precise sulfur isotope ratio measurements in trace concentration of sulfur by inductively coupled plasma double focusing sector field mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14 1501-1504
- PROHASKA T. (1999): Speciation of arsenic of liquid and gaseous emissions from soil in a microcosmos experiment by liquid and gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) detection, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 364 467-470
- PROHASKA T. (2002): Investigation of Sr isotope ratios in prehistoric human bones and teeth using laser ablation ICP-MS and ICP-MS after Rb/Sr separation, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 887-891
- RÁCZ L. (1998): M. Krekk, Proc. of 8th Solid Sampling Spectr. Coll., Budapest, 138-141.
- RAY S.J. (2001): Mass analyzers for inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16 1206-1216
- RIGGBOM A. (1963): *Complexation in Analytical Chemistry*, New York, Wiley
- ROSSELAND B.O (1992): The mixing zone between limed and acidic river waters: complex aluminium chemistry and extreme toxicity for salmonids, *Environmental Pollution*, 78 3-8

- SAVERWYNS (1999): Evaluation of a commercially available microbore anion exchange column for chromium speciation with detection by ICP-mass spectrometry and hyphenation with microconcentric nebulization, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 363 490-494
- SCHAUMLÖFFEL D. (1999): A new interface for combining capillary electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 364 452-456
- SEMENOVA O. P. (1995): Stability study of novel zinc complexes of pharmaceutical relevance by CE, *Journal of Capillary Electrophoresis* 2 203-207
- ŠLEJKOVEC Z. (2000): Speciation of arsenic in coarse and fine urban aerosols using sequential extraction combined with liquid chromatography and atomic fluorescence detection, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 366 830-834
- STEFÁNKA ZS. (1999): Analitikai módszerfejlesztés szerves és szervetlen szelén specieszek meghatározására., Diplomadolgozat, Kertészeti és Élelmiszer-ipari Egyetem
- STEFÁNKA ZS. (2001): Comparison of sample preparation methods based on proteolytic enzymatic processes for Se-speciation of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) samples, *Talanta*, 55 437-447
- STEWART I.I.(2000): Investigation of Cr(III) hydrolytic polymerisation products by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 872 227-246
- STUMMEYER J. (1996): Speciation of arsenic in water samples by high-performance liquid chromatography-hydride generation-atomic absorption spectrometry at trace levels using a post-column reaction system, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 354 344-351
- SÚÑER M.A. (2000): Speciation of cationic arsenic species in seafood by coupling liquid chromatography with hydride generation atomic fluorescence detection, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 15 1501-1507
- SYCHRA (Szerk) (1975): Atomic Fluorescence Spectroscopy, London: Van Nostrand Reinhold Co. 178 p.
- SZPUNAR J. (2002): Multidimensional approaches in biochemical speciation analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373 404-411
- TEMPLETON D.M.(2000): Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches, *Pure Applied Chemistry*, 72 (8) 1453-1470
- TERÄSAHDE P. (1996): Simultaneous determination of arsenic species by ion chromatography- inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 750 83-88

- THOMPSON K.C. (1975): *The Analyst*, 100 307
- TIAN (1999): Analytical performance of axial inductively coupled plasma time of flight mass spectrometry (ICP-TOFMS), *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14, 1807 -1814.
- TSUJII K. (1974): The determination of arsenic by non-dispersive atomic fluorescence spectrometry with a gas sampling technique, *Analytica Chimica Acta*, **72**, 85-90
- TUKAI R.(2002): Measurement of arsenic species in marine macroalgae by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 457 173-185
- VAN HOLDERBEKE M. (1998): Speciation of six arsenic compounds using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14 229-234
- VANHAECKE F (1999): Evaluation of the isotope ratio performance of an axial time-of-flight ICP mass spectrometer, *Analytical Chemistry*, 71 3297-3303
- VERBOST P.M. (1995): The toxic mixing zone of neutral and acidic river water acute aluminium toxicity in brown trout (*Salmo trutta* L.), *Water, Air, Soil Pollution* 85, 341-346
- VILLA-LOJO M.C. (2002): Coupled high performance liquid chromatography–microwave digestion–hydride generation–atomic absorption spectrometry for inorganic and organic arsenic speciation in fish tissue, *Talanta* 57 741-750
- WALKER E. B. (1996): Simultaneous analysis of selenate and selenite in bacterial suspensions by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 745 111-115
- WEI (2001): A comparison of urinary arsenic speciation via direct nebulization and on-line photo-oxidation-hydride generation with IC separation and ICP-MS detection, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16 12-19
- WESTERGAARD B (1998): Determination of anions in soil solutions by capillary zone electrophoresis, *Analyst*, 123, 721-724.
- WESTPHAL C. S. (2002): Axial inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry using direct liquid sample introduction, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 669-675
- WHITTAKER P. G. (1989) *Analyst*, 114,675,
- WICKENHEISER E. B. (1998): Development and application of liquid and gas-chromatography speciation techniques with element specific (ICP-MS) detection to the study of anaerobic arsenic metabolism, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 362 498-501

WOLLER Á. (1998): Mintaelőkészítés és kapcsolt speciációs analitikai rendszerek környezeti minták elemzésére, Doktori (PhD) értekezés, Budapest, Kertészeti és Élelmiszer-ipari Egyetem

ZHANG Y. (2001): Speciation of selenium in plant water extracts by ion exchange chromatography-hydride generation atomic absorption spectrometry, *The Science of The Total Environment* 269 39-47

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr Fodor Péter professzor úrnak doktori munkám sikeres elvégzésében nyújtott támogatásáért. Külön szeretném megköszönni Dernovics Mihálynak, Ipolyi Ildikónak, Abrankó Lászlónak és Mátyás Andrásnak a kutatómunkában nyújtott segítségét, valamint a Szent István Egyetem Alkalmazott Kémia Tanszéke valamennyi munkatársának, akik az elmúlt négy esztendőben munkámat támogatták. Szeretném megköszönni Dr Nicolas H. Bingsnek a vezetése alatt igen eredményesen eltöltött több, mint fél évet a Lipcsei Egyetem Analitikai Kémia Szakcsoportjánál.

Doktori munkám elvégzésében nyújtott anyagi támogatásért köszönettel tartozom:

- Magyar Állami Doktori Ösztöndíj
- Deutscher Akademischer Austauschdienst
- TÉT Alapítvány
- Osztrák-Magyar Akció Alapítvány
- Szent István Ösztöndíj

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak a sok türelmet és kitartást, amit az elmúlt négy év alatt tanúsítottak azért, hogy ezt a munkát sikeresen befejezhessem.