



CSATOLT TECHNIKÁK FEJLESZTÉSE ÉS
ALKALMAZÁSA ARZÉN MÓDOSULATOK
MEGHATÁROZÁSÁRA

SCHÄFFER RICHÁRD

doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Készült:
Budapesti Corvinus Egyetem
Alkalmazott Kémia Tanszék

Budapest, 2007

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszer-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Dr. Fodor Péter**
Egyetemi tanár
az MTA doktora
BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
Élelmiszertudományi Kar,
Alkalmazott Kémia Tanszék

Témavezető: **Dr. Fodor Péter**
Egyetemi tanár
az MTA doktora
BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
Élelmiszertudományi Kar,
Alkalmazott Kémia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus 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 Iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1 BEVEZETÉS

A kutatók már a XX. század elején felismerték, hogy egyes elemeknek a szervezetre gyakorolt hatása koránt sem egyértelmű, hiszen azok hatásmechanizmusa függ az adott elem oxidációs állapotától, kémiai formájától. Az analitikai kémia azon viszonylag új ágát, amely az elemek teljes koncentrációja helyett azok különböző szerves illetve szervetlen kötésben jelen levő úgynevezett módosulatainak minőségi és mennyiségi vizsgálatát tűzte ki célul, módosulatanalitikának, vagy más szóval speciációs analitikának nevezzük.

Az ember folyamatosan ki van téve a vízben és különböző élelmiszerekben található szerves és szervetlen arzénvegyületek által okozott hatásoknak. Az arzénkomponensek eltérő fizikokémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, biológiai hasznosulásuk különböző. Lebontási folyamatuknak feltérképezése az állatokban és az emberekben éppen ezért egy igen összetett feladat. A tengeri eredetű élelmiszerek jelentős arzéntartalmát már több mint 80 éve felismerték. A speciációs szemlélet kialakulása mégis egészen 1977-ig váratott magára, amikor is Edmonds és munkatársai egy addig ismeretlen, az emberi szervezetre ártalmatlan szerves arzénkomponenst (arzenobetaint-AB) izoláltak egy tengeri rák fajból. Ezzel az áttörő eredménnyel vette kezdetét az a kutatási hullám, amely elsődleges feladatának tekintette a természetben előforduló különböző arzéntartalmú vegyületek azonosítását és feltérképezését. Az arzenobetain felfedezése után számos olyan kutatási eredmény látott napvilágot, melyek egyhangúan bebizonyították, hogy a tengeri rákokon kívül a kagylók és halak arzéntartalmának jelentős hányadát az újonnan felfedezett vegyület alkotja. A több mint 20 éves kutatási eredmények ismeretében a tengeri eredetű élelmiszerekre vonatkozó arzén határértékeket eltörölték. Azonban a tengeri élőlényekkel ellentétben a tenger- és édesvíz túlnyomó részben szervetlen, az emberi szervezet számára erősen mérgező arzénkomponenseket (arzenitet, arzenátot) tartalmaz. Ez azt a kérdést veti fel, hogy a tengeri szervezetek szervetlen arzén akkumuláló és átalakító képessége hogyan vetíthető tovább bonyolultabb biológiai rendszerekre. Az ivóvíz szervetlen arzéntartalma világszerte komoly veszélyforrást jelent a lakosság egészségére. Humán epidemiológiai adatokra alapozva a szervetlen arzénkomponenseket karcinogenitás szempontjából az első csoportba sorolják. Magyarországon főleg a dél-alföldi régió ivóvízkészletének magas arzéntartalma jelent problémát, ahol az EU csatlakozással újonnan bevezetett 10 µg/L arzén határérték betartása komoly kihívást jelent a vízművek számára. A különféle szervezetek akkumuláló képessége miatt az arzénspeciáció tárgyát képező minták legnagyobb hányada vízi környezetből származik. A vizsgálatok jelentősége kettős. Egyrészt a bioindikátor szervezetek vizsgálata választ adhat a környezetet ért ökológiai hatásokról. Másrészt a táplálékként szolgáló

élőlények fogyasztásából eredő arzénkitettség is meghatározható az arzénkomponensek vizsgálatával.

Az arzén módosulatanalitikájának fejlődésével mára már több tucat, a természetben előforduló arzéntartalmú molekulát ismerünk, és feltehetően számuk még növekedni fog. Jelentős hányaduk toxikológiai tulajdonsága azonban még ismeretlen. A kimutatható arzénkomponensek egyre növekvő száma és azok eltérő toxicitása új, szelektívebb és érzékenyebb módszerek kidolgozását követeli meg az analitikus társadalomtól. A speciációs analitikai módszerek főként csatolt rendszerek, ahol valamilyen elválasztás-technikát csatolnak egy arzén detektálására is alkalmas készülékhez. A módosulatanalitika egyik sarkalatos pontja az elválasztás és a detektálás mellett a mintaelőkészítés. A meghatározandó specieszek gyakran instabil vegyületek (tárolási körülményekre és beavatkozásokra nagyon érzékenyek), ezért eredeti állapotban tartásuk nehéz feladat a mintaelőkészítés során. A módszer fejlesztésénél törekednünk kell arra, hogy a meghatározás érdekében tett lépések egyike se változtassa meg a meghatározandó speciesz eredeti formáját. Az arzénmódosulatok elválasztására a HPLC technikák terjedtek el leginkább. Ezek általában fordított fázisú ionpárképzős, illetve ioncserés kromatográfias módszerek. Mára már döntően az ioncserés kromatográfia javára billent át a mérleg nyelve. Az elválasztástechnikai módszerek egyre szelektívebbek és hatékonyabbak, így egyre több arzénkomponens egymás melletti egyidejű meghatározása válik lehetővé. Az induktív csatolású plazma (ICP) technikák és a tömegspektrometriás analizátorok megjelenésével az arzénspeciációs módszerek kidolgozása is új fordulatot vett. Az alacsony kimutatási határnak, multielemes detektálási képességének és a nagy dinamikus tartományának köszönhetően az arzénmódosulatok vizsgálata terén a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia induktív csatolású plazmatömegspektrométer (HPLC-ICPMS) csatolás mára a legelterjedtebb módosulatanalitikai módszerré nőtte ki magát. A módosulatanalitikában alkalmazott módszerek fejlődését indukálta a speciációs célokra készített hiteles anyagminták (CRM) megjelenése. A teljes arzéntartalom felül a különböző arzénkomponensekre is hitelesített anyagminták alkalmassá váltak a különféle arzénmódosulatok vizsgálatára kifejlesztett módszerek validálására. Az arzén módosulatanalitikájának fejlődése töretlen, melynek köszönhetően egyre jobban megismerhetjük az arzén környezeti körforgásban betöltött helyét, lebontási folyamatait, valamint a különböző módosulatok egészségre gyakorolt hatását.

2 CÉLKITŰZÉSEK

Az arzén módosulatanalitikáját az utóbbi három évtizedben folyamatos fejlődés jellemezte, mely tendencia a jövőben csak növekedni fog. A módszerek kimutatási határa javul, megteremtve ezzel a lehetőséget a környezetben előforduló arzénmódosulatok bioszintézisének és lebontási folyamatainak megismerésére, valamint az újabb arzénmódosulatok azonosítására. Az újabb arzénkomponensek szelektív meghatározásához új elválasztástechnikai és detektálási módszerekre van szükség. Doktori munkám célkitűzései ezek alapján a következők:

- Kromatográfiai módszerek fejlesztése a környezetben előforduló arzénmódosulatok szelektív meghatározására, különös tekintettel az oxo- és tio-arzenocukor vegyületekre.
- Az elemszelektív detektálás mellett egyre nagyobb hangsúlyt kap az arzénkomponensek molekulászelektív meghatározása. Doktori munkám során célul tűztem ki egy olyan HPLC-ES-MS/MS kapcsolt technikán alapuló speciációs módszer fejlesztését és bevezetését az arzénmódosulat-analitikába, mely mennyiségi elemzés mellett szerkezeti információt is szolgáltat az arzénmódosulatokról.
- A kidolgozott módszerek alkalmazása környezeti minták vizsgálatára:
 - Tengeri kagylók, halak
 - Édesvízi tápláléklánc egyedei (algák, növények, szivacsok, kagylók, hüllők, halak)
- Arzénspeciációs vizsgálatok alapján az Égei-tenger térségéből származó, nagy arzéntartalmú tenger gyümölcsei-nek fogyasztásából eredő arzénkitettség kockázatának meghatározása.
- Édesvízi tápláléklánc egyedeinek arzénakkumuláló képességének meghatározása és a bennük található arzénmódosulatok eloszlásának feltérképezése. A specieszmintázat összehasonlítása a tengeri szervezetekével.
- Egy hiteles anyagminta (BCR-710) arzénkomponenseinek jellemzése. A CRM alkalmas lehet környezeti mintákban található és speciációs standardként nem validált arzénmódosulatok azonosítására.
- Rávilágítani a módosulatanalitikai mérések minőségbiztosításának fontosságára, annak hiányából eredően elkövethető hibákra. Alkalmazható megoldásokra tett javaslatok.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálataim során analitikai tisztaságú vegyszerekkel dolgoztam. Ioncserélt vízként minden esetben $R < 10 \text{ M}\Omega$ ellenállásig tisztított vizet használtam. A különböző pufferek készítéséhez $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ és NH_4HCO_3 sókat, hangyasavat, piridint, ammóniát, valamint a tio-arsenocukrok szintéziséhez Fe^{II} -szulfidot használtam. A hidridképzéses mintabeviteli technika során reagensként NaOH -ot, NaBH_4 -ot és $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ -ot alkalmaztam. A minták roncsolását HNO_3 -val és H_2O_2 -dal végeztem. Törzsoldatként a következő vegyületek álltak a rendelkezésemre: arsenát (As^{V}), arsenit (As^{III}), dimetil-arsinát (DMA^{V}), metil-arsinát (MA^{V}). Az oxo-arsenocukor standardokat, az arsenokolint (AC), arsenobetaint (AB), trimetil-arsónium-propionátot (TMAP), trimetil-arsin-oxidot (TMAO) és a tetrametil-arsónium-kationt (TETRA) az Alkalmazott Kémia Tanszék Kevin A. Francesconi professzortól (Ausztria) ajándékba kapta. A tio-arsenocukrokat az oxo-arsenocukor analógokból szintetizáltam. A mérések minőségbiztosításához DOLT-2, DORM-2 és BCR-710 hitelesített referencia anyagokat használtam.

Mintaelőkészítéshez alacsony nyomásállóságú (kb.: 2 bar) teflonbombákat és viszonylag nagy nyomásállóságú (40 bar) mikrohullámú roncsoló berendezést, valamint ultrahang szondát alkalmaztam. A méréseket az alábbi csatolt rendszereken végeztem el: HPLC-(UV)-HG-AFS, HPLC-ICPMS és HPLC-ESMS/MS. Az arzénkomponensek elválasztását erős anion- illetve kationcserélő gyantákon végeztem.

4 EREDMÉNYEK

4.1 Elválasztástechnikai és detektálási módszerek fejlesztése

Doktori munkám során elválasztástechnikai módszereket fejlesztettem tovább, illetve új módszereket dolgoztam ki az arzénmódosulatok szelektív elválasztására. A módszerek továbbfejlesztését az eddig nem vizsgált arzénmódosulatok rutinszerű vizsgálata követelte meg, míg az új módszerek kidolgozását az arzénspeciációba bevezetett korszerűbb detektorok tették szükségessé. Az arzénmódosulatok ionos karakteréből adódóan a komponensek elválasztásának alapját erős anioncserélő és erős kationcserélő oszlopok alkalmazása jelentette. Eltérő kémiai tulajdonságaik azonban nem teszik lehetővé, hogy egy kromatográfiás módszerrel minden egyes komponenst meghatározzunk. Anioncserét alkalmaztam az As^{III} , DMA^{V} , MA^{V} és As^{V} valamint az arsenocukrok vizsgálatához, míg az AB, TMAP, TMAO, AC és TETRA elválasztását kationcserélő oszlopokon oldottam meg.

A hidridképzéses (HPLC-(UV)-HG-AFS) mintabevitelen alapuló módszerfejlesztés során kibővítettem a meghatározható arzénkomponensek körét az oxo-arzenocukor módosulatokra és a kationos komponensekre. Ezek a komponensek előzetes oxidációs lépés nélkül nem képesek arzén-hidrid kialakítására, ezért a hidridképzést megelőzően egy fotooxidációs lépést iktattam a rendszerbe. Megvizsgáltam a komponensek hidridképzési hatásfokát a hozzáadott $K_2S_2O_8$ függvényében, ahol az oxidáló reagens optimális koncentrációjának a 6 m/v%-ot kaptam. Továbbá megvizsgáltam a kationcserés elválasztás esetén az eluensként alkalmazott piridin koncentrációjának hatását a jelképzésre. A vizsgálat során azt tapasztaltam, hogy az 1 mM-os piridin-formiáthoz képest a 20 mM piridin-formiát jelentős jelcsökkenést idézett elő, ezért az elválasztás során törekedtem a lehető legalacsonyabb piridin-formiát alkalmazására.

A HPLC-ICPMS legfőbb előnye - például a HG-AFS technikával szemben -, hogy a vizsgálandó oldatban található arzénkomponensek közvetlenül, előzetes derivatizációs lépés közbeiktatása nélkül meghatározhatóak. A kationos arzénkomponensek elválasztásához egy új, az Agilent cég által kifejlesztett erős kationcserélő kolonnát használtam (Zorbax 300-SCX). Az oszlop sajátossága, hogy a szulfonsavat egy aromás gyűrű segítségével kapcsolták a gélhez, csökkentve ezzel a vizsgálandó minta és az állófázis között kialakuló hidrogén hidas kölcsönhatások befolyását a komponensek elúciójára. Összehasonlítva a HPLC-HG-AFS rendszernél használt Adsorbosphere oszloppal ($R_t=20$ perc), ebben az esetben a komponensek elválasztása kevesebb, mint öt perc alatt történt. Az ICPMS előnyeit kihasználva a HPLC-(UV)-HG-AFS csatolt rendszernél alkalmazott anioncserés elválasztást is továbbfejlesztettem, melynek köszönhetően a retenciós idők csökkentek, a csúcsok élesebbé váltak, javítva ezzel a felbontást és a kimutatási határokat. Az oxo-arzenocukrok vizsgálatára alkalmazott anioncserés elválasztás mellett egy második anioncserés kromatográfias módszert dolgoztam ki az úgynevezett tio-arzenocukrok meghatározására.

A standard oldatok hiánya és az elemspecifikus detektorok hiányosságai miatt az arzén módosulatanalitikája egyre inkább megköveteli az olyan detektálási módszerek alkalmazását, melyek lehetővé teszik a komponensek szerkezeti vizsgálatát és mennyiségi meghatározását egyaránt. Erre alkalmasak az úgynevezett lágy ionizációs technikák, ahol a molekulákat bomlás nélkül ionizáljuk, majd a tömegspektrométerbe juttatjuk. Eltérően az eddig ismertetett kapcsolt technikáktól a HPLC-ESMS/MS kapcsolás esetében mind az elválasztás mind a detektálás terén kevés információ áll rendelkezésre, rutinszerű alkalmazása egyelőre még nem megoldott. Ezért elvégeztem mind a detektálási, elválasztástechnikai, valamint a mintatisztítási paraméterek optimalizálását és a módszer validálását. A legjobb jel/zaj arány eléréséhez az ionforrás paramétereit és komponensfüggő paramétereit egyaránt optimaltam. A vizsgálat során a kívánt vegyület molekulaionját hasítva, annak két jellemző és intenzív fragmensionját

detektáltam. A detektálási paraméterek optimalizálását követően az arzénmódosulatok elválasztásának kidolgozását végeztem el. Az ES ionizáció sóérzékenysége miatt az AFS és ICP-MS detektálás esetén alkalmazott mozgófázisokat illékony pufferekkel kellett helyettesítenem. Ezen okokból új kromatográfias módszereket fejlesztettem ki a 15 arzénvegyület elválasztására. Ismert, hogy a szerves, illékony oldószerek előnyösen befolyásolják az érzékenységet ESMS detektálás esetén. Azonban ezek sok esetben - főleg, ha apoláris szerkezet is jellemző a molekulára - a retenciót is befolyásolhatják. Ezért a mozgó fázis szerves oldószertartalmának az elválasztásra és az érzékenységre gyakorolt hatását egyaránt megvizsgáltam. A HPLC-ESMS/MS módszer fejlesztése során egy olyan elválasztástechnikai megoldás dolgoztam ki, mellyel lehetőség nyílt az oxo- és tio-arzenocukrok egyidejű meghatározására. A szelektív anyaiion → fragmension átmenetek monitorozásával nem szükséges feltétel a komponensek teljes kromatográfias elválasztása. Azonban kísérletekkel bizonyítottam, hogy vannak olyan speciális esetek, amikor bizonyos komponensek nem megfelelő elválasztása azonosítási hibákhoz vezethet. A kidolgozott HPLC-ESMS/MS módszer alkalmas a különböző arzénmódosulatok minőségi és mennyiségi meghatározására.

4.2 Tengeri eredetű élelmiszerek arzénspeciációs elemzése

Számos tanulmány foglalkozott a tengeri élőlényekben található arzénkomponensek minőségi és mennyiségi meghatározásával. Azonban a metabolizációs folyamatok lejátszódása és a tengeri élőlények által akkumulált arzénmódosulatok minősége függ a vizsgált fajtól, illetve a táplálékláncban betöltött szerepétől. Ezen felül meghatározó tényezők az adott terület ökológiai jellemzői, melyek szoros összefüggésben vannak a tenger fizikai és kémiai paramétereivel. Doktori munkám egyik részeként az Égei-tenger térségében található, emberi fogyasztásra szánt kagyló- és halminták arzénspeciációs elemzését végeztem el. A vizsgálat fő célja a tengeri élőlények fogyasztásából eredő, a görög lakosság egészségét veszélyeztető kockázat felmérése a vizsgált egyedekben található arzénmódosulatok meghatározásán keresztül. Ennek fényében megvizsgáltam, hogy az élőlények teljes arzéntartalma és arzénmódosulatainak eloszlása a mintavétel helyétől függően miként változik, illetve, hogy van-e összefüggés a minták zsírtartalma és a kinyerhető arzénkomponensek mennyisége között. Az eredmények alapján mind a kagylók mind a halak esetében nagyobb arzénkoncentráció jellemezte a nagyvárosok és iparilag fejlett területekről származó mintákat. A kinyerhető arzén mennyisége mintatípustól függően 53% és 98% között ingadozott. Nem paraméteres statisztikai próba (Spearman $R = -0.55$, $p = 0.02$) elvégzését követően elmondható, hogy a nagyobb zsírtartalmú mintákban az arzén szignifikáns része zsírolható frakcióban van jelen. A módosulatanalitikai során kimutattam,

hogy mind a kagylók, mind a halak fő arzénkomponense az emberi szervezetre nem mérgező AB. Mindössze két kagylómintában mutattam ki szerves arzén (0.6%-1%). Továbbá a teljes arzéntartalom növekedésével az AB és az arzenocukrok mennyisége is növekszik. Ezzel ellentétben az extraktum arzén és a DMA^V koncentrációja nincs összefüggésben a teljes arzéntartalommal, vagyis a magasabb arzéntartalmú kagylók és halak fogyasztása nem feltétlenül jár együtt a mérgezés kockázatának növekedésével. Amennyiben a görög lakosság naponta 18 g tengeri eredetű táplálékot fogyaszt (SCOOP, 2004), 70 kg átlag testsúlyt figyelembe véve a becsült átlagos napi teljes arzénbevitel 1.1 µg/nap/ttkg, ami az elviselhető napi arzénbevitel (Tolerable Daily Intake = 2 µg/nap/ttkg) alatt van. **A speciációs eredményeket is figyelembe véve - mely szerint az arzén legnagyobb része az emberi szervezet számára nem mérgező AB formájában van jelen a mintákban - a vizsgált tengeri eredetű élelmiszerek fogyasztása nem jár egészségkárosító hatással.**

4.3 Édesvízi tápláléklánc egyedeinek arzénspeciációs vizsgálata

Annak ellenére, hogy számos országban, köztük Magyarországon is a fogyasztott halak nagy része édesvízből származik, kevés adat áll rendelkezésünkre az édesvízi szervezetekben található arzénmódosulatokat illetően. A kis számú publikáció egyik fő oka, hogy az édesvízi élőlények kisebb arzéntartalma és annak alacsony kinyerési hatásfoka miatt a rendelkezésre álló vizsgálati módszerek nem voltak alkalmasak ezen szervezetek arzénmódosulatainak meghatározására. Néhány kivételtől eltekintve a tengeri szervezetek esetében bevált extrakciós módszerek hatásfoka édesvízi élőlények esetén, eddig még tisztázatlan okokból sokszor nem éri el a 40-50%-ot. Feltételezhető, hogy ezekben az esetekben az arzén olyan ismeretlen módosulatok formájában van jelen a mintában, mely erősen kötődik a mátrixhoz, ezért a hagyományos módszerekkel nem kivonható. Ez felveti azt a kérdést, hogy vajon az édesvízi környezetben a tengeritől teljesen eltérő arzénakkumulációs és lebontási folyamatok játszódnak-e le? Amennyiben a válasz igen, át kell gondolnunk, hogy valóban helyes-e a tengeri élőlények vizsgálati eredményei alapján az édesvízi halakra is eltörölni az arzénre vonatkozó határértékeket. A fentiek miatt a doktori munkám részeként édesvízi tápláléklánc különböző egyedeinek módosulatanalitikai vizsgálatát végeztem el.

Az édesvízi szervezetek arzénspeciációs vizsgálata során az üledék és vízminták mellett igyekeztem a teljes táplálékláncot átfogó fajokból mintát gyűjteni: algák, szivacsok, növények, kagylók, békák, mindenevő és ragadozó halak. A vízminták mérése alapján kijelenthető, hogy a

Duna vizsgált szakasza arzénszennyezettség szempontjából nem sorolható a veszélyeztetett területek közé. A víz alacsony arzénkoncentrációja ellenére a vizsgált területekről származó élőlények egy részében azonban jelentős mennyiségű arzént mutattam ki. A legnagyobb mértékű akkumuláció a kagylók esetében volt megfigyelhető. Ezzel szemben a legkevesebb arzént az édesvízi halak esetében detektáltam.

Annak ellenére, hogy az édesvízi környezet élőlényeiben előforduló arzénmódosulatokról szóló tanulmányok száma elmarad a tengeri élőlényekről szóló tanulmányok számához képest, számos érdekes egyezést és különbséget tapasztaltam a két élőhely lakóiban felhalmozódó arzénmódosulatok eloszlása között. Az algák esetében mind a tengeri mind az édesvízi fajokra az arzenocukor dominancia jellemző, míg a növények fő arzénkomponensei a szervesetlen módosulatok. A dunai kagylóknál és halaknál egyaránt szokatlan, a tengeriektől eltérő módosulateloszlást tapasztaltam. Egy halfaj kivételével minden mintában a fő arzénmódosulat az oxo-arzenocukor-foszfát volt, míg AB-t csak nyomokban detektáltam. Az általam vizsgált halak esetében mégis a különlegesség az, hogy az oxo-arzenocukor-foszfát mellett először detektáltam tio-arzenocukor-foszfátot édesvízi halakban. Az eredmények toxikológiai szempontból is jelentősek, hiszen a halak és kagylók esetében az arzénre vonatkozó határértékek eltörlését a tengeri eredetű halak vizsgálata során kapott eredményekre alapozták. Az általam vizsgált halak és kagylók kinyerhető arzénmódosulatainak legnagyobb hányada arzenocukor, melyeknek szervezetre gyakorolt hatása egyenlőre még nem ismert.

4.4 HPLC-ESMS/MS kapcsolt technika alkalmazási lehetőségei környezeti minták arzénmódosulatainak meghatározására

Az újonnan kidolgozott HPLC-ESMS/MS módszer alkalmazhatóságát vizsgáltam néhány korábban, HPLC-ICPMS-sel vizsgált tengeri és édesvízi minta arzéntartalmának meghatározásán keresztül. A minták elemzése során kitértem a minőségi és mennyiségi vizsgálatokra, az azokat terhelő hibákra, valamint a hibák kiküszöbölésének módjára. A módosulatok meghatározására anion- és kationcserés kromatográfiát alkalmaztam, mely során minden arzénkomponens esetében a két legjellemzőbb és legintenzívebb átmenetet monitoroztam. A minőségi vizsgálat során olyan komponenseket is sikerült azonosítanom a mintákból, melyek HPLC-ICPMS detektálás során nem voltak kimutathatók. Ennek magyarázata a komponensek koelúciójában illetve az általam alkalmazott HPLC-ESMS/MS nagyobb szelektivitásában és jobb kimutatási határában keresendő. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az ionizációs hatásfokot a mintamátrix nagymértékben visszaszoríthatja, megnehezítve ezzel a pontos mennyiségi elemzést. Az erős mátrixhatás kiküszöbölésére az általános gyakorlat többféle módszert használ.

Egyrészt törekedni kell a komponensek megfelelő visszatartására, mely által a mátrixionok elkülöníthetők a vizsgálandó molekuláktól. Az eredmények alapján megállapítottam, hogy standard addíciós kalibráció alkalmazásával a mátrix okozta jelcsökkenés kiküszöbölhető. Azonban nagyszámú minta rutin elemzése esetén ez a bonyolult és időigényes kalibráció a vizsgálati módszer hátrányává válhat. Ezért a mátrix ionizációra gyakorolt hatásának csökkentése céljából különböző on-line és off-line mintatisztítási módszereket vizsgáltam meg. A tisztított mintarészlet kromatogramját a tisztítatlan extraktum kromatogramjával összehasonlítva azt tapasztaltam, hogy a mintamátrix - főként a kis retenciós idővel rendelkező komponenseknél - a mennyiségi meghatározást nagymértékben zavarhatja. A tisztítási lépések szignifikánsan nem csökkentették a zavaró hatásokat, ezáltal azok alkalmazása nem ajánlott. Vizsgálataim alapján elmondhatom, hogy a tisztítási módszerek helyett a módosulatok elégséges visszatartása (6-8 perc) célravezetőbb. Amennyiben a komponens kémiai szerkezete ezt nem teszi lehetővé, standard addíciós kalibráció, vagy izotópjelzett módosulat (mint belső standard) használata javasolt.

4.5 Hiteles anyagminta arzénmódosulatainak teljes jellemzése

Elvégeztem egy AB-re hitelesített CRM (BCR-710) jellemzését. Összehasonlítottam a különböző metanoltartalmú oldószerekkel végzett extrakciók hatásfokát, továbbá meghatároztam a mintában található arzénkomponensek minőségét és mennyiségét. A mintában 12 azonosított és 2 azonosítatlan komponenst detektáltam, továbbá kimutattam, hogy az oxo- és tio-arzenocukrok aránya a mintában az extrahálószer metanoltartalmának függvénye. A módosulatanalitikai eredményeket felhasználva, standard oldatok hiányában a CRM alkalmas lehet az oxo- és tio-arzenocukrok vizsgálatára környezeti mintákban.

4.6 Minőségbiztosítás a módosulat-analitikában

A munkám során nagy figyelmet fordítottam a méréseim minőségbiztosítására. Ehhez minden esetben a mintákkal együtt teljes arzéntartalomra és AB-re hitelesített CRM-et használtam, továbbá minden esetben elkészítettem a teljes anyagmérleget. A HPLC-ESMS/MS vizsgálatok esetén két átmenet egyidejű monitorozásával és azok arányának figyelembevételével győződtem meg a minőségi vizsgálatok helyességéről. Az édesvízi minták esetében az alacsony kinyerési hatásfok mellett a kinyert arzénnek csak egy részét tudtam kromatográfiásan meghatározni. Ez bizonyítja, hogy az extrakciós hatásfok és az oszlopvisszanyerési hatásfok nem azonos, ugyanis a kromatográfiásan meghatározott komponensek összegének aránya a teljes arzéntartalomhoz

képest nem feltétlenül egyenlő a kinyerés hatásfokával. A két különböző érték meghatározása során körültekintően kell eljárni.

5 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Nagy hatékonyságú folyadék-kromatográfián alapuló anion- és kationcserés elválasztástechnikai módszereket dolgoztam ki az arzénkomponensek szelektív meghatározására HG-AFS, ICPMS és ESMS/MS detektálási módszerek alkalmazása mellett.
2. Elsőként végeztem arzénspeciációs vizsgálatot Égei-tengerből származó, emberi fogyasztásra alkalmas kagyló- és halmintákon.
 - Kimutattam, hogy a vizsgált szervezetek 5.3-34 mg/kg mennyiségű arzént tartalmaznak.
 - Megállapítottam, hogy a halak esetében a felhalmozott arzénmódosulatok több, mint 90%-a az emberi szervezet számára nem mérgező AB formájában van jelen, míg a kagylók esetében az AB mellett 18-41%-ban arzenocukrokat sikerült kimutatnom.
 - Figyelembe véve a görög lakosság táplálkozási szokásait megállapítottam, hogy a nagy arzénkoncentráció ellenére a térségből származó kagylók és halak fogyasztása nem jelent egészségügyi kockázatot.
3. Meghatároztam az édesvízi tápláléklánc egyes egyedeinek teljes arzéntartalmát, illetve megvizsgáltam a felvett arzénmódosulatok eloszlását.
 - Megállapítottam, hogy a Duna vizének alacsony (1.1 ng/ml) arzénkoncentrációja ellenére az édesvízi algák, növények, kagylók és békák hasonlóan a tengeri fajokhoz nagymértékben képesek az arzént akkumulálni, míg az édesvízi halak teljesarzen-koncentrációja 1-2 nagyságrenddel elmarad a többi vizsgált mintákéhoz képest.
 - Kimutattam, hogy az édesvízi algák hasonlóan a tengeri fajokhoz több mint 90%-ban arzenocukrokat tartalmaznak.
 - A növényekben szinte kizárólag szervesetlen arzenitet (As^{III}) és arzenátot (As^{V}) találtam.
 - Megállapítottam, hogy a vizsgált édesvízi béka fajban található fő arzénkomponensek a szervesetlen arzenit (30%) és a négyszeresen metilált tetrametil-arzónium-kation (35%). Emellett mindhárom köztes metilált arzénforma (mono-, di-, és trimetil arzénkomponensek) kimutatható, amely arra enged következtetni, hogy a béka önmaga

képes a mérgező, szerves arzénmódosulatokat nem mérgező, négyszeresen metilált komponensekké alakítani.

- Megállapítottam, hogy ellentétben a tengeri kagylókkal az édesvízi kagylók domináns arzénmódosulatai az arzenocukrok, illetve az eddig csak tengeri szervezetekben kimutatott tio-arzenocukrok. Arzenobetaint csak nyomokban sikerült kimutatni a vizsgált mintákban.
 - Megállapítottam, hogy az édesvízi halak AB-t csak nyomokban tartalmaznak, ezzel szemben a fő komponens az oxo-arzenocukor-foszfát. Kimutattam, hogy a vizsgált halfajok tartalmazhatnak olyan tio-arzenocukrokat, melyeket eddig halakban nem mutattak ki.
4. Új, ESMS/MS detektáláson alapuló csatolt analitikai módszert dolgoztam ki a szerves arzénmódosulatok meghatározására.
- A szerves arzénmódosulatok fragmentációja során felvett termékion tömegspektrum alapján meghatároztam a komponensek detektálásához szükséges optimális komponensfüggő paramétereket.
 - Megvalósítottam az oxo- és tio-arzenocukrok egyetlen kromatográfiás módszerrel történő vizsgálatát.
 - Megállapítottam, hogy néhány arzénkomponens esetében akár két nagyságrenddel jobb kimutatási határ érhető el, mint az általam alkalmazott elemspecifikus detektálások során.
 - Bebizonyítottam, hogy néhány arzénkomponens esetében szükség van azok előzetes kromatográfiás elválasztására az esetleges azonosítási hibák elkerülése érdekében.
 - Hiteles anyagminták mérésével igazoltam, hogy az általam kifejlesztett új kapcsolt technika alkalmas az arzénmódosulatok minőségi vizsgálatára standard oldatok használata nélkül.
 - Bebizonyítottam, hogy a különböző, kromatográfián alapuló mintatisztítási eljárások nem csökkentik a mintamátrix ionizációra gyakorolt hatását.
5. Elvégeztem egy teljesarzen-tartalomra és AB-re hitelesített referencia minta (BCR-710) jellemzését a benne található arzénkomponensek eloszlása szempontjából.
- Az arzenobetain mellett 11 ismert □ köztük 2 oxo- és 2 tio-arzenocukrot □ és 2 ismeretlen arzénkomponenst sikerült kimutatnom a mintából.
 - Különböző oldószereket összehasonlítva megállapítottam, hogy míg az oxo-arzenocukrok vizes extrakcióval nyerhetők ki nagyobb hatásfokkal, addig a tio-arzenocukrok kinyerése szerves oldószer alkalmazása esetén hatékonyabb.
 - A teljes anyagmérleg elkészítésével bebizonyítottam, hogy a kinyerhető arzén teljes mennyiségét sikerült meghatároznom.

6 PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉG

Impakt faktoros folyóiratcikkek

Richard Schaeffer, Csilla Soeroes, Ildiko Ipolyi, Peter Fodor and Nikolaos S. Thomaidis; Determination of arsenic species in seafood samples from the Aegean Sea by liquid chromatography □(photo-oxidation)-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 547 (2005) 109-118 (impakt faktor: 2.760)

Csilla Soeroes, Walter Goessler, Kevin A. Francesconi, Norbert Kienzl, **Richard Schaeffer**, Peter Fodor and Doris Kuehnelt; Arsenic speciation in farmed Hungarian freshwater fish, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 9238-9243 (impakt faktor: 2.510)

Richard Schaeffer, Kevin A. Francesconi, Norbert Kienzl, Csilla Soeroes, Péter Fodor, László Váradi, Reingard Raml, Walter Goessler and Doris Kuehnelt, Arsenic speciation in freshwater organisms from the river Danube in Hungary, *Talanta* 69 (2005) 856-865 (impakt faktor: 2.390)

Richard Schaeffer, Peter Fodor and Csilla Soeroes; Development of a liquid chromatography/electrospray selected reaction monitoring method for the determination of organoarsenic species in marine and freshwater samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 2979□2989(impakt faktor: 3.090)

Nem impaktfaktoros cikkek, jelentések

Nathalie Guigues, Helen Lückge, **Richard Schäffer**, Jesper Knutsson, Charlotte Valat, Ian Allan, Mark Elkens, Results of the testing of emerging tools □ All Case Study, Screening methods for Water data InFormaTion in support of the implementation of the Water Framework Directive (SWIFT-WFD, 2006)

Ruta Rimša, Nathalie Guigues, Kristine Pakalnite, **Richard Schäffer**, Jesper Knutsson, Results of the testing of emerging tools □ Latvian case study, Screening methods for Water data InFormaTion in support of the implementation of the Water Framework Directive (SWIFT-WFD, 2006)

Publikáció konferencia kiadványban

Magyar nyelvű teljes

Sörös Csilla, Rácz László, **Schäffer Richárd**, Németh Lajos, Dernovics Mihály, Fodor Péter, Extrakciós technikák összehasonlítása gombaminták arzénmódosulatainak meghatározásában 46. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés (Szeged) 2003. (előadás)

Schäffer Richárd, Sörös Csilla, Fodor Péter, Dunai kagylók arzénspeciációs vizsgálata, 47. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés (Balatonföldvár) 2004. (előadás)

Schäffer Richárd, Sörös Csilla, Fodor Péter, Édesvízi élőlények arzénspeciációs vizsgálata, 48. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés (Hajduszoboszló) 2005. (előadás)

Sörös Csilla, **Schäffer Richárd**, Fodor Péter HPLC-ESI-MRM módszer fejlesztése és alkalmazása arzénspeciációs elemzéshez 49. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés (Miskolc) 2006. (előadás)

Magyar nyelvű összefoglaló

Schäffer Richárd, Németh Lajos, Speciációs rendszer fejlesztése arzénmódosulatok meghatározására talajban, XXVI. OTDK, **III. helyezés** (Budapest) 2003. (előadás)

Nemzetközi összefoglaló

Csilla Soeroes, **Richard Schaeffer**, Ildikó Ipolyi, Péter Fodor, Norbert Kienzl, Ernst Schmeisser, Walter Goessler, Arsenic speciation in freshwater mussels, 3rd International Conference on Trace Element Speciation in Biomedical, Nutritional and Environmental Science (München,) 2004. (poszter) (**poszter díjas**)

Richard Schaeffer, Csilla Soeroes, Péter Fodor, Comparative measurement of arsenic in marine and freshwater mussels 12th Biennial National Atomic Spectroscopy Symposium, (Plymouth, UK) 2004. (poszter)

Csilla Sörös, **Richard Schaeffer**, László Abrankó, Zsuzsa Jókai, Márta Üveges, Mihály Dernovics, Péter Fodor, The role of As, Hg, Se and Sn speciation in food analysis, 2nd Central European Congress on Food (Budapest) 2004. (poszter)

Richard Schaeffer, Csilla Soeroes, Ildikó Ipolyi, Péter Fodor and Nikolaos S. Thomaidis, Determination of arsenic species in seafood from Greece by HPLC-(UV)-HG-AFS, 4th Aegean Analytical Chemistry Days (Kusadasi-TURKEY) 2004. (poszter) (**poszter díjas**)

Richard Schaeffer, Csilla Soeroes, Péter Fodor, László Váradi, Kevin A. Francesconi, Walter Goessler, Rengard Raml, Norbert Kienzl and Doris Kuehnelt, Arsenic species in freshwater organisms from the river Danube, European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry (Budapest) 2005. (poszter)

Richard Schaeffer, Csilla Soeroes, K.A. Francesconi, W. Goessler, D. Kuehnelt and Péter Fodor, Arsenic speciation in Hungarian freshwater environment, XII. Hungarian-Italian Symposium on Spectrochemistry (Pécs) 2005. (előadás)

Nathalie Guigues, Jean Claude Foucher, **Richard Schaeffer**, Mikael Motelica, Juris Bruveris, Ruta Rimša, Pavleta Petrova, Peter Fodor, Anne Marie Fouillac, Testing Emerging tools for biogens □ the latvian Case study (Berlin) Screening methods for Water data InFormation in support of the implementation of the Water Framework Directive - Annual meeting 2005. (poszter)

Nathalie Guigues, Mikael Motelica, Pavleta Petrova, **Richard Schaeffer**, J. Knutsson, Peter Fodor, Anne Marie Fouillac Heavy metals monitoring in the Daugava (LV) and the Aller (D) river basins using DGT and chemcatcher techniques, 2nd International Passive Sampling Workshop and Symposium (Bratislava) 2006 (poszter)

Richard Schaeffer, Peter Fodor, Csilla Soeroes, Development of HPLC-ESI-SRM method for arsenic speciation in samples from freshwater origin, 6th International Symposium on Speciation of Elements in Biological, Environmental and Toxicological Science (Bialowieza-Poland) 2006. (poszter)

Béla Kmeľár, **Richard Schaeffer**, Péter Fodor, Qualitative and quantitative determination of four pesticides in flowers by HPLC-ESI-MS/MS, European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry (Taormina) 2007. (poszter)

Magyar nyelvű jegyzet, könyvrészlet

Élelmiszer-analitikai mérések minőségbiztosítása. Élelmiszer-biztonság és □minőség felsőfokon. Szerk. Kápolna E. Hegedűs A. Mezőgazda Kiadó, 2006. ISBN 963 286 305 4