

Doktori értekezés Ph D fokozat elnyerésére

**MÉRÉSI ELJÁRÁS KIDOLGOZÁSA ÉS ALKALMAZÁSA KÖRNYEZETI MINTÁK
ARZÉNSPECIÁCIÓS ELEMZÉSÉRE**

Jelölt: Sörös Csilla

Témavezető: Dr. Fodor Péter

Készült:
Budapesti Corvinus Egyetem
Alkalmazott Kémia Tanszék

Budapest, 2006

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszer-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Dr. Fekete András**
Egyetemi tanár
Tudomány(ok) doktora, az MTA doktora
BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
Élelmiszertudományi Kar,
Fizika- Automatika Tanszék

Témavezető: **Dr. Fodor Péter**
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

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 200
..... -ki határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte
ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke Budapesti Corvinus Egyetem
Dr. Szabó S. András Élelmiszerkémiai és Táplálkozástudományi Tanszék

Tagjai Budapesti Corvinus Egyetem
Dr. Kosáry Judit Alkalmazott Kémia Tanszék

..... Budapesti Corvinus Egyetem
Békássyné dr. Molnár Erika Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék

..... Szent István Egyetem
Dr. Várady László Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Halgazdálkodási Tanszék

..... Magyar Állami Földtani Intézet
Dr. Bartha András Laboratóriumi Főosztály

Opponensek

..... Debreceni Egyetem
Dr. Prokisch József Mezőgazdaságtudományi Kar
Élelmiszertudományi és Minőségbiztosítási Tanszék

..... Debreceni Egyetem
Dr. Posta József Természettudományi Kar
Szervetlen- és Analitikai Kémiai Tanszék

Titkár

..... Budapesti Corvinus Egyetem
Dr. Hegedűs Attila Alkalmazott Kémia Tanszék

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS	1
2.	CÉLKITŰZÉSEK	3
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
3.1	Az arzén kémiai tulajdonságai	4
3.2	Arzén és a történelem.....	5
3.3	Az arzén környezeti előfordulása.....	9
3.4	Arzénvegyületek nevezéktana.....	9
3.5	Arzénvegyületek biológiai hatásai és metabolizmusa	10
3.6	Az arzéntartalomra vonatkozó előírások.....	14
3.7	Az arzénspeciációs analízis folyamata.....	15
3.7.1	Mintavétel	15
3.7.2	Mintaelőkészítés teljes arzén meghatározásához.....	15
3.7.3	Mintaelőkészítés az arzén módosulatanalitikában	16
3.7.4	Az extraktumok tisztítása.....	19
3.7.5	Arzénspeciációs analitikai rendszerek	20
3.7.6	Elválasztástechnikai módszerek az arzénspeciációban.....	24
3.7.6.1	Az arzénvegyületek kémiája	24
3.7.6.2	Kromatográfiás módszerek	25
3.7.6.2.1	Álló fázisok az ioncserés kromatográfiában	26
3.7.6.2.2	Álló fázisok az ionpárképző kromatográfiában	29
3.7.6.2.3	Mozgó fázisok az ioncserés kromatográfiában.....	31
3.7.6.2.4	Mozgó fázisok az ionpárképző kromatográfiában.....	35
3.8	Minőségbiztosítás a módosulatanalitikában	36
3.8.1	Hitelesített referenciaanyagok az arzénspeciációban.....	36
3.8.2	Standard vegyületek.....	37
3.8.3	Módszervalidálás	37
3.8.4	Kalibrációs módszerek.....	38
3.8.5	Mintatábla elkészítése, a jel sodródásának meghatározása.....	39
3.8.6	Teljes anyagmérleg készítése.....	40
3.9	ARZÉNSPECIÁCIÓ IVÓVÍZMINTÁKBAN.....	41
3.10	ARZÉNSPECIÁCIÓ TENGERI MINTÁKBAN	47
3.10.1	Tengeri bioszféra arzénspeciációs irodalma	47
3.10.2	Az arzénvegyületek környezeti körforgásáról alkotott elméletek.....	49
3.10.2.1	Az AB lebomlása mikroorganizmusok közreműködésével.....	49
3.10.2.2	Az arzenocukrok bioszintézise.....	50
3.10.2.3	Arzenobetain bioszintézise	52
3.10.2.4	Arzenobetain akkumulációja.....	54
3.11	ARZÉNSPECIÁCIÓ GOMBAMINTÁKBAN	56
3.12	ARZÉNSPECIÁCIÓ ÉDESvíZI KÖRNYEZETBEN I. – ÉDESvíZI HALAK.....	60
3.13	ARZÉNSPECIÁCIÓ ÉDESvíZI KÖRNYEZETBEN II. – ÉDESvíZI KAGYLÓK	64
4.	ANYAG ÉS MÓDSZER	68
4.1	A teljesarzén meghatározásához végzett mintaelőkészítés	68
4.2	A teljesarzén meghatározására használt berendezések és módszerek.	68
4.3	Arzénspeciációhoz alkalmazott mintaelőkészítés.....	70
4.4	Arzénspeciációhoz alkalmazott kapcsolt rendszerek.....	70
4.5	Az arzénkomponensek elválasztásához alkalmazott oszlopok és módszerek.	71

4.6	A mérésekhez alkalmazott vegyszerek, standardek és hitelesített anyagminták.	72
5.	EREDMÉNYEK	73
5.1	ELVÁLASZTÁSTECHNIKAI MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE ARZÉNSPECIÁCIÓHOZ	73
5.1.1	Kationos/protonálható arzénkomponensek kromatográfiás elválasztása.....	73
5.1.2	Anionos/deprotonálható komponensek kromatográfiás elválasztása	75
5.2	ARZÉNSPECIÁCIÓ IVÓVÍZMINTÁKBAN.....	79
5.2.1	A vízminták tárolására vonatkozó kísérlet.....	80
5.2.2	A dél-alföldi régióban gyűjtött ivóvízminták arzénspeciációs elemzése.....	81
5.2.3	A mérés minőségbiztosítása.....	83
5.3	ARZÉNSPECIÁCIÓ TENGERI KAGYLÓKBAN	84
5.3.1	Mintavétel	84
5.3.2	Mintaelőkészítés.....	85
5.3.3	A teljesarzén-koncentráció és az arzénmódosulatok meghatározása.....	85
5.3.4	A mérés minőségbiztosítása.....	86
5.3.5	Eredmények	88
5.4	GOMBAMINTÁK ARZÉNSPECIÁCIÓS ELEMZÉSE	93
5.4.1	Extrakciós technikák összehasonlítása.....	93
5.4.2	Arzénfelvétel és metabolizmus vizsgálata természetett gombában.....	96
5.4.3	A mérés minőségbiztosítása.....	99
5.5	ARZÉNSPECIÁCIÓ ÉDESvíZI KÖRNYEZETBEN I. – ÉDESvíZI HALAK.....	101
5.5.1	Mintavétel	101
5.5.2	Mintaelőkészítés.....	103
5.5.3	Anyagok és módszerek	104
5.5.4	Eredmények	104
5.5.4.1	Teljesarzén-koncentráció	104
5.5.4.2	Arzénspeciáció	105
5.5.5	Következtetések	109
5.6	ARZÉNSPECIÁCIÓ ÉDESvíZI KÖRNYEZETBEN II. – ÉDESvíZI KAGYLÓK	111
5.6.1	Mintavétel	111
5.6.2	Mintaelőkészítés.....	112
5.6.3	Anyagok és módszerek	112
5.6.4	Eredmények	112
5.6.4.1	Az édesvízi kagylók teljes arzénkoncentrációja	112
5.6.4.2	Az édesvízi kagylók arzénspeciációs elemzése	113
5.6.4.3	Környezeti hatások.....	119
6.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	120
7.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	122
8.	SUMMARY	123
9.	MELLÉKLETEK.....	124
9.1	1. Melléklet	124
9.2	2. Melléklet	125
10.	IRODALMI ÖSSZEFOGLALÁS	126
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	137

Andrásnak és Boldizsárnak

„Noscenda est mensura sui spectandaque.”
(Juvenalis, Szatírák, XI.)

„Ismerd s alkalmazd a saját mértéked az apró és nagy dolgokban .”

1. BEVEZETÉS

A speciációs analitika a kémiai tudományok egy viszonylag fiatal ága, melynek kezdetét kb. a 20. század közepére tehetjük. A speciációs analitikai szemlélet abból a ma már bizonyított tényből indul ki, miszerint az elemek bio-, geokémiai viselkedését, esszencialitását és esetleges toxicitását azok közvetlen kémiai környezete határozza meg. Ezáltal a vegyületek biológiai hatásairól a teljes elemtartalom ismerete helyett a molekuláris formák szelektív meghatározása nyújt hiteles információt. A speciációs analitikai kutatások első célfeladatait a higany, az ón, a szelén, valamint az arzén vegyületei jelentették.

Az arzént korábban mérgező elemnek tartották, szigorúan ellenőrzik ma is bizonyos élelmiszercsoportok teljes arzénkoncentrációját. 1977-ben azonban kiderült, hogy a nagy arzénfelhalmozással jellemezhető tengeri eredetű élelmiszerek arzén szempontjából veszélytelenek, hiszen a félfém döntően egy nem felszívódó formában (arzenobetain) van jelen a tengeri halak/kagylók szöveteiben. Azóta több tucat arzénvegyület jelenlétét sikerült bizonyítani, mely munkákhoz analitikai módszerek komoly fejlesztését vitte véghez a tudóstársadalom. Az arzén azonban nem minden esetben ilyen ártalmatlan. Toxikológiai vizsgálatokkal bizonyították, hogy a szerves arzénformák (arzenit és arzenát) könnyen felszívódó bioaktív specieszek, melyek erős karcinogén, mutagén, teratogén hatással jellemezhetők. A kutatások tehát olyan analitikai módszerek kidolgozására irányulnak, melyek az egyes arzénmódosulatokat egymástól szelektíven képesek meghatározni.

Az arzénspeciációs munkák célja kettős. Mind a mai napig fontos kutatási irányt képviselnek a toxikológiai vizsgálatok, melyek a toxikus szerves arzénformák jelenlétét határozzák meg gyakran fogyasztott élelmiszerekben. Ezek közül élen jár az ivóvíz, mely főként geokémiai okból tartalmazhat szignifikáns mennyiségű arzént dominánsan szerves formában. A téma hazai vonatkozása is ismert, hiszen a dél-alföldi régió mélyégi ivóvízkészlete arzénnel erősen szennyezett.

A tengeri eredetű élelmiszerek esetében a fentiekkel ellentétes kutatási eredmények születtek: a nem toxikus arzenobetain alkotja a kumulált arzéntartalom nagy részét. A speciációs munkák a törvényhozó szerveket is meggyőzték, ezáltal 2003-tól a speciációs szemlélet megjelenik a magyar élelmiszerszabályozásban is. Más élelmiszercsoportok (mint a gombák és a rizs) esetében a speciációs vizsgálati eredmények nem egyöntetűek, ezért mind a mai napig határértékek vonatkoznak a maximálisan megengedhető teljes arzéntartalomra. Remélhetően a tendencia folytatódik, és a későbbiekben további határérték-módosításokra számíthatunk.

Az arzénspeciációs kutatások másik fontos területe a biokémiai folyamatok tanulmányozása. A vizsgálatok célja az arzén környezeti körforgásának megértése, különös tekintettel a humán

arzénmetabolikus folyamatokra. A mérésekhez nagyon érzékeny analitikai módszerek szükségesek, melyek segítségével akár nyomnyi mennyiségben jelen levő komponensek is kimutatathatók, jelezve bizonyos biokémiai folyamatok meglétét. A tanulmányok nagy hangsúlyt fektetnek eddig nem ismert, új arzénkomponensek felfedezésére. A kutatási érdeklődés az egyre nagyobb léptékek irányába mutat, minél inkább megőrizve az arzén közvetlen kémiai környezetét. Ez sokszor nagymolekuláris szinten (>500 kDa) értendő, azaz az arzén-protein kapcsolatok feltérképezését jelenti. Ehhez köztes lépésnek tekinthető az utóbbi években nagy érdeklődést keltő tio-arzénvegyületek kimutatása, melyekben az As=S kötés jelenléte a cisztein-tartalmú proteinekhez való kapcsolódás indikátora lehet.

Az arzénspeciációs analitikai rendszerek sokat fejlődtek az utóbbi ötven évben. A vegyületek elválasztására még mindig döntően a HPLC módszerek alkalmasak, de a hagyományos méretű oszlopokat lassan felváltják a mikro-/nanotöltetű oszlopok, melyek előnyösebb analitikai paraméterekkel jellemezhetők, valamint kisebb oldószer- és mintaigényűek. Mivel a mérések célja ma még leginkább a kismolekulák vizsgálata, döntően ion-kromatográfias technikák használatosak. Az arzéntartalmú proteinek, peptidok elválasztására méret alapján, vagy izoelekromos pont alapján működő esetlegesen több-dimenziós elválasztási módszereket fejlesztettek ki. Az elválasztástechnikai egységhez elem- vagy vegyületspecifikus detektorokat kapcsolnak, melyek között a különbséget az ionforrás határozza meg. Az előbbi esetben az ionforrás leginkább láng, vagy újabban ICP (induktívan csatolt plazma), melyek egyöntetűen arzén-atomokká/ionokká alakítják a folyadékrammal beérkező arzénvegyületeket. Vegyületspecifikus detektálás esetén az ionforrás ennél sokkal „lágyabb”, hiszen meghagyja az arzén közvetlen molekuláris környezetét. Ezen célra leginkább az elektropray ionforrások terjedtek el, melyek által lehetővé válik az arzénmolekulák roncsolásmentes vizsgálata. Az ionforrásban keletkező ionok a detektorba jutnak. Az optikai módon működő elemspecifikus detektorokat (AAS, AFS, AES) ma már felváltják a tömegspektrometriás módszerek, melyek kimutatási határa alacsonyabb. Ez esetekben analízátorként leginkább a quadropólusos technikák terjedtek el. A vegyületspecifikus tömegspektrometriás detektorok többnyire quadropólusos vagy TOF analízátorokkal működnek. A fent felsorolt műszerkapcsolások kiegészülhetnek derivatizációs műveletekkel, mint a hidridképzés, mely során a porlasztásnál nagyobb hatásfokú gáz fázisú mintabevitelre adódik lehetőség. Mivel az eddig megismert arzénvegyületek csak kis része képez hidridet, ma már ritkábban alkalmazzák ezt a módszert.

Az arzénspeciáció intenzíven fejlődő tudományág, mely az elkövetkezendő évtizedekben bőséges megválaszolatlan kérdést kínál fel a területtel foglalkozó kutatótársadalom számára.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám célkitűzéseit a következőkben fogalmazom meg.

- Arzénspeciációs kromatográfias módszerek fejlesztése, melyekkel lehetővé válik a leggyakrabban vizsgált arzénmódosulatok szelektív meghatározása,
- A kidolgozott módszerek alkalmazása az alábbi környezeti minták elemzésére:
 - hazai ivóvízkészlet,
 - tengeri kagylók,
 - gombák,
 - hazai tenyésztett halak,
 - édesvízi kagylók.
- A dél-alföldi régió arzénszennyezett rétegvízének teljes arzénkoncentrációjának, valamint arzenit/arzenát specieszarányának meghatározása.
- A kérdés megválaszolása: „Vajon a tengeri kagylók arzenobetain-akkumulációja arányos-e a felvett arzén teljes mennyiségével?”.
- A tengeri kagylók magas arzenobetain-koncentrációjának ismeretében arzénspeciációs vizsgálatok elvégzése édesvízi eredetű kagylómintákban is, különös tekintettel a tio-arzénvegyületek esetleges jelenlétére.
- Gombák arzénspeciációs vizsgálataihoz alkalmazott extrakciós technikák hatásfokának összehasonlítása.
- Csiperkegomba (*Agaricus bisporus*) arzénfelhalmozásával kapcsolatos vizsgálatok.
- A hazai dél-alföldi régióban tenyésztett halak arzénmódosulat-eloszlásának feltérképezése két célcsoport (a termálvizekben tenyésztett afrikai harcsák, valamint a felszíni vizekben nevelt pontyok) alapján, az eredmények összevetése a tengeri halak jól ismert speciesz-eloszlásával.
- Az egyes részfeladatok analitikai minőségbiztosításának megoldása.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Az arzén kémiai tulajdonságai

Az arzén a periódusos rendszer 5. főcsoportjának 3. eleme. Elnevezése görög eredetű: arzenikosz jelentése vakmerő. Az arzén szulfidjait már Arisztotelész (i. e. 384-322) is ismerte. Az arzént elemi állapotban Albertus Magnus állította elő először 1250-ben, és Paracelsus (1493–1541) vezette be a gyógyászatban.

Az arzén relatív atomtömege 74.9216, csak egy stabil izotópja létezik (^{75}As). Elektronkonfigurációja $[\text{Ar}](3d)^{10}(4s)^2(4p)^3$, oxidációs száma vegyületeiben +5, +3 és -3 lehet. Elektronegativitása 2.0, ionizációs energiája 5.825 ((4p)³) és 16.361 ((4s)²(4p)³) MJ mol⁻¹. Az arzén a fémek és a nemfémek közötti átmenetet képviselő átmeneti fémek csoportjába tartozó elem. Több allotrop módosulat formájában létezik, stabil módosulata fémes jellegű.

Az arzénásványok a világban széleskörűen megtalálhatók, kisebb mennyiségben pedig már szabad elemet is találtak. A legismertebb ásványai közé tartozik a két szulfidja, a realgár (As_4S_4) és az orpiment (As_2S_3), valamint oxidos ásványa az arzenolit (As_2O_3). A vas, kobalt és nikkal arzenidjei és az ezekkel az elemekkel képzett vegyes szulfidjai alkotják az ásványok másik csoportját, ide tartoznak pl. a lollingit (FeAs_2), szafflorit (CoAs_2) és az arzenopirit (FeAsS).

Az arzén száraz levegőn stabilis, nedves levegőn azonban a felülete oxidálódik, narancs-bronz felületi hártva keletkezik, amely további érintkezés hatására fekete színű bevonattá változik. Levegőn hevítve szublimál, és fokhagymaszagú mérgező tulajdonságú As_2O_3 -dá oxidálódik. Fémekkel arzenideket képez (pl. CoAs_3), fluorban lánggra lobban, és AsF_5 keletkezik, más halogenidekkel arzén-trihalogenidek képződnek, oxidáló közegben diarzén-trioxid (As_2O_3), valamint As_2O_5 keletkezik. Az oxidokat vízben oldva arzénessav (H_3AsO_3) és arzénsav (H_3AsO_4) keletkezik. Az arzén elektronszerkezetében három párosítatlan elektron található. Egy elektron felvételéhez az elektronaffinitás értéke igen nagy, a további elektronok felvétele ellen azonban jelentős Coulomb-féle taszítás hat, következésképpen az As^{3-} -ion képződése erősen endoterm folyamat. Ilyen vegyületre példa az arzén-hidrid (AsH_3), mely csak erős hidridképző ágens (pl. NaBH_4) jelenlétében képződik. A szabad elem fémszerű jellege ellenére az arzén ionizációs energiái és elektronegativitása a foszforéhoz hasonló, ezáltal könnyen képez erős kovalens kötést a legtöbb nemfémes elemmel. Sokféle fémorganikus vegyületet képez mind +3-as, mind +5-ös oxidációs állapotban. Kémiai reakciókban mind telített gyűrűs, mind aromás, mind alkilezett szerves származékai előállíthatók.

3.2 Arzén és a történelem

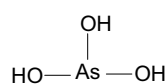
Az arzén a királyok mérge s a mérgek királya. Színtelen, íztelen és szagtalan – éppen ezért volt talán a gyilkosok kedvenc eszköze. Számos példát említhetünk erre a történelemből: az itáliai reneszánsz Borgia család, Hyeronima Spara, valamint a trónt követelő hercegek is előszeretettel nyúltak ehhez a titkos fegyverhez céljuk megvalósítása érdekében. Hasonlóan, Napóleon halálának oka is feltételezhetően az arzénre vezethető vissza. A feltevések azon a vizsgálaton alapulnak, amelyet Pascal Knitz, a strasbourgi Igazságügyi Orvostani Intézet toxikológusa végzett. Knitz a Napóleon hajából vett mintákat szekunderion-tömegspektrometria kifinomult módszerével vizsgálta, s ez az arzén tartós jelenlétét mutatta ki. Ben Weider, a Nemzetközi Napóleon Társaság alapítójának meggyőződése szerint „Napóleon megmérgezése előre megtervezett és szándékos volt.” David Jones, a newcastle-i egyetem immonológusa szerint azonban a tapéta volt a mérgezés oka. A Longwood-házban, ahol Napóleon élete utolsó éveit töltötte, egy réz-arzenit tartalmú pigmenttel (úgynevezett Scheele-zölddel) festették meg a tapétát. Bizonyos penészgombák hatására a tapéta arzéntartalma arzén-hidriddé alakult, mely illékonyaságánál fogva a szoba levegőjében dúsult fel. Ez a mérgező gáz okozhatta Napóleon halálát, mely a szarurészekben (haj, köröm) feldúsulva évszázadokig tanúsította a mérgezést. (NEWMAN, 2005)

Az arzénvegyületek betegségek kezelésére is használhatók. A Kr. e. 5. században Hippokratész fekélyt kezelt arzénnal. Arzéntartalmú volt az 1786-ban feltalált Fowler-oldat is, amellyel az asztmától a rákig sok mindent gyógyítottak. 1910-ben egy arzénvegyületet tartalmazó gyógyszer (Salvarsan) lett a szifilisz első hatékony ellenszere, melyet utóbb a penicillin váltott fel. (NEWMAN, 2005) A közelmúltban szűnt meg Magyarországon a Strichnotonin nevű gyógyszer forgalmazása, mely szerves arzénszármazékot tartalmazó, roborálásra használatos injekció. 1890-ben William Osler, a modern amerikai orvostudomány atyja, a leukémia legjobb gyógyszerének nevezte az arzént, melyet máig eredményesen alkalmaznak a betegség akut válfajainak kemoterápiájában 'Trizenox' néven. (AMADORI, 2005)

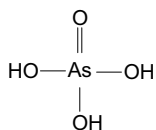
Méreg tehát az arzén, vagy gyógyszer? Ma már nem csak Borgiákat és orvosokat kérdezhetünk az arzén megítélésével kapcsolatban, hanem speciációs analitikusokat is. Míg a híres orvos, Paracelsus szerint „minden anyag mérge, nincs olyan, amelyik nem az – a mérge és az orvosság közti különbséget a helyes dózis jelenti”, addig a speciációs analitikusok azt nézetet képviselik, miszerint az elem toxicitása elsősorban kémiai módosulatától függ és csak másodsorban koncentrációjától. Egy elem kémiai módosulata (species) IUPAC definíció szerint: „az elem egy adott formája, amelyet izotópösszetétele, vagy elektron-/oxidációs állapota, és/vagy komplex vagy molekuláris szerkezete határoz meg”. (TEMPLETON, 2000) Ezáltal tehát két, különböző kémiai szerkezettel jellemezhető

arzéntartalmú vegyület különböző toxicitású lehet. Ezt nem nehéz elképzelni, hiszen a gyógyszerfejlesztés is ezen az elven alapul. Míg a morfin erősen kábító tulajdonságú fájdalomcsillapító, addig a morfin 3-metil-étere, a kodein, már köhögéscsillapító hatással rendelkezik. A fenti definíció értelmében ezek a vegyületek is kémiai módosulatok. Látható, hogy kis mértékű változás a molekula szerkezetében nagyban befolyásolhatja a biológiai hatást. Ugyanez igaz az arzénre is. A speciációs analitika „azon analitikai tevékenységek összessége, melyek egy adott mintában lévő egy vagy több módosulat szelektív meghatározására irányulnak”. Az arzén speciációs analízise tulajdonképpen az 1977. évre eredeztethető, amikor Edmonds és Francesconi felfedezte, hogy a tengeri homárban nagy mennyiségben akkumulálódott arzén egy szerves módosulat, az arzenobetain (AB) formájában van jelen. (EDMONDS, 1977) Ezt követően hamar kiderült, hogy ez a módosulat az emberi szervezetre nézve nem toxikus, ezáltal a korábbi, teljes arzénkoncentráció meghatározására épülő nézetek érvényüket veszítették. A tudományterület rohamos fejlődésnek indult, kialakultak azok a módszerek, melyek képesek voltak az arzénvegyületek kémiai szerkezetének megőrzése mellett a módosulatok nagy hatásfokú kinyerésére és érzékeny detektálására. Az évek során több tíz arzénmódosulatot (1. ábra) mutattak ki biológiai mintákban, ezek emberi szervezetre gyakorolt hatását részben megismerték. Bizonyos, gyakran fogyasztott és nagy mennyiségű arzén felhalmozására képes élőlénycsoportok kiemelt szerepet kaptak, mint például a tengeri halak, kagylók, a kilencvenes évektől a gombák, majd a rizs. Az 1. ábrán néhány ezidáig azonosított arzénmódosulatot mutatok be, melyeket dolgozatomban részletesen tárgyalok.

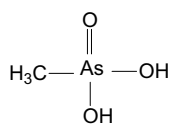
Az utóbbi évtizedekben a speciációs analitikai kutatások száma megsokszorozódott. Felmerült az igény a módosulatok komplex környezeti és biológiai szerepének megismerésére. Ehhez a már kimutatott arzénvegyületek biokémiai folyamatait tanulmányozzák, valamint nagy a törekvés új, korábban nem ismert arzénmódosulatok felfedezésére. Napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a toxikológiai vizsgálatok, leginkább az ivóvízben domináns szerves arzénformák rákkeltő tulajdonságával kapcsolatban. (SMITH, 2002) Többet hallunk az arzén ígéretes terápiás alkalmazásáról is, mely leginkább a leukémiák csoportjába tartozó tumoros megbetegedések esetében bizonyult hatásosnak. (ZHU, 2002) A vegyületek terápiás/toxikológiai tulajdonságai nagy mértékben különböznek, ezáltal sürgetően fontossá válik az arzén biokémiai folyamatainak megismerése, különös tekintettel a humán metabolizmusra.



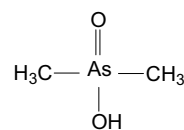
arzenit As(III) 1



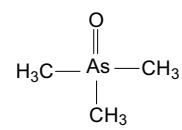
arzenát As(V) 2



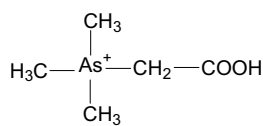
metil-arzenát MA(V) 3



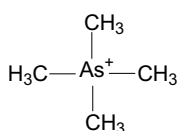
dimetil-arzenát DMA(V) 4



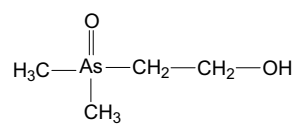
trimetil-arzin-oxid TMAO 5



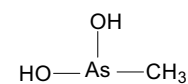
arzenobetain AB 6



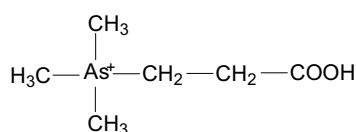
tetrametil-arzónium kation TETRA 7



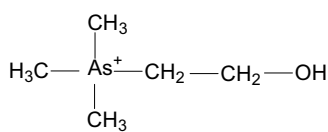
dimetil-arzinoil-etanol DMAE 8



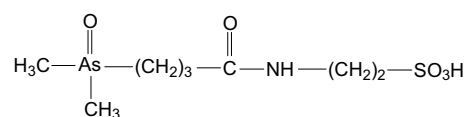
metil-arzenit MA(III) 18



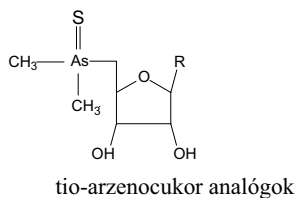
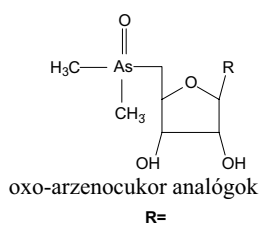
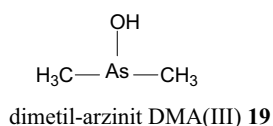
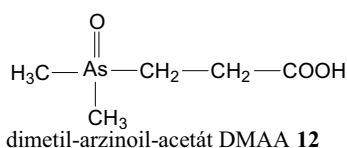
trimetil-arzónium-propionát TMAP 9



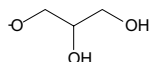
arzenokolin AC 10



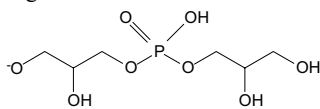
N-[4-(dimetil-arzinoil)-butanoil]-taurin 11



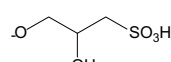
R=



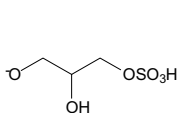
arzenocukor-glicerol 13



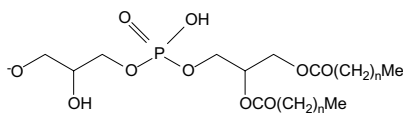
arzenocukor-foszfát 14



arzenocukor-szulfonát 15



arzenocukor-szulfát 16



17

1. ábra Arzénmódosulatok szerkezeti képlete, elnevezése és rövidítése

Jelen fejezetben nem célozom az arzénnel kapcsolatos eddigi teljes tudásanyag közzé tétele, hiszen számos összefoglaló, nagyon érdekes és könnyen érthető tanulmány jelent meg a témában az elmúlt 5-10 évben. Ezek mindegyike egy-egy speciális nézőpontból tárgyalja az arzénnel kapcsolatos eredményeket. Ezeket az összefoglalókat szívből ajánlom mindazoknak, akik a jövőben arzénnel kapcsolatos kutatásokat terveznek, vagy egyszerűen csak érdeklődnek a téma iránt. A publikációk címét és rövid ismertetését az 1. táblázatban teszem közzé. Az egyes mintacsoportokon végzett arzénspeciációs vizsgálatok eredményeit részletesen doktori munkám későbbi fejezeteiben, a kísérleteimmel összefüggő nézőpontok szerint tárgyalom.

1. táblázat Arzénspeciációval kapcsolatos legfontosabb összefoglaló közlemények

Összefoglaló publikáció címe angol nyelven	A közlemény rövid bemutatása	Irodalom
Arzenic speciation in the environment	<i>Az első nagyon alapos összefoglaló munka az arzénspeciációról, mely az 1989 előtti kutatási eredményeket gyűjti össze és részletezi.</i>	CULLEN, 1989a
Speciation of tin, lead, mercury, arsenic and selenium compounds by capillary electrophoresis	<i>A munka a kapilláris elektroforézis elválasztási módszer arzénspeciációs alkalmazási lehetőségeit tárgyalja. A különböző detektorhoz csatolt elválasztástechnika előnyeit és hátrányait részletezi.</i>	SUN, 2001
The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic	<i>Az arzén toxicitásának és metabolizmusának kutatási eredményeit foglalja össze. Különös figyelmet kapnak a háromértékű metilált módosulatok, mint a DMA(III).</i>	THOMAS, 2001
Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony and bismuth	<i>Az arzén mikrobiológiai átalakulásait tárgyalja.</i>	BENTLEY, 2002
Arzenic speciation analysis	<i>Az arzénvegyületek elválasztására és detektálására fejlesztett analitikai módszereket, valamint a mintaelőkészítés problémáit gyűjti össze.</i>	GONG, 2002
Arzenic round the world: a review	<i>Az arzénmódosulatok környezeti előfordulását, valamint egészséget befolyásoló hatásait foglalja össze. Az utolsó fejezetben érdekes epizódokat találunk „Földünk arzénmérgezései”-ről.</i>	MANDAL, 2002
Mechanism of arsenic biotransformation	<i>Általános áttekintést nyújt az arzén biokémiai folyamatairól és azok egészségügyi vonatkozásairól.</i>	VAHTER, 2002
The speciation of natural tissues by electrospray-mass spectrometry. I: biosynthesised species, As and Se	<i>Elektrospray-tömegspektrometria alkalmazása az arzénmódosulatok azonosításában. A munka különös figyelmet szentel a tandem módszereknek, több példán illusztrálja a technika előnyeit arzén speciációs analízisben.</i>	McSHEEHY 2003a
The potential of organic (electrospray- and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis	<i>A szerves tömegspektrometriás módszereket nagyszerűen összefoglaló tanulmány, külön fejezettel az arzénspeciációs alkalmazásról.</i>	ROSENBERG 2003
The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control	<i>Az arzénspeciációs célra szánt referencia anyagok hitelesítési folyamatait tárgyalja.</i>	McSHEEHY, 2003b
Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003	<i>Az arzénspeciációs célokra fejlesztett módszereket, és azok analitikai alkalmazását írja le.</i>	FRANCESCONI, 2004a

3.3 Az arzén környezeti előfordulása

Az arzén a 20. leggyakrabban előforduló elem a földkéregben. (NRC, 1977) A kőzetekhez kötött arzén viszonylag könnyen szabaddá válik időjárási jelenségek, biológiai aktivitás, vulkáni aktivitás, antropogén hatások és vízben oldódás következtében. Az így mobilizált arzén az esővel vagy a lebegő részecskékhez kötődve újból a felszínre kerül. Az arzén környezeti hatásáról készített tanulmányok nem képviselnek egységes nézetet. Annyi azonban közös, hogy az antropogén eredetű szennyezések döntő többsége bányászati tevékenységre és kőolajszármazékok égésére vezethető vissza. (CHILVERS, 1987) Irodalmi adatok szerint a természetes : antropogén eredetű arzénszennyezés mértékének aránya kb. 60:40, tehát az emberi tevékenység szignifikáns mértékben beleavatkozik az arzén környezeti körforgásába. (CHILVERS, 1987) Annak ellenére, hogy az arzénszennyezettség mértéke felbecsülhetetlen, az arzén körülöttünk mindenütt jelen van: a légkörben, a vizekben, a talajban, az üledékben és az élőlényekben egyaránt.

A talajban általában 0.05-0.2 mg/kg arzén található, de a tengeri üledék arzéntartalma 40 mg/kg-ot is elérhet. (NRC, 1977) A tengerek és óceánok arzénkoncentrációja egységesen kb. 2 µg/l, mely szinte teljes egészében szervetlen arzénmódosulat. (CABON, 2000) A tengeri élőlényekben néhány száz ppm arzénkoncentráció is előfordul, melyet az őket körülvevő vízből, üledékből vagy a táplálékláncon keresztül halmoznak fel. Az eddigi kutatási eredmények alapján általánosságban elmondható, hogy az élőlényekben a toxikus szervetlen arzénformák viszonylag kis mennyiségben találhatók, a domináns módosulatok a szerves arzénvegyületek. Ezt a megállapítást legelőször Edmonds kutatócsoportja bizonyította be, aki 1977-ben azonosította az AB-t nyugati homár izomszövetből. (EDMONDS, 1977) Azóta kiderült, hogy a nem toxikus AB széles körben elterjedt környezetünkben. Ez a módosulat a tengeri állatok által felhalmozott arzén nagy arányát képviseli. Ezzel szemben a tengeri algákra az arzenocukrok domináns előfordulása jellemző.

A szárazföldi élőlények a tengeriekhez képest kevesebb arzént halmoznak fel, a speciációs kép nem ennyire egységes, még máig formálódik. Néhány kitüntetett élőlénycsoport – melyekben könnyen mérhető mennyiségű arzén halmozódhat fel – speciációs vizsgálataira nagyobb érdeklődés mutatkozik, másokéra – például az édesvízi bioszféra alkotóira – kevesebb.

3.4 Arzénvegyületek nevezéktana

Környezeti és biológiai mintákban az arzénvegyületek nagy része ionos formában van jelen (az arzénessav ez esetben kivétel). Ezért az egyszerűség kedvéért jelen munkában a vegyületeket protonált formában ábrázolom, de a biokémiában megszokott elnevezést követve a vegyületek deprotonált

elnevezését teszem közzé (tehát arzénessav helyett arzenit, arzénsav helyett arzenát stb.). (1. ábra) Ehhez hasonlóan a metilezett származékokat is anionként javaslom elnevezni (pl. metilarzonát). Az oxidációs állapotokat a IUPAC nomenklatúra alapján (Nomenclature of Inorganic Chemistry, 1990, I-4.4.0 és I-5.5.2.2) jelölöm.

A kémiai fantázianevek bemutatására a legjobb példa az arzenobetain, mely a hozzá rokon vegyület glicin-betain analógiájára kapta nevét. Ez esetben a rövid, de jellemző elnevezés sokkal inkább célravezetőbb, mint a kémiai név (trimetil-arzónium-acetát). (1. ábra/6) Ez az egyszerűsítés viszont megnehezítette a dolgunkat, amikor a metilcsoporttal bővülő arzenobetain molekulát (trimetil-arzónium-propionát) először azonosították biológiai mintákban. (1. ábra/9) A felfedezést követően a kutatótársadalom kétféle elnevezés mellett szavazott. Egyikük, az AB-hez hasonlóan AB₂ fantázianévvel illetve a metilcsoporttal bővült módosulatot, a másik csoport visszatért a kémiai elnevezéshez, és annak rövidítését (TMAP) használta a publikációkban (annak ellenére, hogy az acetát származék megmaradt AB-nek). Dolgozatomban én is ez utóbbit választom. A TMAO elnevezés nem okoz kényelmetlenséget az arzénnel foglalkozó analitikusok körében, mint ahogy a tetrametil-arzónium ion rövidítése, a TETRA sem. Az újabban felfedezett egyszerű szerkezetű arzénkomponensek esetében a kémiai elnevezés került előtérbe, mint például a dimetil-arzinoil-etanol (DMAE) és a dimetil-arzinoil-acetát (DMAA). (1. ábra/8, 12) Shibata és Morita korai munkájában 15 arzénvegyületet vizsgált, köztük hat arzenocukorral. A szerzők minden módosulathoz egy-egy arab számot rendeltek, melyekre a közlemény során hivatkoztak. Ezt az elnevezést más szerzők előszeretettel vették át saját publikációjukban – így lett például az arzenocukor₁, arzenocukor₂ stb. elnevezés – anélkül, hogy a hivatkozott vegyület szerkezeti képletét közzétették volna. (SHIBATA, 1989) Sokkal helyesebb, ha a vegyületeket számok helyett rövid névvel illetjük, hiszen az olvasó nem kényszerül a vegyületek visszakeresésére, hanem a név alapján felismeri a tárgyalt molekulát. Arzenocukrok esetében az 1. ábrán közzé tett elnevezések terjedtek el. (1. ábra/13-16) Az oxo- és a tio- előtag szükségessége csupán az elmúlt 1-2 évben merült fel, miután sikeresen azonosították a kéntartalmú arzenocukor analógokat.

3.5 Arzénvegyületek biológiai hatásai és metabolizmusa

A különböző arzénformák biológiai viselkedésének tanulmányozása nehéz feladat, még akkor is, ha korszerű speciációs analitikai módszerek állnak a rendelkezésünkre. A módosulatok emberi szervezetre gyakorolt hatásai jelenleg csupán *in vitro* tanulmányozhatók, amely modell messze áll a valóságtól – elsősorban a valódi biokémiai folyamatok hiánya miatt. Állatkísérleteket végeznek a valódi élettani folyamatok modellezésére. Leggyakrabban patkányokat alkalmaznak, annak ellenére, hogy azok arzénmetabolizációs folyamatai bizonyítottan eltérnek az emberétől. (KIRK, 2001)

A vegyületek toxicitásának kifejezésére az LD₅₀-érték szolgál, melyet néhány arzénmódosulatra már meghatároztak. (2. táblázat) (KAISE, 1992, SHIOMI, 1994, DONOHUE, 1999)

2. táblázat Néhány arzénmódosulat LD₅₀ értéke (patkány és egér, oral)

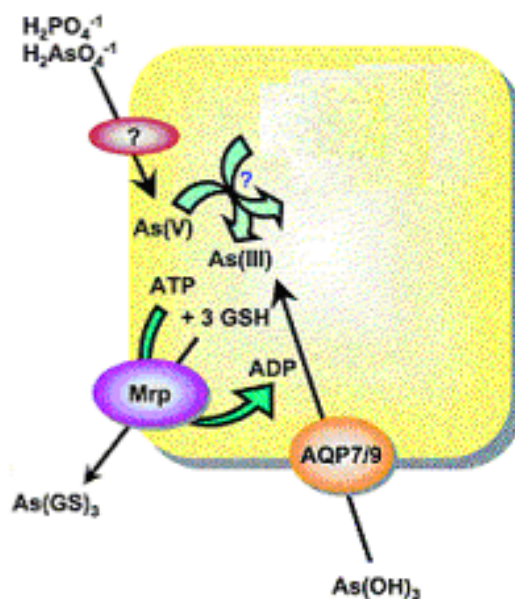
Módosulat	LD ₅₀ (mg/kg)
As(III)	15-42
As(V)	20-800
DMA(V)	1200-2600
MA(V)	700-1800
AC	6500
AB	>10000
TETRA	890
TMAO	10600

A táblázatban látható, hogy a szervetlen arzénvegyületek 2-3 nagyságrenddel toxikusabbak, mint a szerves módosulatok. A környezetünkben található szervetlen arzénnel ellentétben a biológiai minták kevés kivételtől eltekintve javarészt szerves formában tartalmazzák az arzént. Ebből kiindulva, valamint a módosulatok toxicitásának ismeretében a tudóstársadalom hosszú ideig hitte, hogy az élő szervezet tulajdonképpen méregteleníti a felvett arzént. Ma már ez az elképzelés megdőlt azáltal, hogy körvonalazódtak az arzén humán metabolikus folyamatai. A kiindulás a szervetlen arzénformák emberre gyakorolt hatásának megismerése volt, hiszen mint Magyarországon is, sok esetben jelent problémát az ivóvizek magas arzénterhelése. Epidemiológiai tanulmányokban bizonyítást nyert, hogy az ivóvíz által fogyasztott szervetlen arzén káros hatást gyakorol az emberi szervezetre. A bőr az arzénmérgezés legérzékenyebb indikátora, melyen a legelső – még nem malignus – toxikológiai tünetek észlelhetők. Ilyenek például a hámszövet lassú leválása, a léziók. Yoshida a közelmúltban kimutatta, hogy már 50-100 µg/l arzéntartalmú ivóvíz krónikus fogyasztása esetében megjelennek a tünetek. Komolyabb krónikus, illetve akut tünetek közé soroljuk a neurológiai hatást, a hipertenziót, a perifériás érrendszeri betegségeket, a légzőszervi panaszokat, a diabéteszt valamint a malignus folyamatokat. Ez utóbbiak leginkább a bőrrák, tüdőrák, vesedaganat, hólyagdaganat, májcirrózis és nőgyógyászati daganatok formájában nyilvánul meg. (YOSHIDA, 2004) A tanulmányban nem vizsgálták a három, illetve öt vegyértékű arzénformák közötti különbségeket, ezért a fenti tünetek általánosságban a szervetlen formákra jellemzőek.

A mai napig a szervetlen arzénformák rákkeltő hatásának biokémiai mechanizmusa nem ismert, de az, hogy az arzén indirekten mutagén, bizonyítást nyert. (SCHOEN, 2004) Megfigyelték, hogy az arzén karcinogén hatását nem csupán egy, hanem több különböző káros folyamat együttesen okozza. Ezek a következők lehetnek: a jelátviteli folyamatok modulálása, oxidatív stresszkeltés, a DMA metiláció zavarása, a DNS javító-mechanizmus gátlása, mutációk generálása. A folyamatok dózisfüggése nem

lineáris, sőt, azt is megfigyelték, hogy krónikus expozíció esetében a szervezet hozzá szokik a mérgező anyag jelenlétéhez, annak komolyabb hatásai nélkül. (SCHOEN, 2004)

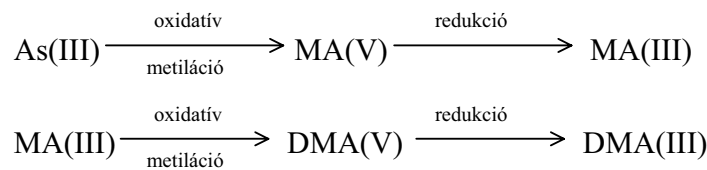
Az ivóvízzel a szervezetbe került arzén egy része a vizelet és széklet által távozik, leginkább dimetilált módosulat formájában. (LE, 2000a,b) Fontos azonban kiemelni, hogy a felvett arzén mennyiség nagy része raktározódik a szaruképződményekben, a májban és az agyban, ott nem ismert hatásokat okozva. Az ivóvízzel a szervezetbe került arzén első útja a májba, vesébe vezet. Ott a sejtek speciális transzportfolyamatok révén veszik fel a vegyületeket. (2. ábra)



2. ábra Emlős sejten lejátszódó arzéntranszport folyamatok vázlata (ROSEN, 2002)

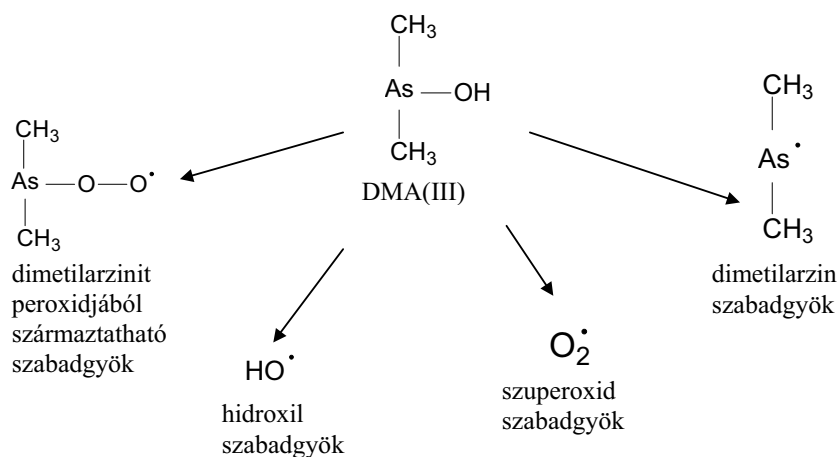
Az arzenit és az arzenát vegyületek különböző pK_a értékeinek következtében a sejtek közötti térben uralkodó $pH = 7$ kémhatású környezet eltérő ionizáltságot biztosít a két vegyületnek. Míg az arzenát anionos ($pK_a = 2.3$), addig az arzenit ($pK_a = 9.2$) semleges formában van jelen a sejtek között. Ezt szemlélteti a 2. ábra. Az arzenát ionok – a foszfát ionok hasonlósága alapján – foszfát-transzporterek segítségével kerülnek a sejtbe. (ROSEN, 2002) Ezen transzportfehérjék pontos szerkezete még nem ismert, de annyi már bizonyítást nyert, hogy a szállítást végző nagymolekulák a foszforsav és arzénsav vegyületeket egyaránt szubsztrátjuknak tekintik. (ROSEN, 2002) A semleges, hidroxid alakban jelen levő arzénessav vegyületet az ún. aquagliceroporin vegyületcsoport tagjai továbbítják a sejtekbe. Ezek nagyobb méretű csatornákat alkotnak a sejthártyán, és jellemzően a nagymolekulákat, mint a glicerolt és a karbamidot is nem-specifikus módon átvezetik a sejt belüli térbe. Ugyanezen folyamat felelős az arzénessav sejtbe juttatásáért is. A sejt belüli az arzenát-reduktáz enzimek vagy a glutation molekula

segítségével $\text{As(V)} \rightarrow \text{As(III)}$ redukció megy végbe. A nem reagált arzenát a vizelettel távozik. Ezután a sejtekben redukált arzenit a glutationnal (GSH) komplexeket alkot (As(GS)_3), mely vegyületek aktív transzport révén az epébe ürülnek, majd az emésztőtraktuson keresztül elhagyják a szervezetet (2. ábra). Ez a glutation-komplex képződés tulajdonképpen egy nagyon előnyös, méregtelenítő folyamat része. A sejtek glutation-kapacitása korlátozott, hiszen a molekula számos más méregtelenítő folyamatban is fontos szereplő (pl. szabad gyökök lekötésében). A maradék arzenit oxidatív metilációs folyamatokon keresztül metilálódik, mely folyamat a legújabb kutatási eredmények alapján nem méregtelenít, hanem azzal ellentétesen, toxikusabb vegyületekké alakítja az arzenit iont (3. ábra). (ROSEN, 2002)



3. ábra Sejtben lejátszódó oxidatív metilációs folyamatok

Tanulmányok szerint a fenti metabolizációs kaszkád csak az arzenittal megy végbe, az arzenát iont nem érinti. Ez utóbbi módosulat nem metabolizálódik az emberi szervezetben, hanem vagy eredeti formában a vizelettel távozik, vagy háromértékű módosulatokká redukálódik, és a fenti folyamat szerint metileződik. A keletkezett termékek, a hármas oxidációs számú MA és DMA molekulák nagyon erős genotoxikus hatással rendelkeznek, mely által erősen rákkeltő tulajdonságúak. (ROSEN, 2002) Tudományos kísérletekben bizonyítást nyert, hogy az arzén karcinogén hatása a DMA(III) molekula sejtkárosító hatásegységeire vezethető vissza. A folyamat tehát káros a sejtre nézve, ezáltal feltételezhetően nem az evolúciós fejlődés során alakult ki a metabolizációs reakció, hanem az valamely más reakciósor nem-specifikus enzimjeit használja. (ROSEN, 2002) Kiderült, hogy ezek a kevésbé ionizálható molekulák szokatlan mértékben képesek a sejtkomponensekkel – proteinekkel, nukleinsavakkal – kölcsönhatásba lépni. Ez a blokkolás idézi elő a sejt anyagcsere-folyamatainak drasztikus változását, miáltal az daganatos sejté alakul. (KITCHIN, 2001) A folyamat részletei egyelőre még nem ismertek. Yamaka és munkatársai az oxidatív stresszkeltéssel magyarázzák a karcinogén hatást (4. ábra). Véleményük szerint a háromértékű dimetilált arzénmódosulatból molekuláris oxigén hatására szabad gyökök keletkeznek. Ezek a szabad gyökök az örökítőanyagot károsítják – például az egyszeres kovalens kötések elszakításával. (4. ábra)



4.ábra DMA(III) molekulából képződő szabad gyökök

A fenti folyamatok és elméletek tehát azt hangsúlyozzák, hogy az MA(III) és DMA(III) vegyületek tehetők felelőssé az arzén káros hatásaiért. Mindkét vegyületet már kimutatták vizeletmintákban, ami megerősíti a feltételezést. (VALENZUELA, 2005) A háromértékű vegyületek analitikája azonban különös óvatosságot igényel, miszerint azok oxidáló közegben nagyon könnyen és gyorsan ötös módosulattá alakulnak. (VALENZUELA, 2005) A hármas és az ötös oxidációs állapotú metilált arzénmódosulatok elválasztásának és analitikájának az arzén biometilációs folyamatainak tanulmányozásában van nagy szerepe, mellyel Del Razo és Le részletesen foglalkozott. (DEL RAZO, 2000, LE, 2000a)

A fentiekben bemutattam, hogy az arzén toxicitásáról tulajdonképpen csupán a szerves vegyületek esetében beszélhetünk, ahol a biokémiai folyamatok miatt a vegyületek átalakulása nem kedvező irányú. A többi szerves módosulat ismereteink szerint kevésbé vagy nem toxikus. Ez annak köszönhető, hogy például az AB, AC és TMAO vegyületek felszívódása csekély mértékű, így azok változatlan formában a széklettel ürülnek. A kevés felszívódott mennyiség azonnal kiválasztódik a vesében, és a vizelettel távozik. A DMA(V) és MA(V) módosulatok bár felszívódnak, de sejtbe irányuló transzportfolyamatok híján a vizelettel ürülnek. Más molekulák esetében toxikológiai adatok nem állnak rendelkezésünkre.

3.6 Az arzéntartalomra vonatkozó előírások

Összességében elmondható, hogy a speciációs analitikai kutatások eredményei eddig csak kevés esetben gyakoroltak hatást a magyar szabályozásra. Arzén tekintetében a speciációs szemlélet 2003 óta érvényesül, amikor eltörölték a fogyasztásra szánt halak maximális arzéntartalmára vonatkozó

határértéket. (Magyar Közlöny, 2003) Ez a lépés a speciációs analitikai kutatási eredmények ismeretében született meg, hiszen nyilvánossá vált, hogy a tengeri eredetű élelmiszerek magas arzéntartalma tulajdonképpen egy nem toxikus módosulat formájában van jelen. Vajon helyesen döntés volt a határérték eltörlése? Egyrésztől igen, hiszen a tengeri halakban/kagylókban a sokszor jelentős arzéntartalom ártalmatlan. Másfelől a döntéshozók nem vettek figyelembe más élelmiszereket: például az édesvízi halakat. Ezen élelmiszerek arzéntartalma lehet ugyanilyen jelentős, míg speciesösszetételük nem azonos a tengeri állatokéval, sok esetben ismeretlen. További problémákat vet fel bizonyos módosulatok kérdéses toxikológiai tulajdonsága.

3.7 Az arzénspeciációs analízis folyamata

3.7.1 *Mintavétel*

A speciációs analízis első és egyben legkritikusabb lépése a mintavétel. Mielőtt a mintavételt pontosan megterveznénk, ki kell tűznünk az analízis célját. Például környezeti minták esetében a reprezentatív mintavételt számos faktor befolyásolja. Figyelembe kell vennünk a földrajzi adottságokat, az ökológiai viszonyokat (a vizsgálandó minta helye a táplálékláncban), a szezonalitást stb. A mintavételt előre gondosan meg kell tervezni arra a specifikus mintára, amely vizsgálatunk tárgya. Fontos, hogy a mintavétel és a mintatárolás művelete közben a vizsgálandó paraméterekben változás ne következzen be. Például vízminták arzénspeciációs elemzésénél fontos a redoxi-állapot megőrzése, hiszen ha a minta oxidáló környezetbe kerül, az arzenit könnyen arzenáttá alakul. Kerülni kell tehát azokat a körülményeket (magas hőmérséklet, hosszú tárolási idő stb.), melyek a módosulatok esetleges átalakulásához/bomlásához vezetnek.

3.7.2 *Mintaelőkészítés teljes arzén meghatározásához*

A mintaelőkészítés elsődleges célja: a mintát olyan halmazállapotba hozni, mely az alkalmazott mérési módszerhez hozzárendelhető. Léteznek olyan technikák, melyeknél a mintaelőkészítés a minták szárítására, homogenizálására korlátozódik, és nem követelik meg a minták folyékony halmazállapotát. Ilyen mérési technika például a neutronaktivációs analízis, a grafitkemencés atomabszorpciós módszer és a lézer-ablációs technika.

Ma már nagyobb népszerűsége tett szert a porlasztásos mintabevitel, mely esetben a mintákat folyékony halmazállapotba kell alakítanunk. Teljes arzén meghatározásához feltárást alkalmazunk, melynek célja kettős: egyrészt arra törekszünk, hogy a minta szervesanyag tartalmát tökéletesen elroncsoljuk, másrészt bizonyos technikák esetében fontos, hogy az arzénmódosulatokat azonos

formába hozzuk. A minta szervesanyag-tartalmának elroncsolásával a minta folyékony halmazállapotba kerül, melyben a teljes arzénkoncentráció műszeresen mérhető.

Ha mérési módszerünk hidridképzésen alapul, lényeges, hogy az arzén milyen módosulat formájában van jelen az előkészített mintában. Ismeretes, hogy teljes feltárás során bizonyos arzénmódosulatok az erős kovelens kötések miatt nem bomlanak arzénsavvá, hanem kis méretű szerves molekulákként az oldatban maradnak. Goessler és munkatársai kimutatták, hogy MA módosulathoz $>220\text{ }^{\circ}\text{C}$, DMA módosulathoz $>280\text{ }^{\circ}\text{C}$ szükséges a vegyületek bomlásához. AB esetében a bomlás csak még erőteljesebb körülmények között megy végbe: legalább 90 percig a mintát $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ fölött kell tartani. A hagyományos – általam is alkalmazott – $100\text{--}120\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végzett roncsolás semmiképpen sem elegendő a módosulatok bomlásához. (GOESSLER, 2003) A fentiek miatt ezen esetekben a teljes arzénmeghatározáshoz használt hidridképzési technikák – HG-AFS, HG-ICP-MS vagy HG-ICP-AES – hibás eredményhez vezetnek, hiszen az oldatban maradt szerves módosulatok hidridképzési hatásfoka eltérő. Ennek ellenére még ma is találunk példát ilyen alkalmazásra a nemzetközi irodalomban. (SUN, 2005)

Napjainkra már elmondhatjuk, hogy a teljes arzéntartalom meghatározására szinte egyeduralkodóan a különböző oxisavakkal végzett, megnövelt nyomáson és hőmérsékleten lejátszódó nedves roncsolásos technikák terjedtek el. Bár az említett nagy hőmérsékletet olyan, hagyományosnak mondható módszerekkel is el lehet érni, mint a laboratóriumi nyomástartó edényzet, a mikrohullámú berendezések térnyerését nem lehet vitatni. Ez utóbbiak esetében nem csupán a mintaelőkészítési idő csökkentése, hanem nagyfokú automatizáltságuk és az akár mintahelyenként szabályozható, dokumentálható és reprodukálható paramétereik (nyomás, hőmérséklet, reflux) igazolják elterjedésüket. (DERNOVICS, 2003) A roncsolás túlnyomó részben teflonedényekben (PTFE) zajlik, melyek sav-, lúg- és hőállóak, valamint arzén szempontjából inertnek tekinthetők. Kivételt csupán a különleges, ún. blokkroncsolókban alkalmazott kvarcedények jelentik amelyek azonban nem teszik lehetővé a folyavas feltárások végrehajtását.

3.7.3 *Mintaelőkészítés az arzén módosulatanalitikában*

A teljes feltárással ellentétben a módosulatanalitikai mintaelőkészítés kifejezetten azt a célt szolgálja, hogy a mintában található As-módosulatok átalakulás nélkül kerülhessenek meghatározásra. Azonban nem ez az egyetlen különbség a két megközelítés között: a módosulatanalitikai feladatok esetében nem alapvető követelmény az összes módosulat kinyerése, bár célunk a 100%-os extrakciós hatásfok. Gyakori azonban az olyan mintatípus, amelyből nem nyerhető ki az összes módosulat. Ennek oka feltehetően az, hogy némely módosulat nagy affinitással kötődik/beépül a mintamátrixba, ezért a

szokásos „lágý” extrakciós módszerekkel nem nyerhető ki. Miért alkalmazunk „lágý” módszereket az arzénmódosulatok kinyerésére? A speciációs analitika elsődleges feladata a mintában jelen levő módosulatok azonosítása. Ezen cél eléréséhez feltétlenül szükséges, hogy a mintaelőkészítés során a komponensek ne alakuljanak át: ne szenvedjenek bomlást, ne oxidálódjanak/redukálódjanak stb. Ezáltal tehát a túl „drasztikus” beavatkozásokat kerülni kell, mivel azok könnyen változásokat idézhetnek elő a módosulatok kémiai szerkezetében. Arzén módosulatanalitikában ezért leginkább „lágý”-nak tekintett mintaelőkészítési eljárásokkal állunk szemben. Az alkalmazott pH-érték a semleges tartomány körül jellemző, a kezelés néhányórás, esetleg félnapos kevertetésben-rázatásban testesül meg, míg a kezelési hőmérsékletek a szobahőmérséklet és a 80–90 °C között mozognak. A kezelések redoxi-állapotot befolyásoló hatása az arzénnel kapcsolatos mintaelőkészítés legnagyobb kihívása. A hármás-ötös oxidációs állapot nagyon könnyen egymásba alakul, mely nem csupán a szervetlen módosulatokra jellemző – bár kétség kívül ezek nyertek a legnagyobb publicitást –, hanem a szerves arzénmódosulatok esetében is fennáll. Például MA(III) – MA(V), DMA(III) – DMA(V) kétirányú egyensúlyi átalakulások. Még fontosabbá teszi a kérdéskör tárgyalását a különböző oxidációs állapotú módosulatok nagyon eltérő toxicitása: az irodalomban a háromértékű vegyületek sokkal kisebb LD₅₀-értékeiről számolnak be. (LE, 2000b, GONG, 2002) A háromértékű metilezett származékok oxidációjával járó reakciói az általános mintaelőkészítési körülmények között néhány óra alatt végbemehetnek, így amennyiben jelenlétükre számítani lehet, különleges figyelemre van szükség. (GONG, 2001)

Az arzén módosulatanalitikában alkalmazott mintaelőkészítési módszereket elsőként a felhasznált oldószerek szerint csoportosíthatjuk. Egyéb módosulatalitikai feladatokkal (pl. szerves ónvegyületek) összevetve az arzénspeciációs mintaelőkészítést viszonylag könnyű kezdet jellemezte. A legelső minták valamennyien tengeri eredetű állatok voltak, melyekben túlnyomó többségben AB halmozódott fel. Ez a kis méretű, stabil módosulat mind vízben, mint metanolban nagyon jól oldódik, és ezen extrakciós oldószerek (esetleg elegyek) alkalmazásával minden esetben >90% kinyerési hatásfok adódott. A víz, a metanol vagy ezek bizonyos arányú elegyeinek alkalmazásáról mind a mai napig vita folyik. Kétség kívül a metanol nagy előnye, hogy (i) általa kevesebb mátrixkomponens oldódik ki, (ii) gyorsabban elpárologtatható, mint a víz, valamint (iii) amfiprotikus tulajdonságánál fogva a nem-poláris arzénvegyületeket (pl. arzenolipidek) is kivonja a mintából. Ezen előnyöket leginkább Edmonds korai munkájában használta ki, amelyben a kérdéses arzénvegyületeket több kilogram mintából nyerte ki és tisztította meg azonosítás céljából. (EDMONDS, 1993) A szerző egy másik munkájában azonban bebizonyította, hogy a metanollal végzett extrakció esetében a szervetlen arzénvegyületek kinyerhetősége sokkal kisebb, mint a víz esetén. Munkája mind a mai napig nagy vitát kavart. A

metanol esetében leggyakrabban úgy járunk el, hogy extrakciót követően a folyékony metanol fázist szobahőmérsékleten – általában vákuumban – bepároljuk, majd a bepárlási maradékot vízben oldjuk vissza. Felmerül a kérdés, hogy mi történik a metanol-oldható, de vízben nem oldható vegyületekkel (pl. arzenolipidekkel). Könnyen belátható, hogy ezáltal a metanolos extrakció fent említett harmadik előnyös tulajdonsága nem érvényesül. Másik érv, mely a víz mellett voksol, az eddig felfedezett arzénmódosulatok poláris – sokszor ionos – jellege, mely által kétség kívül jobban oldódnak vízben, mint metanolban.

Tukai és munkatársai metanol-víz oldószerkegy különböző arányait vizsgálták meg algák arzénspeciációs elemzése kapcsán. Tapasztalataik szerint az optimális metanol összetétel 56–78 v/v% között adódott mintatípustól függően. (TUKAI, 2002) Ezek szerint tehát még közel azonos mintacsoporton belül is – mindannyian algák voltak – nagy különbségek adódhatnak. Más publikációk az extrakciós hatásfok módosulatfüggéséről számolnak be. A nagyon poláris arzenocukrok esetében például a víz a leginkább ajánlott közeg.

Az 1990-es évektől, amikor megjelentek az első, szárazföldi eredetű mintákkal foglalkozó speciációs munkák, hamar nyilvánvalóvá vált a metanol/víz alapú extrakciós módszerek alacsony kinyerési hatásfoka. Az arzénfelhalmozó páfrány esetében a víz alkalmazása jobb eredményt mutatott, de ez más, növényi eredetű mintáknál nem bizonyult igaznak. (FRANCESCONI, 2002) A szárazföldi eredetű minták esetében ezidáig nem találtak ésszerű magyarázatot a sokszor nagyon alacsony (<20-30%) extrakciós hatásfokra. Megfigyelték azonban, hogy savas közegben – például trifluor-ecetsav, foszforsav – a kinyerési hatásfok szignifikánsan nagyobb. (BOHARI, 2002) Erre feltételezett magyarázatul szolgálhat a savak közreműködése az As-S kötés bontásában. A 3. táblázatban a témában íródott néhány fontos publikáció olvasható.

Az optimális kinyerés érdekében az extrakciós oldószer mellett ki kell választanunk az alkalmazandó extrakciós technikát. A 3. táblázatban látható, hogy a közkezdelt módszerek közé tartozik a rázatásos technika, az ultrahang közvetítette kivonás, a mikrohullám közvetítette kinyerés, valamint a nyomás alatt végzett extrakció. Ez utóbbi ASE (accelerated solvent extraction) néven terjedt el, mely esetében a minta egy mikrohullám által fűtött zárt edényben helyezkedik el. A mintát a folyamat megkezdése előtt inert közegben kell eloszlatni. Gallagher és munkatársai az ASE módszer alapos vizsgálatát követően azt találták, hogy a minta inhomogén eloszlatása következtében az extrakciós hatásfok változik, ezáltal a művelet nem reprodukálható. (GALLAGHER, 2001) Eredményeik alapján nem javasolták a költséges ASE arzénspeciációs alkalmazását. A különböző fizikai hatáson alapuló módszerek összehasonlításával csak néhány kutatócsoport foglalkozott. A munkák közül említésre méltó Brisbin és Caruso vizsgálata, akik TORT-2 hitelesített referenciaanyag

(homár izomszövet) arzénkinyerési hatásfokait hasonlították össze Soxhlet, rázatás, ultrahang, mikrohullám és superkritikus folyadék extrakciós módszerek esetében. (BRISBIN, 2002) Bár módosulatanalitikát nem végeztek – ezáltal a módosulatok esetleges átalakulása, bomlása nem zárható ki –, mégis érdekes eredményről számoltak be. A szuperkritikus folyadék-extrakció kivételével minden technika szinte 100%-os hatásfokot eredményezett. Megjegyzem, hogy a TORT-2 minta magas arzenobetain-tartalma miatt az eredmény logikus. A szárazföldi/édesvízi eredetű minták alacsony kinyerési hatásfokát ismerve sokkal fontosabb lenne a kísérletet ezen minták valamelyikén újból elvégezni.

A fent említett „lágú” módszerek talaj- és üledékmintákból csak kis mennyiségű (tipikusan <5%) arzént képesek kioldani. Inkább elterjedtek az ún. klasszikus frakcionálásos technikák, melyek esetében növekvő ionerősség/pH/redox potenciál felelős az egyre nagyobb arányú kinyerésért. (TEMPLETON, 2000) A módszer segítségével az arzén mintamátrixhoz való kötődésének erőssége is becsülhető. Talajminták esetében arzénspeciációs célra a gyenge savas közegű extrakció terjedt el, mely esetben a kinyerési hatásfok jobb, mint metanol vagy víz esetében, de a specieszek oxidációs aránya még a mintára jellemző marad.

3.táblázat Arzénspeciációs analízishez használt extrakciós módszerek összefoglalása (FRANCESCONI, 2004)

Extrakciós oldószerek	Extrakciós módszer					
	Rázatás	Ultrahangos fürdő	Mikrohullám-közvetítette melegítés	Szuperkritikus folyadék extrakció	ASE	Soxhlet
víz	Bohari,2002 Montperrus,2002	Bohari,2002 Caruso,2001 Pizarro,2003	Bohari,2002 Brisbin,2002	Brisbin,2002	Schmidt,2000 Gallagher,2001 Heitkemper,2001	Brisbin,2002
metanol		Gomez-Ariza,2000b	Gomez-Ariza,2000		Heitkemper,2001 Vela,2001	Gomez-Ariza,2000b Brisbin,2002
metanol/víz elegyek	Soeroes, 2005a Bohari,2002 Kuehnelt,2001	Bohari,2002 Caruso,2001 Heitkemper,2001	Vilano,2001 Bohari,2002 Tukai,2002		Schmidt,2000 Gallagher,2001 Heitkemper,2001	Gomez-Ariza,2000b
ionos oldószerek	Kuehnelt,2001 Heitkemper,2001	Bohari,2002 Caruso,2001 Milstein,2003	Bohari,2002 Montperrus,2002			
enzimek	Caruso,2001 Heitkemper,2001	Milstein,2003				
egyéb		Milstein,2003	Yehl,2001	Brisbin,2002		

3.7.4 Az extraktumok tisztítása

Az extraktumok tisztítása nem általános gyakorlat. Ennek magyarázata az, hogy a módosulatok szerkezetének megőrzése érdekében célszerű a mintákkal kapcsolatos kezeléseket minimalizálni. A tisztítási műveletek célja a zavaró mátrixkomponensek koncentrációjának csökkentése lenne azzal együtt, hogy a módosulatok változás nélkül, az eredeti mintához hasonló arányban és azonos

mértékben dúsuljanak. Ezeket az elvárásokat szinte lehetetlen teljesíteni. A „mátrixmentesítés” legyegeyszerűbb módja tulajdonképpen az analízis közben történik, mégpedig az elválasztás során. A kromatográfiás módszerek az ionos állapotú arzénvegyületek szelektív visszatartását eredményezik, ezáltal az apoláros, illetve a részecskékhez nem hozzáférő nagymolekulák visszatartás nélkül hagyják el az oszlopot. Ez a nagy hatásfokú szelekció sok segítséget nyújt az analitikusnak. Ez okból tehát az a kifejezés, mely szerint „a kromatográfia a kapcsolt analitikai technika része”, helytelen. Szerepe sokkal inkább komplex: mind a mintaelőkészítésben, mind az analízisben fontos feladatot lát el. Sőt, az utóbbi években a mintatisztításban betöltött szerepe felértékelődött: mátrixérzékeny detektálás (pl. ESI-MS/MS) esetében többdimenziós kromatográfiás elválasztást végeznek a vizsgálandó vegyület tisztítása érdekében. Ez esetben a kromatográfiás módszerek mindegyike más kémiai/fizikai folyamat alapján választja el a komponenseket (pl. fordított fázis, ioncsere, méretkizárás stb.), miáltal a tisztítás vegyületspecifikus.

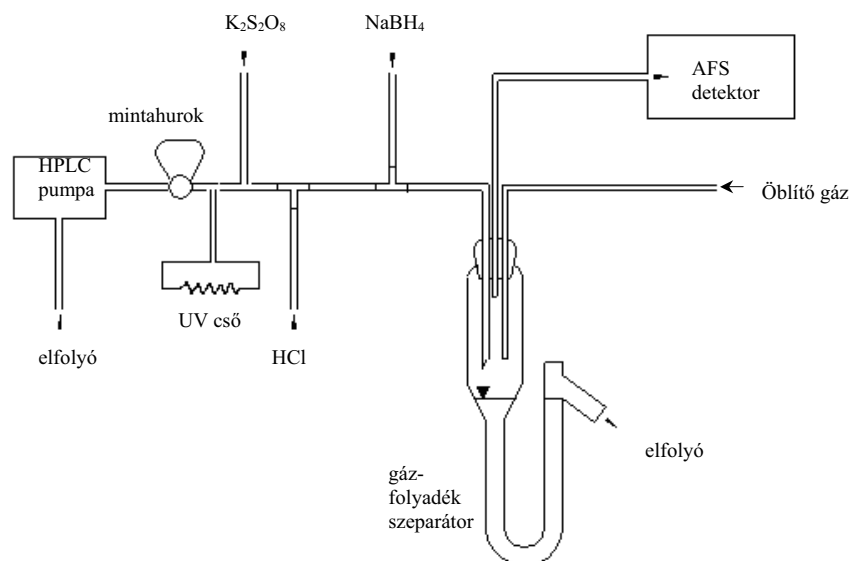
3.7.5 Arzénspeciációs analitikai rendszerek

A minőségi és mennyiségi arzénanalitika az 1830-as évekhez vezethető vissza. A skót törvényszéki kémikus, dr. Marsh arzénmérgezést gyanított egy fontos gyilkossági ügyben. Ezt a gyanút meggyőző bizonyítékok hiányában a bíróság elutasította. Az ítélet azonban olyannyira sértette a professzor szakmai büszkeségét, hogy azonnal nekilátott egy új, az arzén illékony vegyületté átalakításán alapuló érzékeny analitikai módszer kifejlesztésének. Az ún. Marsh-próba nagyban elősegítette az arzénnel kapcsolatos környezeti, biológiai és toxikológiai kutatások fejlődését.

A téma „második fejezete” 1973-ban kezdődik, amikor Braman és Foreback oly módon adaptálta a Marsh-módszert, hogy azzal már megkülönböztethetővé váltak az egyszerű metilált arzénvegyületek és a szervetlen arzén. Ez a módszer már a speciációs arzénanalitika kezdetét képviseli, ami a természetes vizek analitikájában hamar elterjedt. Később a módszert kiterjesztették vizelet arzénmetabolitjainak meghatározására, mely által az arzénmetabolizmus kutatásának fontos eszközévé vált. A legtöbb esetben az elégtelen kimutatási határból eredő gondokat azáltal küszöbölték ki, hogy a keletkezett illékony módosulatokat kriogén csapdába juttatták, melyből a vegyületek illékonyaságuk függvényében szabadultak ki – hiszen forráspontjuk különbözik –, majd az atomabszorpciós detektorba kerülnek. Nem sokkal később világossá vált, hogy a hidridképzéses technika nem alkalmas a biológiai mintákban dominánsan előforduló arzénmódosulatok vizsgálatára. Más, nem az illékonyaságon alapuló elválasztástechnikai módszert kellett keresni. Annak ellenére, hogy viszonylag gyorsan megfelelő felbontású HPLC-s módszereket fejlesztettek az arzénvegyületek elválasztására, a módszerek szokványos optikai detektorhoz (AAS, AES) kapcsolása a kimutatási határ miatt nem hozta meg a

várva várt eredményt. Az 1980-as évektől a helyzet változott: kereskedelmi forgalomba kerültek az első ICP-MS készülékek, melyek mint kapcsolt detektorok hamar elterjedtek. Ettől fogva a HPLC-ICP-MS technikák nagy lehetőséget kínáltak az arzén speciációs analitikájában: a jó felbontású elválasztást érzékeny detektálás követte. Manapság a HPLC-ICP-MS a legelterjedtebb műszerkapcsolás az arzénanalitikában.

Az 1980–90-es években a kisebb költségigényű optikai (AAS, AES, AFS) módszerek is sokat fejlődtek. A hagyományos porlasztással szemben mutatott előnyei miatt a hidrid származékképzés a speciációs rendszer fontos része maradt. A hidrid módosulatokat savas közegben, NaBH_4 -del végzett „on-line” kémiai reakcióval állíthatjuk elő. A hidridképzés nagyon jó eszköz arra, hogy a mintában található hidridaktív elemeket/vegyületeket a mátrixtól elválasszuk. Ez a folyamat folyadék-gáz szeparátorral oldható meg, mely csupán a gázfázist – az illékony módosulatokkal együtt – juttatja az optikai detektorba. A technika fejlesztésével bővült a meghatározható vegyületek száma: elválasztást követően a nem hidridaktív molekulákat kémiai reakció közvetítette bontással hidridaktívvá tették. A kémiai reakció leggyakrabban foto-oxidáció (UV-besugárzás – oxidáció, rövidítve: PO), mely tulajdonképpen egy „on-line” roncsolásnak is tekinthető, melynek következtében a módosulatok egységesen hidridképző formává alakulnak. Ezt a műszerösszeállítást mutatom be az 5. ábrán. A detektorok közül az AFS technika bizonyult a leghatásosabbnak, mely kimutatási határa a fenti műszercsatolásban összevethető a nagyságrendekkel költségesebb ICP-MS módszerrel. Az atomfluoreszcens detektálás további előnye a nagy szelektivitás, melyet a vájtkatód-lámpa monokromatikus gerjesztő fényalábján kívül a szinte zavarásmentes késleltetett emisszió tesz lehetővé.



5.ábra HPLC-PO-HG-AFS rendszer sematikus vázlata

Az 1990-es évektől a molekuláris tömegspektrometria mint új detektálási lehetőség egyre nagyobb szerepet kap az arzénspeciációs analitikában. Érdekes módon a Sui és munkatársai által viszonylag korán publikált elektropray-tömegspektrometriás technika, mely a szerves arzénvegyületek azonosításában kiválóan alkalmazható módszernek bizonyult, nem keltette fel a tudóstársadalom érdeklődését. (SUI, 1988) Csak később, 1996-ban, Corr és Larsen munkája hatására javult a technika népszerűsége, mely azóta is töretlen. (CORR, 1996) A molekuláris oldalról való megközelítés elsősorban szokatlannak tűnik, hiszen eddig elem-specifikusan detektáltak, ahol az ionforrásban a molekulák disszociálnak. Emiatt a módosulatok azonosítása az elválasztástechnika segítségével, retenciós idő alapján történik. Ez esetben tehát megfelelő tisztaságú standard vegyületekre van szükségünk, mely nem minden esetben áll a rendelkezésünkre. Szerencsés esetben például új, eddig ismeretlen arzéntartalmú vegyület megfelelő visszatartással rendelkezvén elválik az ismert arzénmódosulatoktól a kromatográfiás oszlopon, ezáltal a detektorban a 75-ös tömegszámnál jelet ad. A molekula szerkezetéről azonban nincs ismeretünk, hiszen az ionforrásban ezek a jellemzők elvesznek. A szerves tömegspektrometria ezen esetekben nyújt kiváló megoldást, hiszen a készülékek ionforrása megfelelően „lágymód” ahhoz, hogy a molekulákat eredeti formájában hagyja. A molekulatömeg, valamint a fragmensmintázat alapján a szerkezeti képlet megismerhető. Más esetben az ismeretlen molekulák nem választhatók el az alkalmazott kromatográfiás módszerrel valamelyik ismert arzénmódosulattól, ezáltal a konvencionális elem-specifikus detektorok nem mutatják ki az „idegen molekula” jelenlétét. Ekkor a

több-komponensű kromatográfias csúcs szerves tömegspektrométer alkalmazásával molekulaszелеktivén detektálható. Mivel a szerves MS készülékek kimutatási határa jelenleg alulmarad a szervesetlen detektálási módszerekhez képest, a módszer leginkább a minőségi analitikában jelent nagy előrelépést, a mennyiségi meghatározás még mindig sokkal megbízhatóbb elemi alapon (pl. ICP-MS-sel).

A fentiekben tehát láttuk, hogy két feltételnek kell teljesülni az arzénmódszerek meghatározására alkalmazott módszerek esetében: (i) a különböző arzénvegyületeket egymástól el kell választanunk, valamint azokat (ii) kémiai vagy fizikai tulajdonságuk alapján detektálnunk szükséges.

Az alábbiakban felsorolom azokat a technikákat, csatolt rendszereket, melyekkel az arzénspeciációs gyakorlatban találkozhatunk. (FRANCESCONI, 2004)

- Spektrofotometriás módszerek (ABBAS, 2003)
- Kémiai/fizikai elválasztás (frakcionálás) (SHUVAEAVA, 2002, BISSEN, 2000, HINWOOD, 2003)
- HPLC-AES
- HG-(CT)GC-AAS és HG-(CT)GC-AFS
- HPLC-HG-AAS és HPLC-HG-AFS (VILLA-LOJO, 2002, GONZALEZ, 2003, DEVESA, 2001)
- HPLC-PO-HG-AAS és HPLC-PO-HG-AFS (SÖRÖS, 2003)
- HPLC-ICP-AES
- HPLC-ICPMS (FRANCESCONI, 2004)
- HPLC-HG-ICPMS (GARCIA-MANYES, 2002, GOMEZ-ARIZA, 2000a)
- GC-MS (GRÜTER, 2000, KILLELEA, 2002)
- HPLC-ESI-MS és HPLC-ESI-MS/MS (SANCHES-RODAS, 2002, MADSON, 2000)
- CE-UV (NAIDU, 2000)
- CE-MS (KOELLENSPERGER, 2002)
- Röntgenspektroszkópiás módszerek (LANGDON, 2002)

3.7.6 Elválasztástechnikai módszerek az arzénspeciációban

A ma még túlnyomó többségben elem-specifikus detektáláson alapuló kapcsolt technikák esetében alapvető feltétel a komponensek jó felbontású elválasztása. Ehhez zömmel HPLC-s módszereket használunk, az elválasztási paraméterek kiindulási alapjául pedig az arzénvegyületek kémiai tulajdonsága szolgál.

3.7.6.1 Az arzénvegyületek kémiája

Az arzénvegyületek kémiai szerkezetéből adódóan (4. táblázat) azok egy része Brönsted-savként viselkedik, azaz proton leadására képes vegyület (HA); a folyamat disszociációs állandója K_a :

$$K_a = \frac{[H^+] \times [A^-]}{[HA]}$$

A savak erősségének kifejezésére a pK_a szolgál, mely az adott vegyület disszociációs állandójának negatív logaritmus: $pK_a = -\lg K_a$. A munkám során vizsgált arzénkomponensek pK_a -értékei a 4. táblázatban találhatók. (LARSEN, 1993b)

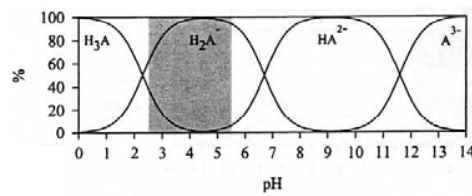
4.táblázat A vizsgált arzénkomponensek pK_a -értékei

Komponens	Módszerek disszociációja	pK_a
Anionos komponensek		
arzénsav	$H_3AsO_3 \leftrightarrow H_2AsO_3^- + H^+$	9.2
	$H_2AsO_3^- \leftrightarrow HAsO_3^{2-} + H^+$	13.5
	$HAsO_3^{2-} \leftrightarrow AsO_3^{3-} + H^+$	14.0
arzénessav	$H_3AsO_4 \leftrightarrow H_2AsO_4^- + H^+$	2.3
	$H_2AsO_4^- \leftrightarrow HAsO_4^{2-} + H^+$	6.7
	$HAsO_4^{2-} \leftrightarrow AsO_4^{3-} + H^+$	11.6
MA	$CH_3AsO_3H_2 \leftrightarrow CH_3AsO_3H^- + H^+$	3.6
	$CH_3AsO_3H^- \leftrightarrow CH_3AsO_3^{2-} + H^+$	8.2
DMA	$(CH_3)_2AsO_2H \leftrightarrow (CH_3)_2AsO^{2-} + H^+$	6.2
Kationos komponensek		
TMAO	$(CH_3)_3As^+OH \leftrightarrow (CH_3)_3AsO + H^+$	3.6
AB	$(CH_3)_3As^+CH_2COOH \leftrightarrow (CH_3)_3As^+CH_2COO^- + H^+$	2.2
AC	$(CH_3)_3As^+(CH_2)_2OH$	állandó kation
TETRA	$(CH_3)_4As^+$	állandó kation

Látható, hogy az arzénsav, az arzénessav és az MA esetében a disszociáció több lépésben megy végbe. A trimetilált AB molekula protonált állapotban kation, de ha a karboxilcsoport deprotonálódik, ikerionos szerkezetű alakul. Az AC és a TETRA szintén tri-, illetve tetrametilált arzénkomponensek, melyek további proton felvételére vagy leadására nem képesek, ezáltal állandó kationok. Adott pH-n az ionizált állapotban levő módosulat százalékos arányát a pK_a ismeretében az alábbi képlet segítségével számíthatjuk.

$$\%_{ionizált} = \frac{100}{1 + 10^{(töltés - pH - pK_a)}} \quad (\text{A töltés savak esetében } -1, \text{ bázisok esetében } +1.)$$

Példaképpen az arzénsav különböző pH-n mutatott disszociációját mutatom be. (6. ábra). (KUEHNELT, 2000)



6. ábra Az arzénsav disszociációja

Látható, hogy az első görbe ($H_3A \leftrightarrow H_2A^- + H^+$) inflexiós pontja a pK_{a1} -gyel azonos pH értéken van (2.3), ahol a teljesen protonált és az egyszeresen deprotonált formák 50-50%-os jelenléte tapasztalható. Az inflexiós pont feletti pH-értékeken (szürkére színezett tartomány) a deprotonált alak előfordulása dominál, mely a pH növelésével újra protont veszít (HA^{2-}). Végül, $pH=11.6$ felett (pK_{a3}) többnyire a háromszorosan deprotonált alak jelenléte figyelhető meg. Ezek a folyamatok hasonlóan levezethetők a többi arzénmódosulat esetében is.

3.7.6.2 Kromatográfiai módszerek

A módosulatok kémiai tulajdonságából adódóan elválasztásukra olyan kromatográfiai rendszer alkalmas, mely közöttük az ionos jellegükben való eltérés alapján tesz különbséget. Ezen kromatográfiai rendszerek közé sorolhatók az ioncserés és az ionpároképzős kromatográfiai technikák.

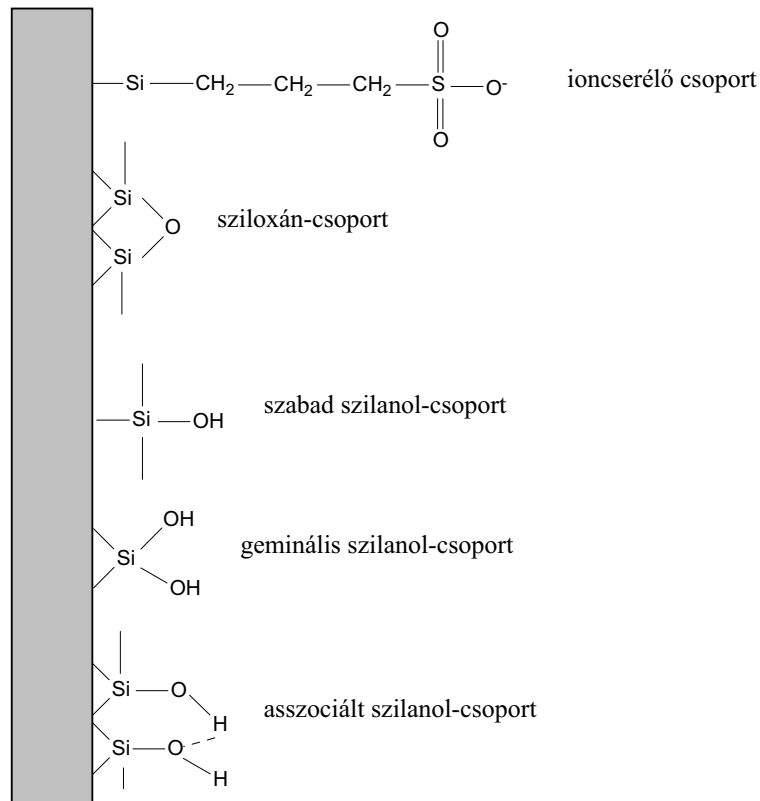
3.7.6.2.1 Álló fázisok az ioncserés kromatográfiában

Az ioncserés (IC) kromatográfia az ionok vagy könnyen ionizálható vegyületek elválasztására használatos módszer, melynek széleskörű alkalmazásával találkozhatunk a kémia minden területén. Legnagyobb térhódítást a klinikai kémiában ért el, azon belül is az aminosavak és más fiziológiásan fontos aminok rutinszerű, automatizált meghatározásában, mely az anyagcsere-betegségek korai felismerésében nyújt hasznos információt. Az 1980-as évektől gyors fejlődés mutatkozott az ioncserére alkalmas stabil, nagy felbontóképességű állófázisok kialakításában. (COLIN, 1991) A kationcserélő fázisokra általánosságban jellemző, hogy felületükön anionos jellegű funkciós csoportok találhatók (például szulfonát, karboxilát, hidrogén-foszfát ionok). Anioncserélő fázisok esetében az aktív kötőhelyek pozitív töltéssel bírnak. Ilyenek például a tetra-alkil-ammónium-csoport, vagy az aminok.

Az állófázisok szilikagél vagy szerves polimer szerkezetű anyagból épülhetnek fel, melyek felületén helyezkednek el az aktív csoportok (kötőhelyek). Fontos kiemelni a kétféle fázis közötti különbségeket.

A makropórusos szilikagél a leggyorsabban fejlődő állófázis a modern kolonnatechnológiában. Nátriumszilikát savas hidrolízisével állítják elő, majd kondenzációval poliszilánsav polimer keletkezik melyet a technológiától függően különböző részecskeméret jellemez. Idővel a kolloidos szilikarészecskék között sziloxán-kötések alakulnak ki, majd további dehidratációval a fázis gellé alakul. (COLIN, 1991) A szilikagél állófázisokat ritkán alkalmazzák módosítatlan formában, többnyire a fázist hosszú szénláncot tartalmazó alkil-szilánnal és/vagy poláris csoportok bevitelével utószilanizálják. Az ioncserére alkalmas kolonnák esetében a szilikagél polimerre ionos funkciós csoportokat kapcsolnak, melyekhez ellenionok kötődnek. Bár elsődleges cél a felület minél homogénebb lefedettsége, mégis ez szilikagél esetében ritkán teljesül. A felületen maradó el nem reagált szabad és geminális szilanol-csoportok, sziloxán-csoport stb. nagyban befolyásolhatják a felületen lejátszódó kémiai folyamatokat. A szilikagél fizikai-kémiai tulajdonságaiból adódóan ez a típusú állófázis mechanikailag nagyon stabil (nyomásállósága 1000 bar is lehet), azonban a szilikagél oldhatósága miatt pH=7-8 felett már nem használható. (COLIN, 1991) Ezzel a ténnyel magyarázható, hogy az ioncserés kromatográfiában a szilikagél alapú állófázisokat többnyire kationcserés célra alkalmazzák, hiszen ebben az esetben savas pH beállításával biztosítható a vizsgált komponensek kationos állapota.

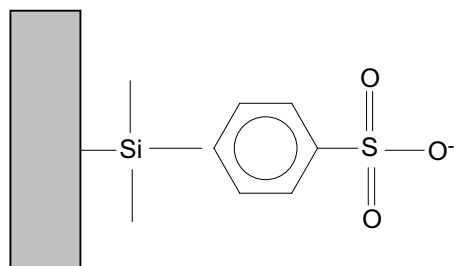
A 7. ábrán egy - a munkám során is alkalmazott - szilikagél alapfázisú kationcserélő kolonna felületének sematikus rajzát mutatom be. A kolonna aktív funkciós csoportját szulfonsav alkotja, mely propil-lánc segítségével kapcsolódik a szilikagélhez. Ez az állófázis pH = 2 és 7.5 között stabil, alacsonyabb pH esetén a funkciós csoportok lehasadnak a felületről.



7. ábra A Supelcosil LC-SCX kationcserelő állófázis felületének sematikus rajza

Az ionos aktív helyeken kívül geminális és szabad szilanol-csoportok, asszociált szilanol csoport, valamint sziloxán-csoport is megjelenik a felületen. Ezek a „másodlagosan aktív helyek” nagyban befolyásolhatják az elválasztási folyamatokat, gondoljunk a savas jellegű szilanol-csoportra, mely lúgos pH-n ($\text{pH} > 10$) maga is anioncserelő felületként működhet. A szilanol-oxigén és a mintavegyületek között az ionosnál jóval gyengébb hidrogén-híd kölcsönhatás is kialakulhat. A kromatográfiai retenciós folyamatok értelmezése mögött sok esetben ezek a kevert kölcsönhatások állnak, melyek által a mérések kevésbé reprodukálhatóak.

Ugyanezen célra szolgál egy új fejlesztésű, ugyancsak szilikagél alapú kationcserés kolonna, mely Zorbax 300-SCX néven kerül kereskedelmi forgalomba. Ez esetben a szulfonsav aktív kötőhely aromás gyűrű közvetítésével kapcsolódik a gélhez (8. ábra). Az aromás csoport szterikus okból kedvezőbb, hisz kisebb helyigénye miatt nagyobb lefedettség érhető el.

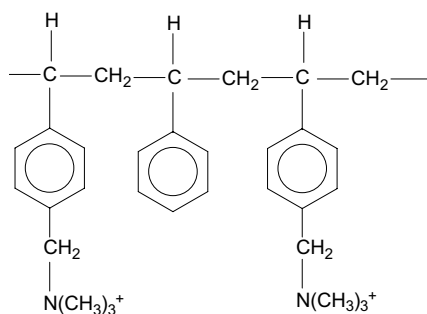


8. ábra A Zorbax 300-SCX kationcserélő állófázis felületének sematikus rajza

A fentiek mellett a gyártók trifunkcionális organoszilán reagenssel egységesítették a felületet, miáltal a szilanol-csoportok zavaró jelenlétére kevésbé kell számítani.

Az ioncserére alkalmas állófázisok másik nagy csoportját a szerves polimer alapú töltetek alkotják. A polimer vinil-csoportot tartalmazó aromás monomerek polimerizációjával jön létre, mint például a sztírol-divinilbenzol kopolimer. Az ioncserére alkalmas felületet kémiai reakcióval alakítják ki. Az aromás vázszerkezet miatt ez a fázis nem jellemezhető olyan nyomásállósággal, mint a szilikagél, 300-400 bar felett a töltet összepréselődik. Másfelől, az egységesebb felületnek köszönhetően kémiaiilag homogénebb kolonnák kialakítása válik lehetővé, mely sokkal szélesebb pH-tartományban használható (pH= 1-14), élettartama is hosszabb a szilikagélnél, ennél fogva ára is meghaladja azt. (COLIN, 1991) Polimer alapú állófázisok mind kation-, mind anioncserés kromatográfiás célra vásárolhatók.

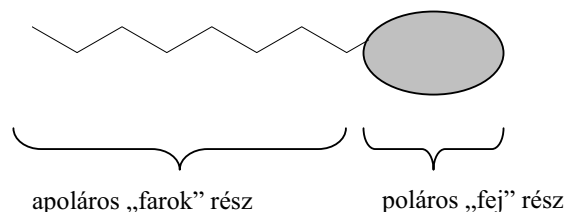
A 9. ábrán egy – munkám során is használt – szerves polimer alapú anioncserés kolonna felületi rajzát mutatom be. A polisztirol-divinil-benzol kopolimerhez kapcsolt trimetil-ammónium kationos funkciós csoportok vesznek részt az anionos komponensek visszatartásában. A felülettel, a korábbiakban leírt előnyéből adódóan, az elválasztás jól reprodukálható, valamint a szilikagéllal ellentétben lúgos pH-nak is ellenáll.



9. ábra A Hamilton PRP-X-100 anioncserélő állófázis felületének sematikus rajza

3.7.6.2.2 Álló fázisok az ionpárképző kromatográfiában

Az ionpárképző (IP) kromatográfia az inoecserénél olcsóbb alternatívát kínál az ionos/könnyen ionizálható vegyületek elválasztására. Az ionpárképzés elmélete extrakciós technikára vezethető vissza, amikor a vízben oldódó ionos komponenseket ionpárképző reagens segítségével rázzák át a vízzel nem elegyedő folyadékfázisba. Az ionpárképző reagens például egy felületaktív molekula lehet, mely hosszú apoláris „farok” részből – általában alkillánc –, valamint ionos „fej” részből áll (10. ábra)



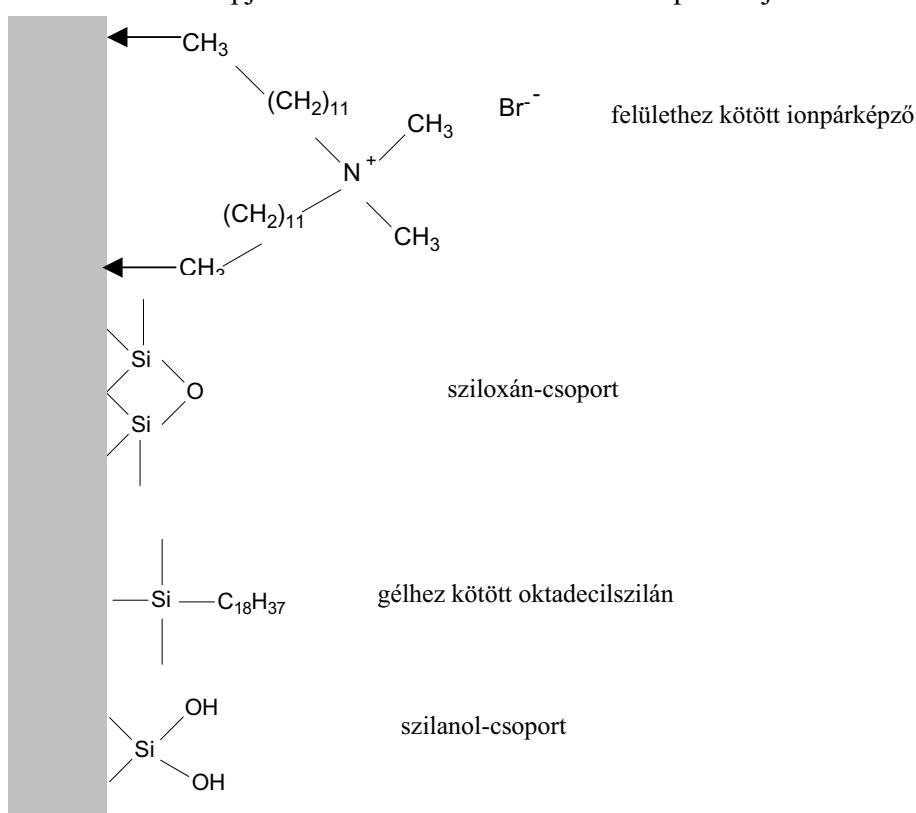
10. ábra Ionpárképző molekula sematikus rajza

A poláris rész a vizsgálandó ionokkal ionpárt képez, amely ionpár az apoláris rész jelenlétében fogva apoláris fázisokhoz kötődik. A módszert Schill és munkatársai adaptálták a folyadékkromatográfiába és kidolgozták az ionpárképzős kromatográfiás technikát (SCHILL, 1974). A kezdetben fejlesztett módszerek legnagyobb előnye az volt, hogy a mozgófázisban kialakuló ionpárok előnyösebb detektálási tulajdonságokkal rendelkeztek, mint maga a vizsgálandó ion. Ma a legnagyobb népszerűséget a fordított fázisú IP kromatográfia érte el, melyben az állófázis az apoláris felülettel rendelkező fordított fázisú szilikagél, az ionpárképző reagenst pedig a mozgó fázis tartalmazza. Az ionpárképző reagens kiválasztásában a legfontosabb szempont a molekula töltése, ugyanis ettől függ, hogy bázisos vagy savas jellegű minták elválasztására válik lehetőség. Erős és gyenge savak elválasztására általánosságban kvaterner aminokat alkalmaznak, mint például a palmitiltrimetilammónium ionokat. Bázisok elválasztására alkil- vagy aril-szulfonátok a legalkalmasabb ionpárképző vegyületek. Általánosságban elmondható, hogy a vizsgálandó minta retenciója az ellentétes töltésű ionpárképző molekula apoláris lánc hosszának növelésével nő. A mai értelmezésben kétféle elmélettel magyarázzuk a vizsgálandó ionok retencióját az IP kromatográfiás állófázisokon. (COLIN, 1991)

Az első elmélet az ún. ionpár modell, mely szerint az ionpár képződés (az ionpárképző reagens és a mintaionok között) az eluensben történik, majd a kialakult ionpár apoláris részénél fogva az állófázishoz kötődik. Az ionpár disszociációja következtében a vizsgálandó ionok disszociációs állandójuk függvényében hagyják el az állófázist.

A dinamikus ioncsere modell szerint a fordított fázisú állófázis tulajdonképpen ioncserélőként funkcionál, melyhez már előzetesen az eluensben található ionpárképző reagensek abszorbeálódtak. Ezáltal a fázis felületén aktív ioncserére alkalmas funkciós csoportok alakulnak ki, mely az ioncserélő kromatográfia elvén tartja vissza a vizsgálandó ionokat.

A 11. ábrán egy ioncserélő reagenssel módosított fordítottfázisú kolonna felületének sematikus rajza látható. Az ionpárképző reagens ez esetben didodecil-dimetil-ammónium-bromid (DDAB), mely apoláros alkiláncával kölcsönhatásba lép a fordított fázisú kolonna felületével. A molekula kvaterner ammónium vegyület, az elválasztandó anionok a pozitív töltésű szerves molekulával képeznek ionpárt. A dinamikus ioncsere modell alapján a felületet a 11. ábra szerint képzelhetjük el.



11. ábra Ioncserélő reagenssel módosított fordítottfázisú kolonna felületének sematikus rajza.

Látható, hogy az ionpárképző molekula nagy mérete miatt a fázis lefedettsége nem tökéletes, további, ún. másodlagosan aktív helyek maradnak a felületen (pl. szilanol-csoportok), melyek bizonyos esetekben további ioncserélő csoportokként működhetnek, és a szabadon maradt oktadecil-szilán oldalláncok az apoláris komponensek nagyobb visszatartását eredményezhetik. Ezek a jelenségek a korábban leírtakhoz hasonlóan szignifikáns mértékben befolyásolhatják az elválasztást.

A fentiek alapján tehát látható, hogy az IC és az IP kromatográfia egymás analógjai, de az oszlopköltséget figyelembe véve ez utóbbi lényegesen olcsóbb technika. További eltérés adódhat az állófázis különbözősége miatt is. Például, a szilikagél alapfázisnak (IP) nagyobb a nyomásállósága viszont kisebb pH-tartományban használható, mint a szerves polimer (IC) fázisok. Mivel az ionpár kromatográfia esetén magunk alakítjuk ki az állófázisok aktív kötőhelyeit, sztérikus okokból a lefedettség nem lehet teljes, ezáltal a szabadon maradó apoláris kötőhelyeknek köszönhetően szimultán elválaszthatók a semleges, valamint az ionos csoporttal rendelkező molekulák. Ez a tulajdonság azonban hátrányként is megjelenhet, hiszen a kevésbé alapos lefedettség következtében a kolonna elválasztási kapacitása kisebb. Az ionpárpépző kromatográfiai módszer sokkal rugalmasabb a rögzített felülettel rendelkező ioncseréhez képest, hiszen az ionpárpépző reagens változtatásával – akár mennyiségi, akár minőségi – a felület sajátosságai eltérnek. Másfelől viszont az ionpárok felületi kötődése gyenge (abszorpció) kölcsönhatáson alapul – szemben az ioncserélő fázisokkal, ahol kémiai reakcióval viszik fel az ionos csoportokat a fázisra –, ezáltal a deszorpcióból adódó aktivitáscsökkenés kevésbé reprodukálható kromatogramokat eredményez (pl. erős mátrixhatás esetén).

3.7.6.2.3 *Mozgó fázisok az ioncserés kromatográfiában*

Az ioncserés elválasztás elektrosztatikus kölcsönhatáson alapul, mely a mozgó fázis ionjai (akár az eluens ellenionjai vagy a vizsgálandó ionok) és az állófázis ellentétesen töltött ionos felülete között játszódik le. Az eluens ionjai (ellenionok) és a mintaionok között versengés alakul ki az álló fázis aktív helyeiért. Az elválasztási folyamat során az állófázishoz kötött mintainok affinitásuk függvényében hagyják el a kolonnát, ezáltal időben késleltetve detektorjelet adnak. Ez az elmélet azonban nagyban leegyszerűsíti a valós retenciós folyamatokat. Az ioncserés kromatográfiában a retenciót több más, a Coulomb-erőktől független folyamatok is befolyásolják. Az előbbieken vázoltam, hogy heterogén felületű állófázisok esetében hidrogénhid, esetleg komplex, valamint apoláris szorpciós kölcsönhatás is kialakulhat a vizsgálandó molekulák és a töltet között. A kölcsönhatások létrejötte azonban leginkább a mozgó fázis összetételének változtatásával befolyásolható.

Az optimális kromatográfiai felbontáshoz szükséges mozgófázis összetétel megválasztására számos elmélet született, melyek közül dolgozatomban az ún. „retenciós modellt” teszem közzé. (COLIN, 1991) A retenciós modell az ioncserés folyamatok matematikai leírásával foglalkozik, kizárólag elektrosztatikus kölcsönhatásokat véve alapul, miáltal csak megközelítőleg alkalmazható. Az egyenlet abból indul ki, hogy az állófázis aktív centrumaihoz kötött mintaionok és ellenionok között egyensúlyra vezető reakció játszódik le:



ahol 'A' és 'E' a mintaion, valamint az ellenion, 'y' és 'x' a mintaion és az ellenion koncentrációi, 'x' és 'y' a mintaion és az ellenion töltései, 's' az állófázist, 'm' a mozgó fázist jelöli. Az összefüggéssel megadható az egyensúlyi állandó:

$$K_{A,E} = [A_s^x]^y [E_m^y]^x / [A_m^x]^y [E_s^y]^x \quad (2)$$

A ' $K_{A,E}$ ' egyensúlyi állandót szelektivitási koefficiensnek is nevezzük, mely az állófázis mintaionra kifejtett affinitását fejezi ki az ellenionokkal szemben. A mintaion megoszlását az álló és a mozgó fázis között a megoszlási koefficiens írja le:

$$D_A = [A_s^x] / [A_m^x], \quad (3)$$

melyből számolható a kapacitás faktor:

$$k_A = D_A w / V_m, \quad (4)$$

ahol a 'w' az álló fázis tömege, 'V_m' a mozgó fázis térfogata. A (3) és a (4) egyenletet a (2) egyenletbe helyettesítve megkapjuk az alábbi összefüggést:

$$K_{A,E} = (k_A V_m / w)^y ([E_m^y] / [E_s^y])^x. \quad (5)$$

Az ioncserés kromatográfiában általánosságban elmondható, hogy a mintaion A^x koncentrációja az E_s^y-nál nagyságrendekkel kisebb, ezért ez utóbbi Q/y-nal helyettesíthető, ahol a Q az álló fázis ioncserélő kapacitása.

Az E_s^y-t behelyettesítve az (5) egyenletbe és az egyenletet a kapacitási faktorra rendezve a (6) összefüggést kapjuk:

$$k_A = w/V_m (K_{A,E})^{1/x} (Q/y)^{x/y} [E_m^y]^{-x/y} \quad (6)$$

Az egyenlet alapján elmondható, hogy a kapacitási faktor, mely a retenciót közvetlenül befolyásoló mutató, függ a szelektivitási koefficiensről ($K_{A,E}$), az állófázis ioncserélő kapacitásától (Q/y), az állófázis és a mozgófázis mennyiségének arányától (w/V_m) és az eluens ellenionjának koncentrációjától (E_m^y). A $K_{A,E}$, Q vagy a w/V_m növelése nagyobb visszatartást eredményez, míg $[E_m^y]$ növelésével kisebb kapacitási faktorhoz, azaz kisebb retencióhoz jutunk. Az eluens ionjainak töltésének növelése

(y) csökkenő kapacitáshoz, a mintaion nagyobb töltése (x) viszont nagyobb kapacitáshoz vezet. A fenti összefüggések csak akkor érvényesek, ha a mozgó fázisban egyféle ellenion található. Ez azonban ritkán fordul elő; többnyire poliprotikus savak sói használatosak az ionkromatográfia puffereinek előállításához, mint például a $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ rendszer. A retenciós elmélet ezekben a pufferrendszerekben lényegesen bonyolultabb egyenletekkel írható le, melyre a jelen munkában nem térek ki. Szabályként elmondható, hogy a többértékű ionok erősebben kötődnek az ellentétes töltésű állófázishoz, mint az egyértékű ionok, az azonos töltéssel bíró molekulák közül pedig a retenció csökken a növekvő hidratált ionrádiusszal.

Az analitikai kromatográfiában általánosságban igaz, hogy a matematikai egyenletek, bár segítenek az optimális álló- és mozgófázis kiválasztásában, a rendszerek összetettsége miatt a tapasztalati úton szerzett tudás nyújt legtöbb segítséget a módszerfejlesztésben. Bizonyos paraméterek – mint az ionerősség, a pH, a hőmérséklet, az áramlási sebesség és esetlegesen a mozgó fázis szerves oldószer koncentrációja - retenciót befolyásoló hatása ismert, melyet az 5. táblázatban mutatok be. (COLIN, 1991)

5. táblázat A mozgó fázis paramétereinek retencióra kifejtett hatása ioncserés elválasztás esetén

Mozgó fázis paraméter	A paraméter által befolyásolt tulajdonság	A mintaion retenciójára kifejtett hatás
ionerősség	oldószer elúciós erőssége	Növekvő ionerősséggel általában nő az oldószererősség, ezáltal csökken a retenció. A szelektivitás az ionerősséggel csak kevésbé befolyásolható.
pH	oldószer elúciós erőssége	Növekvő pH kationcserés kromatográfia esetén a retenció csökkenését, anioncsere esetében növekedését eredményezi.
	oldószer szelektivitása	Kis mértékű pH-változás is nagy hatással lehet az elválasztás szelektivitására. A pH-változás a komponensek ionos állapotát erősen befolyásolja, miáltal azok visszatartása módosul.
hőmérséklet	hatékonyság	Magasabb hőmérséklet hatására felgyorsul az ioncsere az álló és mozgó fázisok között, valamint csökken a mozgófázis viszkozitása.
áramlási sebesség	hatékonyság	Más HPLC-módszerekhez képest általában lassabb, mert ezáltal válik lehetővé a nagyobb kinetikájú iontranszfer.
puffer só	oldószer erősség és szelektivitás	A mozgó fázis ellenion minősége befolyásolja az állófázishoz való affinitás erősségét, ezáltal az oldószer erősségét valamint a szelektivitást.
szerves módosító	oldószer erősség	Azoknál a vegyületeknél, amelyeknél apoláros kölcsönhatások is részt vesznek a retencióban, a szerves módosító koncentrációjának növekedésével nő az oldószererősség, ezáltal csökken a retenció (fordított fázisú kromatográfiának megfelelően).
	hatékonyság	A szerves módosító csökkenti a mozgó fázis viszkozitását, ezáltal növeli az ioncsere kinetikáját, melynek következtében csökken a visszatartás.

Mivel az ioncserés kromatográfiában csak az ionok tarthatók vissza az oszlopon, mindenkor cél a komponenseket ionos állapotba hozni. Az első és legfontosabb szempont a mozgó fázis kiválasztásában a pH, hiszen ezáltal biztosítható a komponensek kívánt ionos állapota. Az eluens működési pH-ját a komponensek pK_a értékének ismeretében állíthatjuk be. Irodalmi példák esetében gyakran találkozunk pH-grádiens alkalmazásával az optimális elválasztás érdekében. Célszerű azonban ezt a megoldást elkerülni, hiszen ismert, hogy ilyen esetekben a kvázi-egyensúlyi állapot beállításához hosszú idő szükséges (20–30 perc), mely jelentősen lassítja az analízis folyamatát. Továbbá ismert, hogy pH-grádiens alkalmazása esetén az elválasztás nem mindig reprodukálható. Ennek hátterében az erős mátrixhatás állhat, melyet a puffer kapacitása már nem tud ellensúlyozni, ezáltal a pH bizonytalanná

válík. Általános szabályként fogalmazható meg, hogy ioncserés kromatográfiában az optimális puffer pH-ja 1-2 egységgel a vizsgálandó savak pK_a értékei alatt, valamint 1-2 egységgel a vizsgálandó bázisok pK_a értékei felett van.

A 9. táblázat adatai szerint az oldószererősség leginkább az ionerősség változtatásával befolyásolható. A pH-grádienssel ellentétben az ionerősségi grádiens nem jelent kevésbé reprodukálható elválasztást, valamint a kvázi-egyensúly beállításához elegendő 2-3 perc.

A hőmérséklet retenciót befolyásoló hatásának reakciókinetikai okai vannak, hiszen magasabb hőmérsékleten a disszociációs folyamatok felgyorsulnak, ezáltal kisebb visszatartás tapasztalható. Ez a magyarázata, hogy az irodalmi utalásokban gyakran találunk 30–40 °C-on végzett elválasztást ionos komponensek esetében.

3.7.6.2.4 *Mozgó fázisok az ionpárképző kromatográfiában*

Mint az előbbieken láttuk, az ionpárképző eluensek legfontosabb alkotója ionpárképző reagens, mely ionos része kationok elválasztása esetén negatív töltéssel, anionok elválasztása esetén pozitív töltéssel bír. A retenció és az elválasztás szelektivitását számos kísérleti paraméter befolyásolhatja, melyeket a 6. táblázat tartalmaz. (COLIN, 1991)

6. táblázat A mozgó fázis paramétereinek retencióra kifejtett hatása ionpárképző kromatográfia esetén

Mozgó fázis paraméter	A mintaion retenciójára kifejtett hatás
Ionpárképző típusa	Az ionpárképzési képesség növekedésével nő a retenció.
Ionpárképző mérete	Az ionpárképző méretének növelésével nő a retenció.
Ionpárképző koncentrációja	Egy határig az ionpárképző koncentrációjának növelésével nő a retenció.
pH	A vizsgálandó ion természetétől függ. A pH beállításával maximálhatjuk a mintamolekulák ionos formájának koncentrációját, ezáltal növelve a retenciót.
Szerves módosító koncentrációja	Azoknál a vegyületeknél, amelyeknél apoláros kölcsönhatások is részt vesznek a retencióban, a szerves módosító koncentrációjának növekedésével nő az oldószererősség, azaz csökken a retenció (fordított fázisú kromatográfiának megfelelően) A szerves módosító (pl. metanol) csökkenti a mozgó fázis viszkozitását, ezáltal növeli az ioncsere kinetikáját, azaz csökkenti a retenciót.
Hőmérséklet	A hőmérséklet növelésével csökken a visszatartás.

A dinamikus ioncsere modellnek megfelelően az ionpárképző kromatográfia tulajdonképpen az ioncsere folyamataira vezethető vissza, azzal a különbséggel, hogy az aktív ioncserélő felületet magunk

alakítjuk ki. Ez alapján elmondható, hogy a pH, a hőmérséklet és az ionerősség megválasztásában ugyanazokat a szempontokat kell figyelembe venni, mint a korábban tárgyalt ioncsere esetében.

Az ionpároképző kromatográfia esetében előnyként használható az a tulajdonság, hogy a reagenst egy apoláris felületű szilikagélre visszük fel. Ebből következően a szabadon maradt apoláris kötőhelyek felhasználhatók azon molekulák elválasztására is, melyek poláris jellegükben (és nem ionos jellegükben) különböznek. Ez esetben a retenciót szerves módosító adagolásával szabályozhatjuk (pl. metanol). A szerves módosító szerepe tehát abban az esetben fontos, ha az elválasztandó molekulák között van olyan, amely hidrofób kölcsönhatása az álló fázishoz szignifikáns. Ez esetben a rendszer egy fordított fázisú kromatográfias rendszernek is tekinthető, ahol a szerves oldószernek szerepe van az oldószererősség kialakításában.

3.8 Minőségbiztosítás a módosulatanalitikában

Az elemek összkoncentrációjának meghatározására vonatkozó minőségbiztosítási követelmények ma már az európai uniós irányelvek között szerepelnek. Ezeket az utasításokat speciációs analízisnél is figyelembe kell venni, de a listát még ki kell egészíteni azokkal a különleges figyelmet kívánó problémákkal, melyek a kémiai módosulatok jellegéből adódnak. Ipolyi Ildikó 2003-ban védett doktori munkájában részletesen foglalkozik a kérdéskörrel. (IPOLYI, 2003) Jelen fejezetben a legfontosabb arzénspeciációt érintő minőségbiztosítási módszereket tárgyalom, melyeket munkám során is alkalmaztam.

3.8.1 Hitelesített referenciaanyagok az arzénspeciációban

Ha az arzénspeciációs módszereket minták vizsgálatára alkalmazzuk, szinte minden esetben találkozunk a mátrix zavaró hatásával. A mátrixhatás kiküszöbölése megoldható (ld. korábban), de a folyamat ellenőrzéséhez arzénspeciációhoz hitelesített/bizonylatolt referencia anyagot (CRM) kell használnunk, mely segítségével validáljuk a módszerünket, valamint a mérés pontosságát ellenőrizzük. A CRM-ek alkalmazásával kapcsolatban számos összefoglaló tanulmány született. (QUEVAUVILLIER, 1998, WILLIE, 1994) A nagyszámú teljes arzéntartalomra hitelesített CRM-ek mellett csupán néhány CRM hitelesített speciációs célokra. Ezek többnyire a korábbi érdeklődésnek megfelelően tengeri eredetű minták (mint például a DORM-2 és a BCR 627, melyek tengeri halak izomszövetei). Emiatt nemcsak a mátrixban különböznek a szárazföldi/édesvízi mintáktól, hanem specieszösszetételük, azok koncentrációi is nagyban eltér a vizsgált mintától. Célszerű tehát arra törekedni, hogy a rendelkezésünkre álló CRM-ek közül a legmegfelelőbbet válasszuk az analitikai módszer minőségbiztosítására.

3.8.2 *Standard vegyületek*

A megfelelően megválasztott standard vegyületek fontos részei az analitikai minőségbiztosításnak. Mivel az arzénspeciációs kutatói társadalom összelem-analitikai múlttal rendelkezik, a szerves arzénmódosulatok mindannyiuk polcain megtalálhatók. Másfelől a szerves módosulatok közül csupán néhány (pl. DMA) van kereskedelmi forgalomban, legtöbbjük baráti alapon cserél gazdát. A szintézislaborok kemény munkájának köszönhetően a több gramm nagyságrendben előállított, megfelelően tisztított vegyületeknek bár ára nincs, eszmei értéke annál nagyobb. Léteznek olyan vegyületek, melyek előállítása még nem megoldott (pl. arzenocukrok). Ezeket valódi mintákból kell kivonni, tisztítani, dúsítani és változás nélkül eltartani. Madson és munkatársai több kilogramm barna algát (*Fucus serratus*) dolgoztak fel, mely négyféle arzenocukrot, DMA-t és nyomnyi mennyiségű szerves arzént tartalmazott. (MADSON, 2000) Célul tűzték ki egy olyan extraktum előállítását, melyben a négy arzenocukor hitelesített koncentrációban van jelen, ezáltal a későbbi analízisekhez standardként alkalmazható. A feladatot sikeresen teljesítették, azóta több laboratórium is ezeket a mintákat – mint kalibráló oldatokat – alkalmazza arzenocukrok meghatározására.

Fontos megemlíteni, hogy a HPLC-ICPMS csatolt rendszerrel végzett arzénspeciáció esetében tulajdonképpen a standardok jelentősége a mennyiségi meghatározásoknál nem számottevő. Elméletileg az ionforrásban a vegyületek az arzéntartalommal arányos mennyiségű iont produkálnak, függetlenül kémia szerkezetüktől. Ezáltal egy bizonyos standarddel bármely vegyület mennyisége számszerűsíthető. Ennek ellenkezőjét még senki nem bizonyította, mégis inkább elfogadott az adott vegyület saját standardjével végzett kalibrálás. Ez talán azzal magyarázható, hogy elválasztás esetén a mátrix hatása a retenciós időtől erősen függ, ezáltal az egymástól „messze” eluálódó csúcsokra a hatás különbözhet. Ismeretlen vegyület esetében ezért javasolt a legközelebbi retenciós idővel rendelkező standard módosulattal végzett mennyiségi meghatározás.

3.8.3 *Módszervalidálás*

Az analitikai módszerek validálásáról nagyon sok útmutatást találunk már az interneten is. A folyamat a feladathoz mérten logikusnak tartott teljesítményjellemzők meghatározása és dokumentálása. Speciációs analitikai méréseknél a tevékenységek sora valamelyest kiegészül speciális feladatokkal, mint például a mintaelőkészítési módszer módosulatokra gyakorolt hatásának vizsgálata, a kinyerés reprodukálhatóságának vizsgálata különböző minták esetén stb. Arzénspeciációs kutatások eredményei sajnos ma még nem érintették meg az európai uniós szabványügyi szervezeteket, ma még nincs igény a módszerek teljes validálására. A tudományos életben egy-egy új módszer bevezetésekor

bizonyos validálási paraméterek – mint a kimutatási határ, linearitás, reprodukálhatóság, pontosság – meghatározása fontos, de nem előírt követelmény. Ezen okokból a speciációs módszerek validálása némileg elmaradott.

3.8.4 Kalibrációs módszerek

Az arzénspeciációs analitikában alkalmazott mintaelőkészítési módszerek nem arzénszelektívek. Ez okozza az úgynevezett mátrixhatást, mely sok esetben számottevő. A zavaró mátrix a kromatográfias módszerekkel valamelyest eliminálható, teljes arzénkoncentráció meghatározása esetében azonban nem szokás kromatográfiát használni. A mátrix legfontosabb hatása a oldatok fizikai tulajdonságaiban nyilvánul meg, mint például a sűrűség, felületi feszültség, viszkozitás. Ezek a változások nagyban befolyásolják a porlaszthatóságot, mely szorosan összefügg a detektorba jutó mintamennyiséggel. Ez esetben tehát, ha mátrixot nem tartalmazó standard oldattal kalibrálunk, hamis eredményt kapunk. Erről CRM-ek alkalmazásával megbizonyosodhatunk. Ha a fent említett eset áll fenn, akkor a standard addíciós kalibráció segítségünkre lehet. Ez esetben a minta nagyobb térfogatához (például 49 ml) kis térfogatú, ismert és növekvő arzénkoncentrációjú standard oldatot adagolunk (például 1 ml térfogatban x ng As/ml standard oldat). Ez esetben a mátrix minden kalibráló oldatra azonos mértékben van hatással, mely a kalibrációs egyenes meredekségében megmutatkozik. Az analízist befolyásoló mátrixhatás jelzésére a standard addíciós kalibráció a választandó módszer. De mi a teendő, ha nincs olyan CRM, mely a vizsgálandó mintánkhöz hasonló mátrixszal rendelkezik? Ebben az esetben is el kell készíteni a standard addíciós kalibrációt, mely egyenesének egyenletét össze kell hasonlítani a hagyományos (külső) kalibrációs görbével. Ha a meredekség azonos, nincs számottevő mátrixhatás, ha nem, akkor a mátrixhatás miatt kizárólag standard addíciós kalibráció használható a mennyiségi meghatározáshoz. Ezt az összehasonlító módszert alkalmaztam a 4.3.4 fejezetben tárgyalt kísérletemben.

Ugyanezen fizikai zavaró hatások kiküszöbölésére alkalmazzuk a belső standard módszert, mely egy, az arzénhez hasonló fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező elemmel történő korrekción alapul. Az ionizációs energiát valamint a tömegszámot tekintve az arzénhez leginkább hasonló izotópok a ^{72}Ge és a ^{69}Ga . Amennyiben ezeket az elemeket kis térfogatban, mindig azonos koncentrációban adagoljuk az összes mérendő oldathoz (a kalibráló oldatokhoz egyaránt), az As/Ge vagy As/Ga aránnyal számolva a porlasztás bizonytalanságából eredő hibák kiküszöbölhetők.

A fent említett két módszer hasznos, de nem képes minden zavaró hatás kiküszöbölésére. Tömegspektrometriás detektálás esetén a kémiai eredetű – mint például az oldószerzennyezésből, vagy a spektrális interferenciákból ($^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$) adódó – zavaró hatások ezzel a módszerrel nem

korrigálhatók. Sajnos az arzén monoizotópos elem, ezáltal az izotóphígítás nyújtotta kiváló kalibrációs lehetőséggel sem élhetünk. Kémiai zavaró hatások tekintetében lehetőségünk adódik interferencia-egyenletek használatára, mely segítségével a zavaró hatásból eredő koncentráció többletetet a szoftver automatikusan levonja. Arzénnel kapcsolatban általános tapasztalat, hogy $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ interferencia nem okoz gondot, hiszen a minták klórtartalma nem jelentős. Speciációs elemzésnél az elválasztás során a klór a módosulatoktól elkülönülve jut a detektorba. A fentiek miatt a roncsolás sósavval viszont nem végezhető.

3.8.5 Mintatábla elkészítése, a jel sodródásának meghatározása

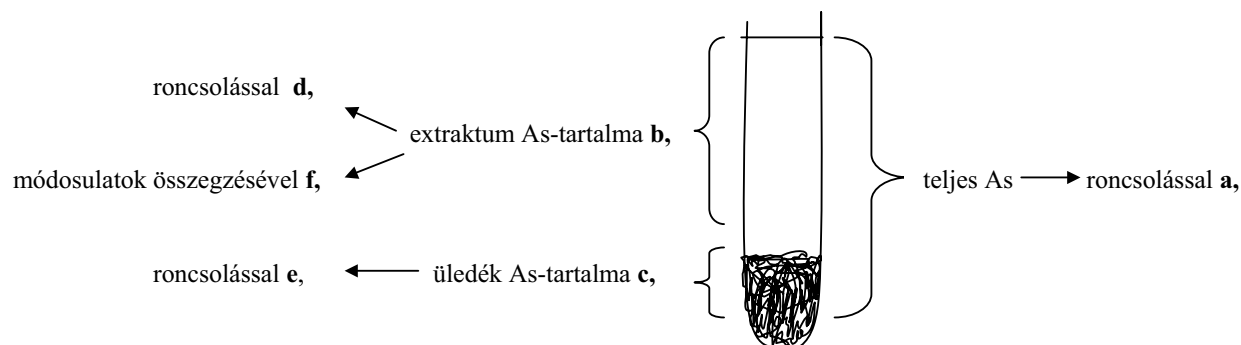
Mérésünk minőségét a jól/rosszul szerkesztett mintatáblával is nagyban befolyásolhatjuk. A mintatábla kitöltésével határozzuk meg tulajdonképpen a minták mérési sorrendjét. Az alábbiakban egy teljes arzénkoncentráció meghatározása esetében javasolt mintatábla felépítését mutatom be.

- a) Mielőtt a mérést elkezdjük, a mérőműszer kondicionálása szükséges. Erre a célra a gyakorlatban leginkább a vak mintaoldat előzetes beporlasztása terjedt el, melynek savtartalma a minták esetében beállított savtartalommal azonos. A mintatáblába első – vagy első két – sorába ezek a vakminták kerülnek, melyek mérési eredményt még nem szolgáltatnak.
- b) Ezután a vak oldat újbóli beporlasztása következik, melyet már a standard vak értékünk méréséhez felhasználunk.
- c) Ezt követi a roncsolási vak, mely a roncsolási folyamaton átment, de mintát nem tartalmazó oldat. A mért értékkel a roncsolt mintákra kapott mérési eredményeinket korrigáljuk.
- d) A következőkben a kalibrációs oldatokat mérjük, koncentrációjuk növekedési sorrendjében.
- e) A kalibrációt követően a műszer kiöblítése érdekében újból a vak oldatot porlasztjuk be (esetleg kétszer).
- f) Ezután a CRM oldatát mérjük, melyet azonnal száraz anyagra átszámolunk. Ha a mért érték nem azonos a hitelesített koncentrációval, megállítjuk a mérést és megkeressük a hibát.
- g) Ha mérésünk pontossága megfelelő, a mintákat porlasztjuk a készülékbe.
- h) Mivel sok minta esetében a mérés időben elhúzódhat, fontos a jel sodródásának („drift”) megállapítása a mérés folyamán. A sodródás oka nagyon összetett, a készülék fizikai paramétereinek időbeli változására vezethető vissza. A sodródást azáltal határozhatjuk meg, hogy adott időközönként – például minden 10 minta után – visszamérünk egy standard oldatot, és annak névleges koncentrációjától való eltérést megállapítjuk. A sodródás általában tendenciát mutat a mérés során, melyre függvény illeszthető. Az is előfordul, hogy a mérést szakaszokra osztjuk,

melyekre más-más görbületű sodródás-függvény jellemző. A függvény ismeretében a minták mért koncentrációit a pontosság érdekében korrigálni szükséges.

3.8.6 Teljes anyagmérleg készítése

A teljes anyagmérleg készítése kiemelt jelentőségű a speciációs analitikában. A folyamatot az alábbi ábrán szemléltetem. (12. ábra)



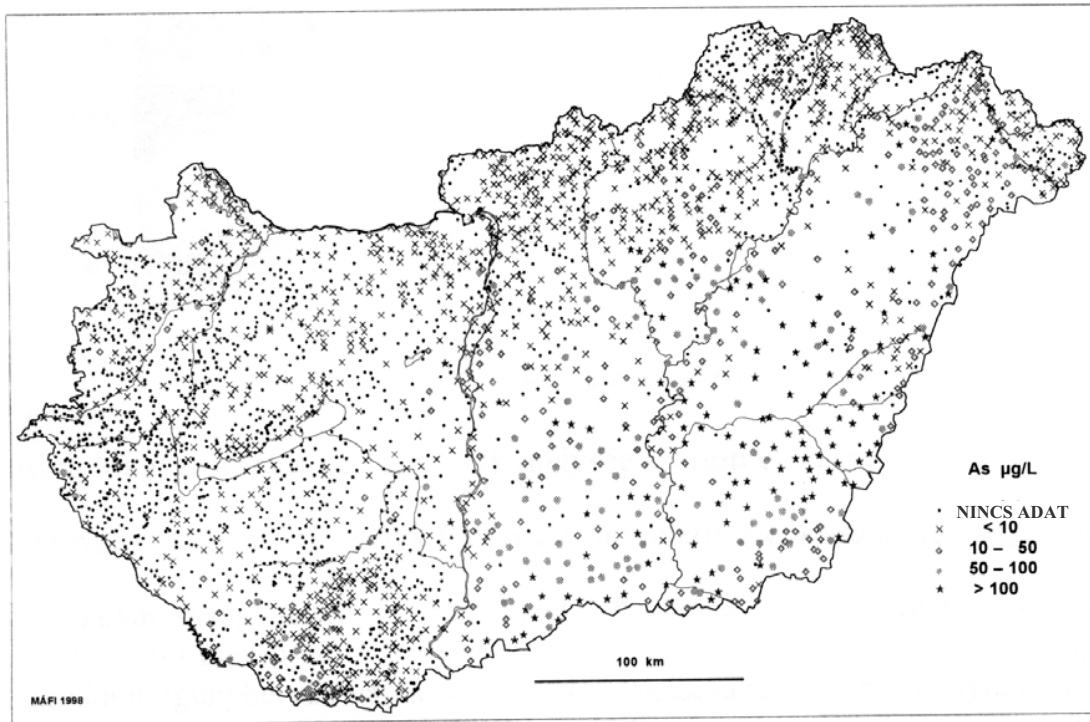
12. ábra Teljes anyagmérleg készítésének vázlatja

Mint látható, a teljes anyagmérleg a minta többszöri, különböző módszerekkel végzett méréséből tevődik össze. Első lépésben a liofilizált minta teljes arzéntartalmát határozzuk meg (12. ábra/a). Ezt követően elvégezzük az extrakciót, melyből centrifugálással két fázis: a felülúszó (12. ábra/b) és az üledék (12. ábra/c) különíthető el. Mind a felülúszót, mind az üledéket elroncsoljuk, majd a roncsolmányok teljes arzénkoncentrációját meghatározzuk (12. ábra/d, e). Méréseink minősége akkor megfelelő, ha a kettő összege azonos a minta teljes arzéntartalmával. Ez esetben a kinyerési hatásfok számolható. Speciációs elemzéshez a felülúszót használjuk fel (12. ábra/b). Az arzénmódosulatok mennyiségét – melyet arzénben fejezünk ki – összegezzük (12. ábra/f), mely összegnek jó egyezést kell mutatnia a felülúszó teljes arzéntartalmával. Ha ez nem egyezik, akkor az eltérést az oszlopvisszanyerési hatásfokkal fejezzük ki. A teljes anyagmérleg mintacsoportokra jellemző, így nem szükséges minden minta esetében elkészíteni. Doktori munkám során törekedtem a teljes anyagmérleg elkészítésére, az oszlopvisszanyeréssel kapcsolatban előforduló problémáról részletesen a 5.5.4. fejezetben közzétett vizsgálat esetében számolok be.

3.9 ARZÉNSPECIÁCIÓ IVÓVÍZMINTÁKBAN

A felszín alatti vizekben megjelenő magas arzénkoncentráció sajátosan Magyarországon természetes geológiai folyamatokra vezethető vissza.

Hazánkban a mélységi vizek arzéntartalmának problémájára a nyolcvanas évek elején figyeltek fel először. Tanszékünkön végzett mérési munka eredményeképpen 1985-ben elkészült Magyarország első vízgeokémiai atlasza, amely az arzén országos előfordulását is szemléltette (1985, Magyarország vízgeokémiai atlasza) Ezt követően több laboratórium (OKI, VITUKI, KÖJÁL-állomások, JATE, MÉM, Fővárosi Vízmű laboratóriuma) bevonásával, több szakaszban, országos felmérés készült a közegészségügyi-környezetvédelmi probléma felmérésére (CSANÁDY, 1998). A hazai vízkészlet arzénszennyezettségi adatait a 13. ábrán látható térképen tették közzé.



13. ábra A hazai vízkészlet arzénszennyezettségi adatai

Megállapítható, hogy a leginkább érintett térségek a Délkelet-Alföldön a Körösi süllyedék, valamint a Maros hordalékkúp környéke (Délkelet-Tiszántúl). Az érintett települések számát megyénkénti bontásban tekintve a legrosszabb a helyzet Békésben, Bács-Kiskunban, Szabolcs-Szatmár-Bereg és Hajdú-Bihar megyékben. Országos szinten a 10 µg/l-t (EU határérték) meghaladó arzénes vizet fogyasztó lakosok száma 1.338 millió, azaz a lakosság 13%-a. Megállapították, hogy

hazai mélységi vizekben az arzén magas koncentrációjának megjelenése a térséget sajátosan jellemző geokémiai tulajdonságoknak (és nem szennyezésnek) köszönhető. (BARTHA, 1999)

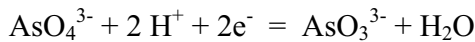
Az arzén a kőzetekben fémekkel és kénnel együtt számos ércben előfordul, ilyen pl. az arzenopirit, mely olyan vasszulfid ásvány, melyben minden második kénatomot As helyettesít (FeAsS). Ez az érc az elsődleges arzénforrás a hazai természetes vizek kőzeteiben. Az üledékrendszerekben azonban az arzén a Fe-, az Al- és a Mn-oxidok és hidroxidok reaktív felületéhez adszorbeálódott állapotban található. Az üledékben, illetve a kőzetekben előforduló arzénmennyiség felszabadulási folyamatait két hipotézissel magyarázzák. Az első az aerob hipotézis, melynek alapja az oxigén beáramlása a felszín alatti vízkészletbe (pl. annak visszavonulása révén), ezáltal az arzenopiritből oxidált arzenát- és szulfátionok válnak szabaddá. (DAS, 1995) Ezt a feltételezést az utóbbi években elvetették, hiszen bár magyarázatot ad a szulfátionok arzénmennyiséggel korreláló előfordulására, az oxidatív közeg nem magyarázza a redukált arzenit ionok nagy arányú előfordulását bizonyos vizekben. Sokkal inkább elfogadott az anaerob hipotézis, mely szerint az üledékben fémoxid/hidroxidokhoz adszorbeálódott arzén szabaddá válik bizonyos redukációs folyamatok révén. (MOK, 1994, THORNTON, 1996, NICKSON, 2000) A redukciót mikrobiológiai okokkal magyarázzák, vagy közvetlen úton, redukáló mikroorganizmusok révén, vagy közvetett módon mikrobiológiai oxidáció következtében a víz szerves anyagkészlete oldott oxigént fogyaszt, mely által redukáló környezet alakul ki.

Az arzén a felszín alatti vizekben főként szervesetlen arzenit- és arzenátként mutatható ki. Az As(III) a természetes vizekben As(OH)_3 ($\text{pK}_a = 9.2$) formájában fordul elő, és sokkal mobilisabb mint az As(V), mivel kevésbé adszorbeálódik az ásványi anyagok felszínére összevetve a negatív töltésű As(V) oxianionokkal (H_3AsO_4 , $\text{pK}_a = 2.22, 6.98, 11.53$). Az As(V) anionok például a Fe(III) oxidált módosulataihoz közismerten nagy affinitással kötődnek, (WAYCHUNAS, 1993, LUMSDON, 1984) míg az As(III) – bár kisebb mértékben, de – szintén adszorbeálódhat néhány Fe(III) oxid felszínén. (SUN, 1996) Hasonlóképpen, aktivált alumínium-oxid felületen pH = 7 mellett az arzenát kétszer nagyobb mennyiségben kötődik, mint az arzenit. (GHOSH, 1987) A kaolinitnek és a monmorillonitnek szintén nagyobb affinitása van az As(V) molekulához (FROST, 1977).

Ismert az arzenát közvetlen mikrobiológiai redukciója is a sokkal mozgékonyabb arzenitté, bizonyos baktériumok, algák és gombafajok közreműködésével. (CULLEN, 1989a, SILVER, 1993, DIORIO, 1995). Mikrobiológiai aktivitás tehető felelőssé például az arzénszennyezett üledékből történő arzénkioldódás folyamatáért: vas-redukáló baktériumok a vas-oxidhoz kötöt arzenát leválását eredményezik az üledék felületéről. (LOVLEY, 1991). Közlemények számolnak be szulfát-redukáló baktériumokról, melyek következtében a keletkező H_2S tehető felelőssé az arzenát-arzenit redukcióért. A kilencvenes években ún. 'arzenát-belélegző' baktériumtörzsekről számoltak be, melyek redukált

állapotában juttatják vissza az arzént a környezetbe. Ilyenek például a *MIT-13*-nak nevezett baktériumtörzs tagjai, valamint az aranybányák környezetében előforduló *Chrysiogenes arsenatis* is. (AHMANN, 1994, MACY, 1996)

Fontos megemlíteni, hogy az egyes formák előfordulását nagy mértékben befolyásolják a környezet fizikai-kémiai paraméterei is, mint az ásványianyag összetétel, a pH és a hőmérséklet. Smedley és munkatársai kimutatták, hogy természetes vizekben az As(III)-As(V) oxidációs folyamat felezési ideje 1–3 év lehet, megjegyezve azonban, hogy a reakció sebessége lehet ennél sokkal nagyobb is levegő illetve különböző 'ismeretlen' oldott anyagok vagy oxidok jelenlétében. (SMEDLEY, 2001) Az oxidációt az alábbi egyenlet szemlélteti.



A redoxireakcióban a hidrogénion is részt vesz, így annak sebessége és az egyensúlyi helyzet a pH-tól is függ: savas közegben az egyensúly az arzén redukált formája felé tolódik el. Az oxidáció hőmérsékletfüggő, ugyanis a hőmérséklet emelkedése következtében az As(V) formák dominanciája jelentkezik.

A fentiek jól alátámasztják azt a megállapítást, hogy az arzénionok mobilitásának tárgyalásakor a módosulatszemplélet elengedhetetlen, ugyanis az arzénformák oxidáltsági állapota határozza meg az adszorpciót-deszorpciót a különböző felületekhez. Levezethető, hogy a szervesetlen arzénformák egymásba alakulási reakcióját a legkisebb környezetváltozás (pl. mintavételezés, minta szállítása, tárolása) is könnyen beindíthatja.

A fent leírt folyamatok logikus magyarázatául szolgálnak Irgolic és munkatársai megfigyeléseihez, akik 1994-ben széleskörű tanulmányt készítettek az arzén kémiai formáinak előfordulásáról Szlovénia és Ausztria ivóvíz mintáiban. (IRGOLIC, 1995) Arra a következtetésre jutottak, hogy a minták legtöbb esetben arzenát formájában tartalmazták az arzént, de ha a víz anaerob környezetben helyezkedik el, arzenit dominancia is előfordulhat. Metilált arzénspecíeszek nagyon ritkán alkotói a felszín alatti vízkészleteknek, kivétel akkor, ha azok arzéntartalmú herbicidekkel szennyezettek. A tanulmányok szerint, bár széleskörűen elterjedt az a nézet, hogy a felszín alatti vízkészlet domináló arzénmódosulata az arzenát, mégis egyre több adat igazolja az arzenit domináns előfordulását bizonyos mintákban. (KORTE, 1991). A szemléletváltozás nagyrészt a mintagyűjtés módszereinek fejlődése, a minta konzerválása és az analitikai technikák fejlődésének köszönhetően történt.

A módosulatanalitikai szemlélettől függetlenül elmondható, hogy az élelmiszerek és az ivóvíz arzéntartalmának csökkentése már a XX. század elején fontos feladatként fogalmazódott meg. Az első rendelet 1942-ben jelent meg az Amerikai Egyesült Államokban, mely az ivóvízben előforduló maximálisan megengedhető arzén koncentrációját (MCL) 50 µg/l-ben állapította meg. Európában csak

1975-ben került sor a határérték átvételére az Európai Környezetvédelmi Hatóság által. Az indítvány elfogadását követően 1988-ban készült el az EPA által közétett környezeti tanulmány, mely az akkori ismeretek birtokában részletesen megvizsgálta az arzénszennyezett ivóvizek emberi fogyasztásának egészségügyi kockázatát. Később, 1996-ban a Hatóság újabb, korszerűbb eszközökkel végzett vizsgálatokat javasolt, mely tükrében 1998–2000 évre újabb határértékek felállítását tűzte ki célul. A vizsgálatokban számos, különböző tudományterületeket képviselő kutatócsoport vett részt: toxikológusok, gyógyszerészek, patológusok, kémikusok, élelmezésügyi és járványügyi szakemberek valamint informatikusok, matematikusok. A vizsgálatok eredményére alapozva 1998. november 3-án megszületett az új Európai Direktíva, mely az arzén határértékét 10 µg/l koncentrációban állapította meg (*98/83/EC on the quality of water intended for human consumption, 1998. november 3.*). Bár Magyarország ekkor még nem volt az Európai Unió tagja, létrehozta a 201/2001. 10. 25. számú rendeletet, mely előírta a határérték átvételét az országban. A rendelkezés alól haladékot kaptak bizonyos arzénszennyezett területek, melyek közül egyes régiókban 2006. 12. 25-ig, más területeken 2009. 12. 25-ig kell majd teljesíteni a rendeletben foglaltakat. (GOYER, 1999)

A fentiek olvasatával mindannyiunkban felmerül a kérdés, hogy mi alapján határozzák meg az arzénre vonatkoztatott határértékeket. A módszernek természetesen létezik egy toxikológiai oldala, amikor állatkísérletben határozzák meg a hosszútávon fogyasztható, de egészségkárosodást még nem okozó arzénmennyiséget. Másfelől elvárt követelmény, hogy a kidolgozott határértéket megbízhatóan mérni képes módszerek álljak rendelkezésre, melyek a rutin laborok számára is könnyen hozzáférhetőek. Ez utóbbi követelmény nem elhanyagolható, valamint könnyen magyarázza – a mérés technikák fejlődésével párhuzamosan – a határérték ötödére csökkenését az elmúlt időszakban. Az utóbbiakra utalva példaképpen említeném az 1994-ben elvégzett felmérést, melyben 25 laboratórium vett részt. A felmérés célja az volt, hogy a laboratóriumok az általuk alkalmazott teljes arzénmeghatározási technikák – HG-AAS és a GF-AAS módszerek – mérési határait (QL) közzétegyék. Az eredmények jól mutatták, hogy a hidridképzéses módszer ötször jobb mérési határt tudott produkálni (4 µg/l), mint a grafitkemencés eljárás, mely ebben az időben még nem volt alkalmas a később felállított határérték (10 µg/l) teljesítésére. (EATON, 1994) Ma már a teljes arzénkoncentráció meghatározására a sokkal érzékenyebb – ugyanakkor a multielemes mérés előnyét is magában hordozó – ICP-AES és ICP-MS technikákat alkalmazzák. Mindkét esetben lehetőség nyílik a rendszer előtti hidridképzésre, s ezáltal jobb kimutatási határok elérésére, valamint csatolása elválasztástechnikai egységekhez (leggyakrabban HPLC), mely által az arzénmódosulatok szelektív detektálása valósítható meg.

Az ivóvíz maximálisan megengedhető arzéntartalmára vonatkozó határértékek teljes arzénkoncentrációra vonatkoznak, nem tesznek különbséget az egyes módosulatok között. Ez a

szemlélet azzal magyarázható, hogy bár eltérés mutatkozik a III és V oxidációs állapotú vegyületek toxikológiai adatai között, ez az eltérés kis mértékű. Figyelembe kell vennünk a mintavétellel kapcsolatos nehézségeket is, ugyanis – mint az előbbieken ismertettük – a környezet paramétereinek változása nagyban befolyásolja az arzénformák egymásba alakulását. Mindezek ellenére mégis miért fontos az ivóvizek arzénspeciációs elemzése? Az igény elsőként az arzénmentesítési technológiák fejlesztésekor fogalmazódott meg.

Már jóval a határértékek kiírása előtt nyilvánvalóvá vált, hogy a klinikai tüneteket okozó arzénmennyiséget az ivóvízként szolgáló kutakban csökkenteni kell. Ma már egyre nagyobb kihívást jelentenek az alacsonyabb határértékek, a korábban alkalmazott 'arzénszegény vízzel való hígítás' nem eredményez megfelelően arzénmentes ivóvizet. A nyolcvanas évek közepén, a magyarországi vízkészlet problémájának felismerését és felmérését követően a hazai intézményhálózat (VITUKI, MÉLYÉPTEK), illetve a leginkább érintett felhasználói oldal (Békés Megyei Vízmű) összefogásával megjelentek azok a hazai fejlesztésű technológiák, amelyek képesek voltak az akkori, ill. a ma is érvényes magyar határérték – azaz 50 µg/l (MSZ 450-1: 1989) – alá csökkenteni a szolgáltatott ivóvíz arzéntartalmát. Az ezzel kapcsolatban felmerülő környezetpolitikai és szakmai probléma az, hogy az EU ivóvíz-direktívája (1998. november 3.) ennél lényegesen kisebb, mindössze 10 µg/l koncentrációértékekben szabja meg az arzéntartalmat az ivóvízben. Erre a megkövetelt teljesítményre a jelenleg hazánkban alkalmazott technológiák nem vagy csak korlátozottan alkalmasak.

Az arzénmentesítésre szolgáló technológiák három nagy csoportba sorolhatók: 1) csapadékképző technikák, 2) adszorpciós módszerek, 3) ioncserén alapuló folyamatok.

1. A csapadékképző technikák koaguláción, illetve azt követő szűrésen alapulnak. A koagulánsok megváltoztatják az oldott kolloidok kémiai-fizikai tulajdonságait, így aggregáció megy végbe, és a keletkezett részecskék könnyen kiszűrhetők az oldatból. Arzén koagulálására alumíniumot, vas-kloridot, vas-szulfátot használnak, de bizonyítást nyert, hogy az As(III) eltávolítása ezzel a technikával sokkal kevésbé hatásos, mint az As(V)-é. (HERING, 1996, EDWARDS, 1994).
2. Az adszorpciós módszerek közül arzénmentesítésre tulajdonképpen csak az aktivált alumínium (AA) felület terjedt el. Ez a szorbens egy alumínium-oxid felület, melyet az Al(OH)₃ dehidratációjával állítanak elő. Több tanulmány beszámolt arról, hogy a pH, az arzénvegyületek oxidáltsági állapota, a versenyző ionok, valamint a regenerációs idő erősen befolyásolják az eltávolítás határfokát. Hasonlóan a csapadékképző eljárásokhoz, az AA szorpciós határfoka sokkal nagyobbak adódott As(V), mint As(III) esetében. (CLIFFORD, 1995)

3. Az ioncserélő eljárások alapja egy kicserélődési reakció, mely a szilárd hordozó ionjai és a betáplált víz ionjai között játszódik le. Az ioncserélő gyantát úgy alakítják ki, hogy az az erősebben anionos jellegű arzenát iont nagyobb hatásfokkal cseréli le, mint az arzenit iont.

A fenti folyamatokból kiderül, hogy az arzénformák oxidációs aránya nagyban befolyásolja az eltávolítási technológia hatékonyságát. Mindhárom esetben az arzenát nagyobb hatásfokkal szűrhető ki, ezáltal tehát, ha az oldatban arzenit dominancia áll fenn, oxidációs lépés közbeiktatásával (arzenáttá alakítás) lehet a koagulációs technikát hatékonyan alkalmazni.

A leírtak alapján tehát összefoglalva elmondható, hogy az ivóvizekben az As(III)/As(V) arány ismerete fontos, (i) mert az arzén felhalmozódásának és remobilizációjának, (ii) valamint az arzénmentesítési technológiák hatékonyságának meghatározó paramétere. Doktori munkámban hazai, kritikus területen gyűjtött ivóvízminták arzénspeciációs vizsgálatát végeztem el, melynek eredményeiről az 5.2. fejezetben számolok be.

3.10 ARZÉNSPECIÁCIÓ TENGERI MINTÁKBAN

Az első arzénspeciációs munkák a tengeri bioszféra vizsgálatára irányultak, mivel ezekben a szervezetekben sokféle arzénkomponens viszonylag nagy koncentrációban kimutatható. 1977-ben fedezték fel az AB-t, melyet elsőként homárból izoláltak és azonosítottak. (EDMONDS, 1977) Az első összefoglaló tanulmányt, mely az addigi eredmények alapján sorba vette a tengeri környezetben előforduló arzénkomponenseket Cullen és Reimer publikálta 1989-ben. (CULLEN, 1989a) Azóta is számos tanulmány látott napvilágot a témában, mely legnagyobb része leíró jellegű közlemény, kevés esetben olvashatunk feltételezett magyarázatot is a megfigyelésekre. Ennek okát elsősorban abban látom, hogy a bioszintetikus mechanizmusok gondolati követése, megértése, következtetése komplex látásmódot kíván, nem elég az analitikus gondolkodás, szerves kémiai, szintetikus kémiai, biológiai hozzáértés is szükségeltetik. A komponensek bioszintézisével kapcsolatos elméletek ismerete fontos, egyrészt mivel segítenek a környezeti folyamatok átfogó megértésében, másrészt az általuk üzent logika segít a jövőbeli kutatási téma keresésében. Jelen alfejezet első részében összefoglalom a tengeri élőlények arzénspeciációs elemzése kapcsán publikált eredményeket, második részben pedig áttekintem azokat az általam fontosnak ítélt elméleteket és reakcióutakat, melyek a megfigyeléseket alátámasztják.

3.10.1 *Tengeri bioszféra arzénspeciációs irodalma*

A Föld óceánjai átlagosan 0.5-2.0 µg/l arzént tartalmaznak, bár egyes folyók torkolatánál nagyobb koncentrációk is előfordulnak, leginkább olyan helyeken, ahol emberi eredetű arzénszennyezés történik. (CULLEN, 1989a) A tengervíz domináns arzénformája az arzenát, de szignifikáns mennyiségű arzenit is előfordulhat fitoplanktonok és baktériumok redukciós tevékenysége során (FRANCESCONI, 1997). A tengervíz kis arzénkoncentrációjához viszonyítva felhalmozódás figyelhető meg az itt élő növényi és állati szervezetekben. A fejletlen élő szervezetek közül a legtöbb figyelmet a tengeri algák kapták. Ezekben az élőlényekben az akkumulált arzén koncentrációja 6–140 mg/kg (száraz anyag) arzénkoncentrációt is elérhet, mely többnyire arzenocukrok formájában van jelen (1. ábra/13–16). (EDMONDS, 2003) Ezen módosulatok nagy része vízoldható, ezáltal a gyakran használt extrakciós oldatokkal (víz vagy metanol-víz elegy) könnyen kinyerhetők. Ugyanakkor publikációban olvashatunk lipidoldékony arzenocukor módosulat előfordulásáról is (1. ábra/17). (FRANCESCONI, 1997) Az algákban, bár ezidáig többféle arzenocukor vegyületet azonosítottak, közülük csupán négy

fordul elő általánosságban: a glicerol-, a foszfát-, a szulfonát-, és a szulfát-arsenocukor (1. ábra/13–16) (EDMONDS, 2003).

Tengeri növényekről csak kevés arzénspeciációs adat áll rendelkezésünkre. Ezek szerint a bennük található módosulatok nem arsenocukrok. (MORITA, 1990)

A tengeri állatok arzénfelhalmozó képessége régóta bizonyított. Az 1. mellékletben összegyűjtöttem a fontosabb publikációkat a halak, kagylók és rákok teljes arzénkoncentrációjáról és speciesz-eloszlásáról. Bár a tengeri állatokban többféle arzénkomponens kimutatható, mégis a legtöbb esetben az AB a domináns módosulat.

A halak speciációs mintázata viszonylag egyszerű, a domináns AB jelenléte mellett kis mennyiségben dimetilált (arsenocukrok) és más trimetilált módosulatokat is kimutattak. Talán egyetlen kivétel a *Kyphosus sydneyanus*, melyben a legnagyobb mennyiségben detektált módosulat a TMAO volt. (EDMONDS, 1997) (1. melléklet)

A héjas állatokról szinte ugyanez elmondható: a teljes arzéntartalom nagy részét AB formájában tartalmazzák (1. melléklet). Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a legtöbb munkában az élőlények izomszövetét vizsgálták, míg más szövetek esetében a specieszössztétel sokkal komplexebb lehet. (MAHER, 1999) A haslábúak (kagylók) gyakran nagyon nagy mennyiségben tartalmazzák arzént (339 mg/kg) (FRANCESCONI, 1998), melynek nagy része szintén AB. A kagylók másik csoportja, a kéthéjú kagylók, melyek AB mellett szignifikáns mennyiségben TETRA-t is tartalmazhatnak, de ez utóbbi módosulat leginkább a kopoltyújukban gyűlik össze (SIOMI, 1987). Nagy mennyiségű arsenocukrot találtak néhány fésűkagyló ivarszervében (LAI, 1999). Bár kisebb figyelmet kaptak, de tengeri állatok esetében is érdemes megemlíteni a lipidoldékony arsenokomponensek előfordulását. Ezeket legtöbbször lipofil oldószerben extrahálják, majd savas/bázisos hidrolízist hajtanak végre, mely által a vízoldhatóvá vált lipideket HPLC-ICP-MS módszerrel mérik. Ezzel a technikával cápaszövetben több lipidoldékony arzénkomponens jelenlétét is igazolták. (HANAOKA, 1999a)

A fentiek szerint elmondható, hogy a tengeri állatok speciációs mintázata viszonylag egységes: túlnyomó részt AB jelenléte figyelhető meg.

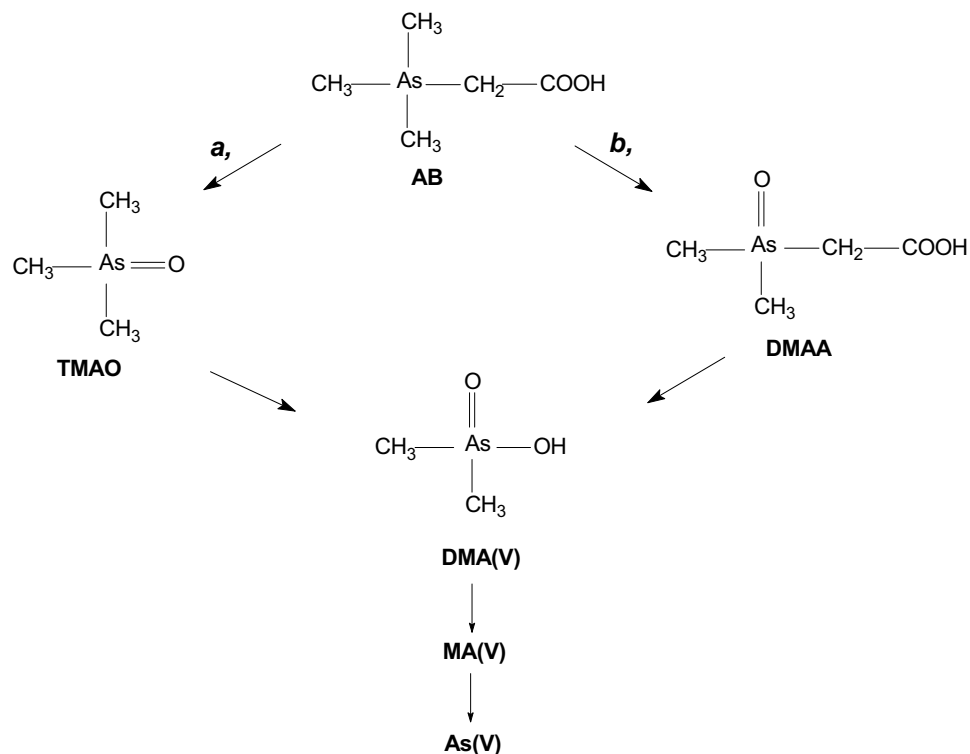
Vajon a tengeri élőlények speciációs elemzése mely tudományterület számára nyújt hasznos információt? Az első és legfontosabb terület az élelmiszer-tudomány. Mivel a tengeri halakban és kagylókban található domináns módosulat (AB) az egészségre ártalmatlan, az élőlények fogyasztása nem jár toxikus kockázattal még akkor sem, ha az étel teljes arzéntartalma több száz mg/kg mennyiséget is ér el. Ez a fontos megfigyelés újragondolásra készítette a halakkal kapcsolatos élelmiszertoxikológiai határérték megállapítását, melyet aztán 2003-ban a speciációs vizsgálati eredményekkel indokolva hazánkban is végleg eltöröltek. (Magyar Közlöny, 2003) A másik

tudományterület a környezetanalitika, mely az arzénformák bioszintézisének leírására használja a speciációs analitikai módszereket. A továbbiakban ezeket az eredményeket mutatom be. (EDMONDS, 2003)

3.10.2 Az arzénvegyületek környezeti körforgásáról alkotott elméletek

3.10.2.1 Az AB lebomlása mikroorganizmusok közreműködésével

Mint azt már az előbbieken vázoltam, furcsa ellentmondás, hogy az arzénmódosulatok a tengervízben szervesetlen, az élőlényekben viszont szerves formában vannak jelen. Az élőlények elhullásakor a bomló szerves anyag a tengerben szétoszlik, alkotórészei a vízbe kerülnek. Feltételezések szerint az élőlények alacsony szintjén tehát kell lennie egy folyamatnak, amely az arzén-szén kötések bontásával a szerves arzénvegyületeket szervesetlen módosulatokká alakítja. Az egyik első ilyen irányú kísérletet Hanaoka és munkatársai végezték, akik mikrobiológiai szervezeteknek tulajdonították a degradációs folyamatot. Kimutatták, hogy a tengeri élőlények közvetlen közelében élő aerob mikroorganizmusok néhány hónap alatt képesek az AB lebontására. (HANAOKA, 1995, KAISE, 1998). Az eredmények alapján felállították az AB mikrobiológiai konverziójának első feltételezett mechanizmusát (14. ábra, a).



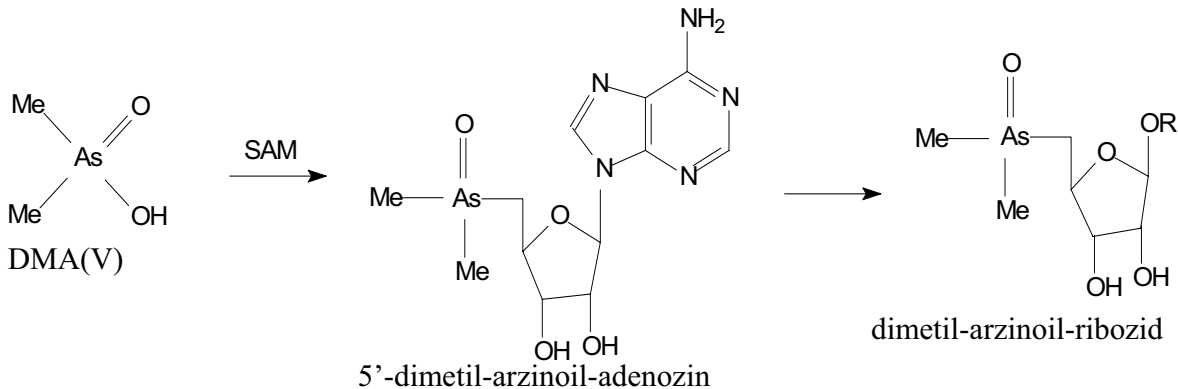
14. ábra Az AB lebomlásának feltételezett reakciója

Ezek szerint a biokonverzió a karboximetil-csoport lehasadásával kezdődik (TMAO keletkezik), melyet további demetilációk követnek. (HANAOKA, 1999b) Az utóbbi időben Khokiattiwong és munkatársai sokkal gyorsabb, órákon belül lejátszódó lebomlást figyeltek meg nem definiált, keverék mikroorganizmus kultúrák esetében. (KHOKIATTIWONG, 2001) A kísérletben TMAO keletkezését nem tapasztalták, hanem az előbbtől részben eltérő reakcióutat állapítottak meg. (14. ábra, b) Az első degradációs lépés a metilcsoport leszakadása, mely dimetil-arzinoil-acetát (DMAA) molekulát eredményez, majd a karboximetil-csoport leválása után dimetilarzinát (DMA(V)) keletkezik. Ezek az eredmények feltételezik, hogy az AB mikrobiológiai degradációja két úton valósulhat meg: egyik esetben elsődlegesen a karboximetil-csoport hasad le, másik esetben demetiláció történik. Az utóbb említett degradációs reakció mellett foglaltak állást Jenkins és munkatársai, akik már baktériumspecifikus kultúrákban vizsgálták a folyamatot. (JENKINS, 2003) Tengeri, kevert kultúras baktériumtelepből különítettek el összesen 11 baktériumfajt, melyek mindegyikét *Mytilus edulis* (ehető kékkgyló) vizes extraktját tartalmazó közegbe helyezték, majd inkubálták. A vizsgált baktériumfajok közül négy esetében volt kimutatható biokonverzió. Ezekben a táptalajokban 10 nap elteltével DMAA, 28 nap elteltével DMAA mellett DMA és nyomnyi As(V) jelenlétét mutatták ki. TMAO jelenlétét egyik faj esetében sem igazolták. Ez a kísérlet bizonyította, hogy a tengerben lejátszódó biodegradációs folyamatok bizonyos kitüntetett baktériumfajoknak tulajdoníthatók, melyek az AB-ből DMAA köztitermék létrejöttével DMA, majd As(V) keletkezését katalizálják. A szerző megkérdőjelezi a TMAO köztitermék keletkezésével járó biokonverziós út létezését. Felmerül a kérdés, hogy a baktérium számára milyen előnnyel jár ez a reakció? Vizsgálatok egyértelműen bizonyították, hogy a szerves arzénvegyületeket a baktérium nem használja fel szén- vagy energiaforrásként. (JENKINS, 2003) Sőt, mióta kiderült, hogy az AB nem toxikus vegyület, a reakció méregtelenítő (rezisztens) folyamatnak sem nevezhető. Jelenlegi ismereteink birtokában a kérdés megválaszolatlan.

3.10.2.2 *Az arzenocukrok bioszintézise*

Még nem teljesen ismert, hogy a tengeri algák miért abszorbeálnak arzenátot a tengervízből, és azt mi okból alakítják át oxo-arzenocukrokká. Lehetséges magyarázat, hogy az arzenát olyannyira hasonlít a fejlődésükhöz esszenciális foszfátióra, hogy az algaszervezet nem tud különbséget tenni a két vegyület között. A felvételre került arzenátot a növénynek méregtelenítenie kell mielőtt annak toxikus hatásai megnyilvánulnak. Ha ez a magyarázat helytálló, akkor tulajdonképpen az arzenocukrok egy méregtelenítő folyamat végtermékei. Bármilyen elgondolást is veszünk alapul, bizonyítást nyert, hogy a szerves arzénmolekulák szervessé alakításában oxidatív metilációs folyamatok vesznek részt. (3. ábra) (ROSEN, 2002) Ez a folyamat egy szekvenciális oxidáció, mely reakció intracellulárisan zajlik,

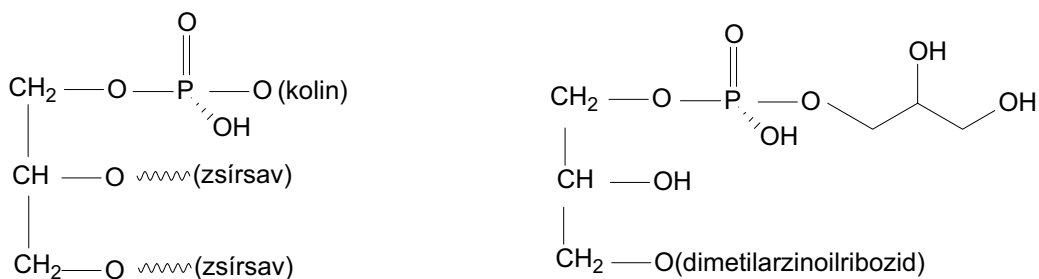
számos mikroorganizmus, valamint állati és növényi sejtek esetében is megfigyelt jelenség. (ROSEN, 2002) A metilációt általános metiláló ágensek - mint pl. az S-adenozil-metionin (SAM) - végzik, melyek egy sor enzimatikus folyamatban aktív metildonorként vehetnek részt. Az algák esetében is ebből a reakcióból kell kiindulnunk. Feltételezések szerint az algák, ahelyett, hogy bevezetnének egy harmadik metilcsoportot a DMA-hoz, az arzénatomhoz kapcsolnak egy SAM-ból származó adenzil-csoportot. (15. ábra)



15. ábra Arzenocukrok feltételezett bioszintézise

Ezt követően az adenin enzimatikus eltávolítása következik, majd az R-csoport különböző szénhidrátokkal (glicerol, tejsav, propilén-glikol stb.) való helyettesítése. (EDMONDS, 2003) A folyamattal egy sor, az algákban is detektált oxo-arzenocukor-komponens jelenléte magyarázható. (1. ábra/13–16) A feltételezést először 2004-ben Francesconi és Pergantis támasztotta alá kísérletes bizonyítékokkal. (FRANCESCONI, 2004b) A kutatók sikeresen detektálták a dimetil-arsinoil-adenozin reakcióközi terméket, eredményüket tandem MS készülékkel mért adatokkal is alátámasztották.

Az arzenocukrok közül az oxo-foszfát-cukornak kitüntetett figyelmet kell szentelnünk. Vizsgálatok szerint ez a komponens minden arzenocukrot tartalmazó élőlényben jelen van (barna algákban, kagylókban és a homár emésztő traktusában is). (EDMONDS, 2003) Az a megfigyelés, hogy míg az algákban négyféle oxo-arzenocukor jelenléte dominál, az őket fogyasztó élőlényekben (kagylók, homár), csak a foszfát-arzenocukor módosulat kimutatható, a vegyületnek központi szerepet feltételez. Valószínűsíthető, hogy a vegyület szintézise az állatok által is *de novo* megvalósulhat. Ha összehasonlítjuk a foszfát-cukor és a sejtszinten esszenciális foszfolipidek szerkezetét, látható a hasonlóság. Az 16. ábrán a foszfátidil kolin és a foszfát-arzenocukor képlete látható. A vegyületek glicerinvázát minden esetben foszforsav észteresíti, de míg előbbi esetben a molekula apoláris részt is tartalmaz, utóbbinál a harmadik szénatomhoz dimetil-arsinoil-ribozid kapcsolódik.



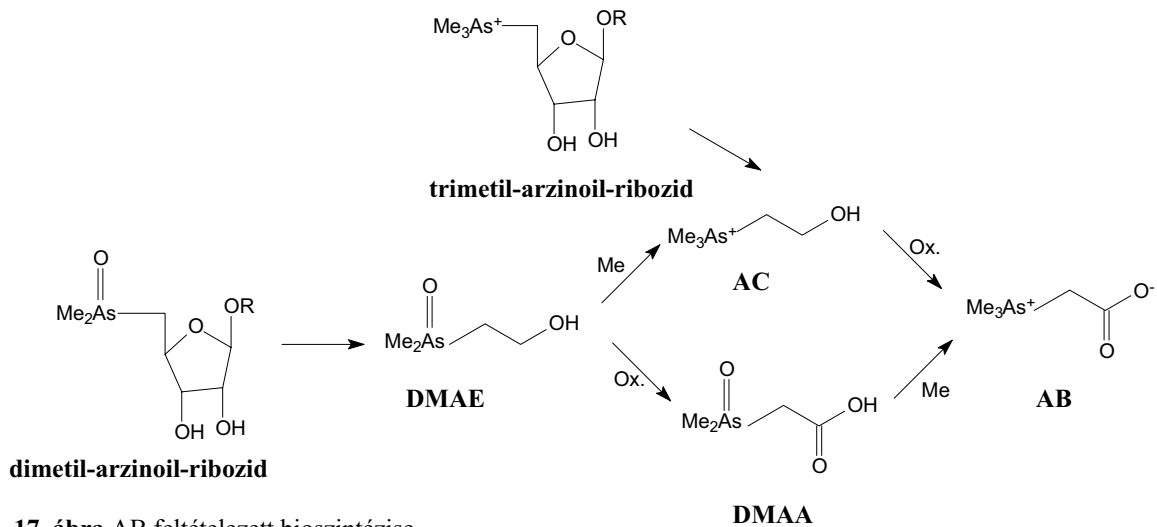
16. ábra Foszfatidil kolin és a foszfát arzenocukor kémiai szerkezete

Ezen a logikai vonalon haladva sikerült kimutatni szárazföldi élőlényekben (földigiliszta) olyan foszfát-arzenocukor komponenst is, melyben a glicerol-OH csoportját palmitinsav észteresíti. (EDMONDS, 2003) Ez alapján feltételezhető, hogy a membránalkotó foszfolipidek analógiájára a foszfát-arzenocukor vegyület is beépül a sejtmembránba, ezáltal feldúsulhat anélkül, hogy toxikológiailag káros hatást gyakoroljon az intracelluláris térre (detoxikáló folyamat). A beépült forma könnyebben elérhető az intracelluláris enzimek számára, ezáltal valószínűsíthető prekursora lehet más arzénmolekuláknak is (mint az AB).

3.10.2.3 *Arzenobetain bioszintézise*

A tengeri élőlényekben domináns módosulatként detektált AB bioszintézise már nem ilyen egyértelműen kikövetkeztethető. Míg a metilezéses folyamatoknak (SAM) nincs biológiai akadály, a karboximetil-csoport eredetére nem találtak magyarázatot. Az AB bioszintézisét két elmélet magyarázza. (1) Ha a tengeri tápláléklánc felépítését vesszük alapul, feltételezhető, hogy az algákat alkotó arzenocukor alakul át az állatokban található arzenobetainná. (2) A másik elmélet szerint, mivel a két forma együttes dominanciája élőlényekben nem figyelhető meg, a molekulák egymástól függetlenül keletkeznek.

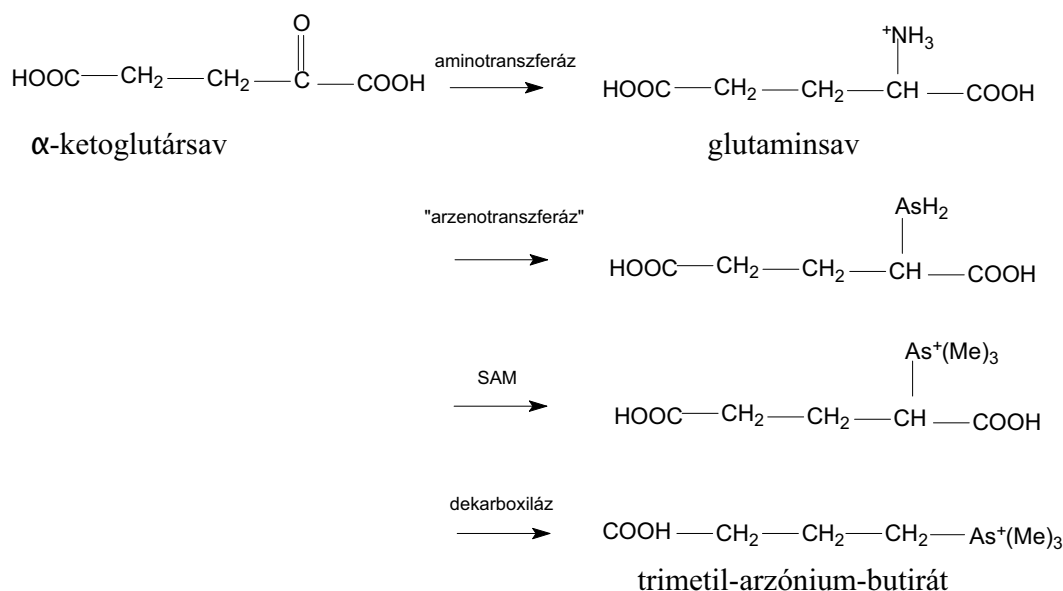
(1) Kísérletek számolnak be arról, hogy szintetikus vagy algákból izolált arzenocukor komponensek anaerob mikroorganizmusok jelenlétében szinte azonnal dimetil-arzinoil-etanol (DMAE) molekulává alakulnak (a ribóz gyűrű felnyílik) (17. ábra). (EDMONDS, 2003) A DMAE molekula oxidatív metilációja következtében vagy AC, vagy DMAA köztitermékeken keresztül AB keletkezhet.



Hangsúlyozandó, hogy a reakció második része csupán egy elmélet, és az is maradt, hiszen mindezidáig AC vagy DMAA jelenlétét a vizsgált mintákban nem bizonyították. Kutatók egy másik csoportja trimetil-arsenocukrokkal (trimetil-arsenoil-ribozid) táplált anaerob mikroorganizmusokat vizsgált. Az eredmények alátámasztották, hogy ha nem is az előző, de ahhoz hasonló reakcióút létezik, hiszen az oldatban nagy mennyiségben detektáltak AC-t. (17. ábra) (EDMONDS, 2003) Ebből a vegyületből már egyszerű oxidációval könnyen keletkeztethető AB. Felvetődik a kérdés, hogy az eddig csak nyomokban kimutatott trimetil-arsenocukor mennyisége mennyire összevethető a mg/kg nagyságrendben előforduló AB-nel? A válasz mindezidáig megválaszolatlan. Feltételezhetjük, hogy az arsenocukrokból keletkező AB szintézise – függetlenül attól, hogy DMAE keletkezésével vagy anélkül történik – nem kizárólag anaerob mikrobiológiai aktivitás sajátja, hanem magasabb rendű élőlényekben is előfordulhat. Erre bizonyítékot találtak napjainkban: McSheehy *et al* több feltételezett köztermék molekulát azonosított *Tridacna derasa* kagyló veséjében (mint pl. DMAE, DMAA, nyitott gyűrűs arsenocukrok, stb.), melyek mind az arsenocukor → arsenobetain reakció degradációs termékei. (MCSHEEHY, 2002) Végül, az elméletet alátámasztó eddigi vizsgálatok cáfolatára megfogalmazható a kérdés: ha az arsenocukrok mint prekursorok szerepelnének az arsenobetain bioszintézisében, akkor mivel magyarázzuk az AB előfordulását számos szárazföldi élőlényben (földigilisztában és gombában), ahol arsenocukrok előfordulása a jelenlegi módszerekkel nem volt megfigyelhető?

(2) A második feltételezés szerint az AB arsenocukroktól függetlenül képződik a tengeri állatok (vagy a velük szimbiózisban élő mikroorganizmusok) szervezetében. Az elmélet az arsenobetain szintézisét az aminosav-szintézis biokémiai folyamataival analóg módon képzelel el, az aminálás

helyett 'arzenilálás' reakcióval. (EDMONDS, 2003) Az elméleti reakcióút részletes közlése helyett egy példát mutatok be a folyamatra: a glutaminsav szintézisét aminotranszferáz enzimek közreműködésével (18. ábra).



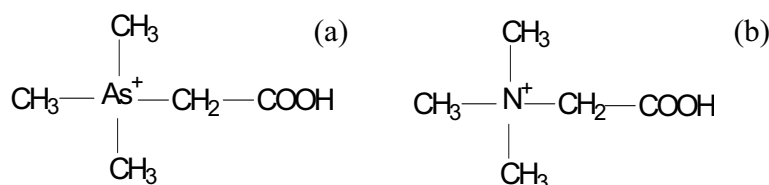
18. ábra Trimetil-arzónium-butirát feltételezett bioszintézise

Az arzén a nitrogénnel (és a foszforral is) azonos főcsoportban helyezkedik el, emiatt kémiai reakciókban is hasonlóságot mutat. Nem kizárt, hogy léteznek olyan enzimek, melyek célvegyületekben a nitrogén-atom nem obligát alkotó, azt a hasonlóság elvére alapozva arzén is helyettesítheti. A fenti reakcióban látható, hogy a feltételezett „arzenotranszferáz” és dekarboxiláz enzimek közreműködésével trimetil-arzónium-butirát keletkezik, mely az arzenobetainhez képest két metilcsoporttal többet tartalmaz. Ha az elmélet helytálló, akkor más oxo-karbonsavakból is eredeztethető a megfelelő arzénvegyület, mint például az oxo-ecetsavból (glixólsav) ezen módon levezethető az AB. Az elméletet 2000-ben támasztották alá kísérletekkel, amikor Francesconi és munkatársai Thaiföldön gyűjtött halakból először izolálták a trimetilarzenopropionát vegyületet, mely a fenti módon oxo-propionsavból keletkeztethető. (FRANCESCONI, 2000) (A vegyületet a szakzsargon AB-2-nek is nevezi, mivel az AB-től csak egy metilcsoporttal különbözik). A vegyület szerkezeti képlete az 1. ábrán látható. (1. ábra/9)

3.10.2.4 *Arzenobetain akkumulációja*

Az irodalmi adatok alapján felmerül a kérdés, hogy miért akkumulálódik ily mértékben az AB a tengeri állatokban, van-e a vegyületnek kitüntetett szerepe? Francesconi és munkatársai a N és az As

atomok hasonló elektronszerkezete alapján állítják, hogy az AB a glicin-betainnal analóg vegyület, mely utóbbi jól ismert ozmolit. (19. ábra) A tengeri élőlényekben a nitrogén-betainok $((\text{CH})_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_n\text{COO}^-$, $n = 1-5$) nagy mennyiségben kimutathatók, szerepük az ozmotikus egyensúly fenntartása a sejten belüli és a sejten kívüli tér között. A vegyületek közül a glicin-betain ($n = 1$) a legnagyobb koncentrációban előforduló molekula, a $-\text{CH}_2$ -csoportok számának növekedésével a koncentráció csökken. (FRANCESCONI, 1997, RANDALL, 1995) A *Mytilus californianus* kagylóban kimutatták egy glicin-betainra specifikus transzporter molekula jelenlétét, mely a vegyület sejtbe szállítását végzi. (WRIGHT, 1992) Az elképzelés szerint az arzenobetain – glicin-betain hasonlóság alapján feltételezhető, hogy a transzportmolekula mindkét vegyületet felismeri, ezáltal az AB intracelluláris feldúsulásáért is felelős lehet. A hipotézist elsőként Gailer és munkatársai támasztották alá kísérletekkel: bizonyították, hogy kagylókban az AB felvétele erősen csökkent, ha a tengervízhez glicin-betaint adagoltak. (GAILER, 1995) Később, Francesconi és kutatócsoportja az arzenobetain és két szintetikus előállított arzénvegyület, a trimetil-arzinoil-propionát (1. ábra/9), valamint a trimetil-arzinoil-butirát vegyületek (az AB-nél 1, ill. 2 metilcsoporttal hosszabb lánc) felhalmozását vizsgálták. Hasonlóan a nitrogén-betainokhoz, a rövidebb szénláncú alakok nagyobb mértékben akkumulálódtak. (FRANCESCONI, 1999a) A feltételezés további bizonyítására jelenleg is folynak kísérletek.



19. ábra Arzenobetain (a) és a glicin-betain (b) szerkezeti képlete

Látható, hogy a tengeri élőlényekben előforduló módosulatokat leíró vizsgálatok általában két okból készülnek: egyrészt, élelmiszer-toxicológiai célzattal meghatározzák a módosulatok arányát a mintákban, másrészt, a módosulatok bioszintézisének reakciómechanizmusait speciációs vizsgálatokkal bizonyítják.

Doktori munkámban mindkét szempontot figyelembe véve vizsgáltam meg különböző mintavételi helyeken gyűjtött tengeri kagylókat. Kísérleti eredményeimet a 5.3 fejezetben teszem közzé.

3.11 ARZÉNSPECIÁCIÓ GOMBAMINTÁKBAN

Az előző fejezetben láthattuk, hogy a speciációs irodalom a tengeri élőlények esetében viszonylag széles körű, az egyes arzénmódosulatok metabolizációs vonala nagyjából hozzárendelhető egy-egy kitüntetett élőlénycsoporthoz. A szárazföldi szervezetek esetében már ugyanez nem mondható el. Sokkal kevesebb az arzénspeciációs irodalom: a téma nem oly közkedvelt, mint a tengeri élőlények esetében. Ennek okát annak a ténynek tulajdoníthatjuk, hogy a szárazföldi szervezetek általánosságban kevesebb arzént halmoznak fel, mint a tengeriek, ezáltal a rendelkezésre álló technikák egy része nem képes ebben a koncentrációtartományban megbízható eredményt szolgáltatni a specieszek eloszlásáról. (Kivételként említenék néhány mintacsoportot, mint például a rizst (WILLIAMS, 2005), a páfrányféléket, (LI, 2005) az édesvízi kagylókat (SOEROES, 2005c).

A kalapos gombák is kivételt képeznek az előzőekben említett állítások alól. (KUEHNELT, 1997). Hiszen, mint a 70-es évektől kezdődően számos irodalmi adat is alátámasztja, hogy a kalapos gombák – ellentétben más szárazföldi élőlényekkel – képesek bizonyos fémeket/félfémeket termőtestükben nagy mennyiségben akkumulálni, sokszor a tengeri élőlényeket meghaladó mértékben is. Ezt felismerve az utóbbi évtizedben folyamatosan emelkedik a gombák arzénkoncentrációját meghatározó kutatások száma. A kísérletek célja kettős. Egy részük az ehető gombákat élelmiszer-toxikológiai szempontból vizsgálja, speciációs analitikai módszerekkel határozza meg a módosulatok eloszlását a mintákban, különös figyelmet szánva a leginkább mérgező szerves arzénformák előfordulására. Másik szempont a környezetmonitorozás, mely napjainkban egyre inkább kedvelt téma; azt vizsgálják, hogy a toxikus anyagok kumulációjára képes gombafajok alkalmasak-e a környezet szennyezettségi állapotának jelzésére. Ez utóbbi terület mind az ehető, mind a mérgező gombák teljes elemkoncentrációját vizsgálja. Doktori munkámban a gombaszervezetek speciációs vizsgálatát élelmiszertoxikológiai szempontok figyelembevételével végeztem.

Az elmúlt 20 évben a kalapos gombák, mint fontos funkcionális és ínycsikmány élelmiszerek egyre nagyobb szerepet kaptak a táplálkozásban. Míg az átlagos gombafogyasztás 1997-ben 1.0–1.5 kg/év volt személyenként, ez mára már 2.5–3.0 kg/évre tehető (Mezőgazdasági és Vidékfejlesztési Minisztérium, 2002). Bár a 'biotáplálkozást' népszerűsítő tevékenységek egyre inkább a vadon élő gombafajok fogyasztását ajánlják, még napjainkban is jóval gyakoribb a termesztett gombák fogyasztása. A gombák nagy fehérje- és ásványianyag-tartalommal, kevés szénhidrát- és zsírtartalommal jellemezhetők, ezáltal népszerű egészséges élelmiszerek. Ennek ellenére számos tanulmány beszámol a gombák egészségkárosító hatásáról is, mely leginkább a nehézfém-akkumuláló

képességüknek tulajdonítható. Az egyes gombákban nagy koncentrációban előforduló elemek közé tartozik az Pb, Hg, Cd, Cs, Se és az As. Stijve és munkatársai néhány fém és félfém akkumulációját vizsgálta termesztett *Agaricus brasiliensis* micéliumában valamint termőtestében. Arra a következtetésre jutott, hogy szinte minden elem a micéliumban nagyobb koncentrációban volt jelen, mint a termőtestben, mely utóbbi mintegy 'hígítva' tartalmazta a toxikus elemeket. (STIJVE, 2003).

Más kutatók széleskörű vizsgálati eredmények birtokában megállapították, hogy az elemek akkumulációja egyfelől függ a vizsgálandó elemtől, másfelől a gombafajtól. Legnagyobb mértékű felhalmozásról a kadmium és a higany esetében számoltak be. (KALAC, 2000) Annak ellenére, hogy bizonyítást nyert néhány gombafaj nagy mértékű arzénakkumulációs képessége is, az eddig megjelent mintegy 150 gomba kémiai elemzésével foglalkozó kézirat csak elenyésző hányada vizsgálja az arzénfelhalmozást.

Egyes gombafajok nagyobb mértékben képesek arzént akkumulálni – ide tartozik a *Laccaria amethystina* (BYRNE 1995), *Laccaria fraterna* (STIJVE, 1990), *Sarcosphaera coronaria* (STIJVE, 1990) és az *Agaricus* fajok (STIJVE, 1991, VETTER, 1989) –, melyek esetében gyakran előfordul 50-100 mg/kg arzénkoncentráció. (BYRNE, 1983, STIJVE, 1990) Az adatok nem szennyezett erdőterületről gyűjtött fajokra vonatkoznak, és szárazanyagra megadva értendők. Néhány *Agaricus* species, a *Laccaria laccata*, *Leposta nuda* és a *Lycoperdon perlatum* 5–10 mg/kg átlagos arzénkoncentrációval jellemezhető, míg az 1 mg/kg körüli érték általános a legtöbb gombánál. (SLEJKOVEC, 1996a, STIJVE, 1991, VETTER 1994) A legnagyobb arzénmegkötési képességet *Laccaria amethystina* esetében tapasztalták, mely nagy szenzációt keltett a kilencvenes években. (STIJVE, 1991, LARSEN 1998) Azóta is a legtöbb, gomba témakörben végzett arzénspeciációs munka ezzel a fajjal foglalkozik. Bizonyítást nyert, hogy abban az esetben, ha a gombát szennyezett területekről gyűjtik – pl. Koch közleményében egy kanadai aranybánya környezetéből –, az eddigiekhez képest sokszor meghaladó arzénkoncentráció is mérhető (410 mg/kg). (KOCH, 2000) Visszatérve témaválasztásom indoklásához tehát látható, hogy a gombamatrix arzénspeciációs elemzéséhez nem szükséges különlegesen érzékeny műszerezettség, mégis, toxikológiai szempontból nagyon fontos információt szolgáltat.

Az akkumuláció mértékét számos tényező befolyásolhatja. Fontos faktor a talajösszetétel, de a különböző fémek felvétele között nagy eltérés mutatkozik. A könnyen felvehető és felhalmozódó elemek között kell felsorolnunk a Cd-t, a Hg-t és a Cu-t, míg a Zn és a Fe kisebb koncentrációban található a termőtestben, mint a talajban. A közzétett biokoncentrációs faktorok 50-500 Cd és Hg esetében, míg csak 10^{-1} – 10^{-2} a Zn esetében. (GAST, 1988, SEEGER, 1982, TYLER, 1982, RÁCZ, 2000) Arzénre vonatkozólag – annak ellenére, hogy felhalmozása már bizonyítást nyert – nem állnak

rendelkezésemre biokoncentrációs adatok. A közlemények nagy része a gombában található arzénmódosulatokra összpontosít, a felvétel mechanizmusát és mértékét csak kevés esetben vizsgálja. Ezekből az adatokból az derül ki, hogy a termőtest kora vagy mérete nem befolyásolja az akkumuláció mértékét. Az atmoszférikus szennyezés szintén kevésbé befolyásoló paraméter, leginkább azért, mert a termőtest élethossza nagyon rövid (10–14 nap). Kalac *et al* véleménye szerint a fémkoncentráció szoros összefüggésben van a micélium korával és a termésérlelések közötti intervallum hosszával. A termesztett csiperkében a legnagyobb fémkoncentrációt a legkorábbi terméshullám esetében észlelték. (KALAC, 2000, RÁCZ, 1998)

A kémiai kutatások másik irányvonala a speciációs vizsgálatok, melyek már a különböző arzénmódosulatok eltérő toxikológiai tulajdonságait is figyelembe veszik. Larsen és munkatársai a köztudottan arzénakkumuláló *Laccaria amethystina* speciációs elemzésével foglalkoztak. A gombákat mind arzénszennyezett (As(V)), mind nem szennyezett bükkerdőből gyűjtötték. Speciációs eredményeik azt mutatták, hogy a szennyezett talajon élő gombák képesek metilálni az arzenátot, hiszen a gombákban talált módosulatok nagy részét DMA (68–74%), kisebb részét MA (0,3–2,9%) és TMAO (0,6–2,0%) formában detektálták. (LARSEN, 1998) Feltételezései mind a mai napig sok vitát kavarnak, egyes kutatók nem a gombaszervezet, hanem a talajban levő micélium közvetlen környezetében élő baktériumoknak tulajdonítják a metilációs folyamatokat. A teória ellen szól, hogy mindeztáig a talajban nem találtak szerves arzénmódosulatokat.

Arzenobetaint először Byrne mutatott ki bizonyos gombákban (BYRNE, 1995), mely jelzi, hogy az AB bioszintézise nem kizárólag a tengeri szervezetek sajátja. Ez alapján feltételezhető, hogy a szárazföldi bioszférában a tengerihez hasonló biometilációs folyamatok léteznek. A felfedezésnek nem elsősorban toxikológiai, hanem környezetanalitikai jelentősége van. Később, más szerzők által is bizonyítást nyert az AB előfordulása kalapos gombákban. (KOCH, 2000, SLEJKOVEC, 1997) Slejkovec és munkatársai 50 gombafaj arzénspeciációs vizsgálatát végezték el. A legtöbb esetben AB-t detektáltak legnagyobb mennyiségben, míg néhány gombafaj esetében (*Laccaria fraterna*, *Entoloma rhodopolium*, *Tricholoma sulphureum*) a szerves arzénmódosulatok mennyisége dominált. DMA és MA – általában – csak nyomokban fordult elő, kivételt képez ez alól a *Laccaria laccata*, ahol domináns módosulatként detektáltak DMA-t. (SLEJKOVEC, 1997) Említésreméltó a *Sarcosphaera coronari* gombában talált arzénmódosulatok aránya: az összes felvett arzénmennyiség (2000 mg/kg) szinte teljes egészében MA módosulatként volt jelen a termőtestben. (BYRNE, 1995) A kísérletek alapján úgy tűnik, hogy a megjelenő arzénmetabolizációs mintázat nagy mértékben függ a vizsgált gombafajtól.

A speciációs elemzések négy részből épülnek fel: kinyerés, elválasztás, detektálás és hitelesítés. A négy folyamat közül a kinyerés és a hitelesítés esetében beszélhetünk a legnagyobb bizonytalanságról,

hiszen a mérés eredménye nagy mértékben függhet az alkalmazott extrakciós technikától, pontossága csak a megfelelően megválasztott hitelesítő mátrixszal biztosítható. Felmerül a kérdés: vajon az alkalmazott kinyerési technika mennyiben befolyásolja a specieszek arányát? Az irodalmi adatok között erre a kérdésre választ nem találtam. Minden esetben a szerzők kalapos gombák vizsgálata esetén egyedi extrakciós technikákat használtak, amelyekkel többnyire 70–80% kinyerési hatásfokok érhetők el. Bebizonyosodott, hogy különleges felszereltséget – mint pl. fókuszált-mikrohullámú-technika – igénylő módszerekkel sem biztosítható magasabb kinyerési arány, a szokványos metanol-víz technikákkal összevetve. (LARSEN, 1998) Az irodalomban felsorolt módszerek között a metanol-víz arányban találtam különbségeket: Slejkovec és Kuehnelt például az 1:9, míg Koch az 1:1 metanol-víz arányt alkalmazta. (SLEJKOVEC, 1997, KUEHNELT, 1997, KOCH, 2000) Mindhárom esetben a mintákat éjszakán át szobahőmérsékleten rázatták. Byrne az előbb említett elegyet alkalmazta rövid, egyórás ultrahangozással. (BYRNE, 1995) Míg a kinyerhetőség szempontjából nem található szignifikáns eltérés az egyes módszerek között, a technikák idő és eszközigénye nagy különbségeket mutat. A metanolos fázis közvetlenül nem injektálható a HPLC-be, ezért előzetes elpárologtatás, majd vízben való visszaoldás szükséges. A bepárlást szobahőmérsékleten kell végezni (speciális műszer- és időigény), hiszen a módosulatok a magas hőmérséklet hatására könnyen átalakulnak egymásba. Nem utolsó sorban említendő a rázásos technika hosszabb időigénye az ultrahangoshoz képest.

3.12 ARZÉNSPECIÁCIÓ ÉDESVÍZI KÖRNYEZETBEN I. – ÉDESVÍZI HALAK

Az elmúlt tíz év intenzív speciációs kutatásainak köszönhetően a tengeri környezet arzénspeciációs folyamatai többé-kevésbé feltérképezettek. Ismert, hogy a tengervízben található szerves arzént az algák és zoo-planktonok felveszik, majd dimetilált arzénkomponensek (főként arzenocukrok) formájában felhalmozzák. Feltételezés, hogy a halak és kagylók tovább metilezik a felvett arzeno-komponenseket, leginkább a trimetilált arzenobeténé, mely nem toxikus módosulat. Ezen adatok alapján 2001-ben az Európai Közösség 466/2001/EK számú rendeletében eltörölte a tengeri halak és kagylók arzéntartalmára vonatkozó határértéket.

A hazai táplálkozási szokások nagyban különböznek a tengerparti országokétól: zömében édesvízi eredetű halakat fogyasztunk. A Haltermelők Országos Szövetségének és Termék Tanácsának felmérése alapján hazánkban fokozatosan nő a halfogyasztás, a 2005-ös évben már elérte a 3.4 kg/fő/év mennyiséget is, mely az előző évhez képest 0.2 kg-os emelkedés. A fogyasztás több mint felét a belföldi édesvízi halak adják – elsősorban a ponty. (FVM, 2005) A hazai halfogyasztásban egyelőre az ünnepekhez kötődő tradíciók a meghatározók, de a korszerű táplálkozást indítványozó propagandák állást foglalnak a nagyobb mértékű halfogyasztás mellett. Az egészséges táplálkozásban kiemelkedően fontos szerepe van a halaknak. A halhús olyan könnyen emészthető értékes táplálékunk, amelyekben létfontosságú tápanyagok egész sora található kedvező arányban. Fehérjetartalmuk megegyezik a húsokéval, zsírtartalmuk szerint vannak zsíros (ponty, harcsa, angolna) és száraz húsú halak (busa, amur, süllő). A halhús vitamin és ásványianyag-tartalmát illetően nagyon értékes, fontos forrása a D-, E-, A-vitaminnak, a B-vitaminok közül elsősorban a B12-vitaminnak, valamint fogyasztása hozzájárul a szervezet kalcium, magnézium, vas, szelén, jód és főként cink ellátásához is. (HAJÓS, 2000)

Az édesvízi halak nagymértékű ásványianyag-tartalmának hátterében sokszor az elemakkumuláló képességük áll: a halszervezet nemcsak az esszenciális, hanem a toxikus elemeket is képes felhalmozni, mint pl. az arzént. Mivel az Európai Unió eltörölte a halak arzéntartalmára vonatkozó határértéket, jelenleg nincs igény arra, hogy a hazai édesvízi eredetű halak arzénszennyezettségét mérjük. Ez a hozzáállás azért nem helyes, mert feltételezhető, hogy az édesvízi bioszféra a tengeritől nagy mértékben különbözik (ásványi anyag összetétel, mikrobiológiai és makrobiológiai tényezők), miáltal eltérő biokémiai folyamatok történhetnek: más, az AB-nél toxikusabb arzénformák halmozódhatnak fel a halhúsban. Bár a tengerparti országok arzénspeciációs laboratóriumai körében a téma nem közkedvelt, ennek ellenére néhány publikáció alátámasztja ezt a feltételezést.

Irodalmi adatok alapján megállapítható, hogy az édesvízi halak nem képesek oly mértékben akkumulálni a toxikus elemeket, mint tengeri társaik. Ez a megállapítás az arzénre is igaz. A 2. mellékletben összegyűjtöttem azt a néhány közleményt, melyek a témában megjelentek. A munkák egy része mérés előtt a mintát liofilezi, majd a teljes arzénkoncentrációt száraz anyagra számolja. Másik lehetőség a minták közvetlen roncsolása, mely esetben a minta víztartalma is a roncsolmányba kerül, ezért az érték nedves anyagra értendő. Tudni kell, hogy a halak víztartalma kb. 70-80%, ezáltal a nedves anyagra számolt értékeket 3.3-5-tel beszorozva száraz anyagra átszámolhatók. Mint látjuk, a száraz anyagra számolt teljes arzéntartalom egyik minta esetében sem haladja meg a 10 mg As/kg értéket, mely koncentráció a tengerből gyűjtött halak esetében általánosan jellemző. (SCHAEFFER, 2005) Ezáltal tehát elmondható, hogy az édesvízi halak arzénakkumulációs képessége a tengeri halakhoz képest szignifikánsan kisebb. Még szembetűnőbb ez a megállapítás, ha figyelembe vesszük, hogy a tengervíz átlagos arzéntartalma csupán 0.5-2 ng/ml (NAKAZATO, 2002, CULLEN, 1989a), szemben a táblázatban szereplő édesvízi irodalmak egy részével, ahol a minták arzénnel szennyezett vízgyűjtő területekről származnak.

Ismeretes, hogy a tengeri halak esetében a felhalmozott arzénmennyiség kinyerési hatásfoka víz vagy metanol/víz oldószer/elegy extrakciós médium alkalmazásakor kb. 100%, hiszen az élőlények számára „inert” AB könnyen, nagy hatásfokkal kinyerhető a vizsgált mintából. A metanolos technikák esetében az extrakciót bepárlás, valamint vízbe visszaoldás követ, melynek eredményeképpen a módosulatok vizes oldatban lesznek jelen. Ezekkel a technikákkal tehát csupán a vízzoldható komponensek kivonása történik. Édesvízi halak esetében ugyanezen extrahálópáramétereket alkalmazva a kinyerési hatásfok sokkal kisebb, hiszen, mint a 2. mellékletből is látszik, nem ritka az 50% alatti érték. Talán az egyetlen kivétel a Slejkovec munkája során vizsgált *Salmo marmoratus*, mely esetében a kb. 4 mg/kg felhalmozott arzénmennyiség (száraz anyagra számolva) 90%-át sikerült a vizes fázisba juttatni. Másik szélsőséges eset ugyanezen munkában a *Silurus glanis*, ahol csupán a teljes arzénmennyiség 0.4 %-a extrahálódott. (SLEJKOVEC, 2004) Az alacsony kinyerhetőség oka egyelőre ismeretlen. Feltételezhető, hogy ezekben az esetekben az arzén olyan ismeretlen módosulat formájában van jelen a mintában, mely erősen kötődik a mátrixhoz, ezért a hagyományos módszerekkel nem kivonható. Másfelől számíthatunk arra is, hogy a minták magas zsírtartalma tartja oldva az esetlegesen lipofil arzénmódosulatot. Ilyen irányú vizsgálatokról irodalmi adatokat nem találtam.

A kinyert arzénvegyületek speciációs vizsgálata sem mutat egységes képet. Bár sok esetben az extrahált arzén nagy része AB formájában van jelen, mégis, a tengeri halakhoz hasonló nagy arányú (>90%) AB dominancia nem jellemző. (SLEJKOVEC, 2004, HUANG, 2003, KOCH, 2001) Kaise és munkatársai HG-GC technikát alkalmaztak arzénspeciációs analízisre, így a vegyületek pontos

szerkezetét nem tudták megállapítani, csak azt, hogy a molekula hány metilcsoportot tartalmaz. Ezek alapján azonban feltételezhető, hogy a trimetilált módosulatok háttérében AB áll. (KAISE, 1997)

Fontos kérdés, hogy mivel indokolható az AB kisebb arányának jelenléte édesvízi halakban. A kérdés magyarázatául szolgálhat a 2.2 fejezetben közzétett elmélet, miszerint az AB glicin-betainhoz való hasonlósága miatt – mint ozmolit – halmozódik fel nagy mértékben a tengervízben élő halak szervezetében. Az édesvízi környezet ozmotikus koncentrációja kisebb, ezáltal nincs számottevő szerepe az ozmolit molekuláknak, így az AB felhalmozása sem számottevő. A fent említett publikációktól eltérően Zheng és munkatársai a toxikus szervesetlen arzénmódosulatok domináns jelenlétét tapasztalta *Perca flavescens* és *Lepomis gibbosus* halakban. (ZHENG, 2004) Más közleményekben az AB mellett dimetilált (DMA vagy arzenocukrok) arzénmódosulatok nagyobb arányú előfordulásáról számolnak be. (SLEJKOVEC, 2004, HUANG, 2003, KOCH, 2001)

A közzétett kéziratok esetében hiányosságként említendő a reprezentatív mintavétel, hiszen kellően nagy számú minták esetében az eredmények megbízhatósága jobban garantált. Sok esetben a következtetéseket csupán egy-egy halminta alapján vonták le, mely nem helyes, hiszen a helyüket gyorsan változtatni képes halak speciációs mintázata erősen függ a környezeti paraméterektől (gondoljunk a folyami körülményekre).

Az édesvízi halak speciációs analízisének minőségbiztosítására sajnos nem rendelkezünk megfelelő hitelesített anyagmintával. A tengerihal-mátrix használata – annak ellenére, hogy halminta – éppen olyan hibás, mintha növényi mátrixot használnánk. Hiszen még egyszer hangsúlyozandó: a tengeri szervezetek ásványianyag összetétele nagyban eltérhet az édesvízi rokonaiktól.

Az irodalmi áttekintés alapján láthatjuk, hogy az édesvízi halak esetében a kevés információ birtokában egyelőre nem tudunk egyértelmű következtetéseket levonni sem az arzénakkumulációval, sem pedig az arzénmódosulatok előfordulásával kapcsolatban. Magyarország ebben a témában különösen érintett. Egyrészt sok édesvízi halat fogyasztunk, másrészt pedig a fogyasztott halak egy része természetes vizekből, a hobbihorgászok tevékenysége során kerül asztalunkra. Ismeretes, hogy a dél-alföldi régió rétegvizei arzénrel szennyezettek, és ezen arzénmennyiség egy része a vízrendszerek találkozásával a felszíni vizekbe is átszivároghat. Ez esetben számítanunk kell arra, hogy a halak az arzént szervezetükbe beépíthetik esetlegesen toxikus módosulat formájában. A felszíni vizek érintettségén túl fontos problémát vet fel a trópusi területen őshonos afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) tenyésztésének hazai lehetősége. Az afrikai harcsát hivatalosan először 1984-ben hozták be hazánkba, napjainkban azonban már tizenöt-húsz kisebb-nagyobb halgazdaságban tenyésztik. Két évvel ezelőtt már 500 tonnányit értékesítettek, azóta két telep szakosodott az ivadék nevelésére, és egyre több farm foglalkozik a hizlalás céljából történő szaporítással Magyarországon. Melegvízi állat lévén, az afrikai

harcát hazánkban csak termálvizekben vagy az erőművek hulladékhőjét hasznosító gazdaságokban tudják tenyészteni. E telepek egy része a dél-alföldi régióban található (Szarvas, Szajol, Biharugra), más része pedig a dunántúli hőforrások környékén. A dél-alföldi területen feltörő termálvíz (rétegvíz) geokémiai helyzetéből adódóan arzénnel erősen szennyezett (4.2 fejezet), mely a halak izomzatában feldúsulva fontos toxikológiai vizsgálatokat tesz indokolttá.

A fentiek miatt doktori munkámban a dél-alföldi régió felszíni vizeiben valamint termálvizeiben tenyésztett halak arzénspeciációs elemzését végeztem el. Mérési eredményeimet a 5.5 fejezetben teszem közzé.

3.13 ARZÉNSPECIÁCIÓ ÉDESvíZI KÖRNYEZETBEN II. – ÉDESvíZI KAGYLÓK

Az előző fejezetben bemutattam, hogy az édesvízi környezet arzénspeciációs szempontból eltérést mutat a tengerihez képest. Az édesvízi környezetben végbemenő arzénnel kapcsolatos biokémiai folyamatok tehát feltehetőleg nem azonosak a tengeri környezetben lejátszódó folyamatokkal, mely további érdekes kérdéseket vet fel az arzén környezeti körforgásáról. Munkám során folytattam az édesvízi arzénspeciáció témakörében megkezdett kutatásokat, azonban már nem élelmiszertoxikológiai, hanem környezetkémiai szempontokat figyelembe véve. Azért esett a választásom az édesvízi kagylókra, mert irodalmi feljegyzésekben gyakran szerepelnek mint biológiai monitorszervezetek, mivel a tengeri rokonaikhoz hasonlóan nagy mennyiségben képesek bizonyos elemeket/vegyületeket akkumulálni. Ha ez arzénre is igaz, akkor még alacsony kinyerési határfok mellett is számíthatok jól mérhető arzénmennyiségre.

A kagylók az édesvízi bioszféra fontos szereplői. Mint a tápláléklánc közbenső tagjai fitoplanktonokat, kis zooplanktonokat, baktériumokat valamint szerves törmelékeket fogyasztanak. A tápláléklánc következő szintjén a halak és kisebb vízi emlősök állnak, melyek előszeretettel fogyasztanak kagylókat. A kagylókat illető „élő szűrő (living filter)” elnevezés abból adódik, hogy a vizet – a benne levő táplálékkal együtt – testükön átáramoltatják, miközben a számukra értékes tápanyagokat visszatartják. Ezáltal fontos szerepük van a víz biológiai tisztításában. A kagylók szűrő tevékenységüknel fogva toleránsnak bizonyultak bizonyos minőségű és mennyiségű szennyezéssel szemben, ezáltal azokat szervezetükben felhalmozni képesek. A felhalmozás mértékéből, valamint a kagylókon mutatkozó változásokból (jelenlétük, számuk, viselkedésük) következtethetünk a környezet szennyezettségi állapotára (ezen definíció alapján nevezzük őket biomonitor-szervezeteknek). Az édesvízi kagylók nagy akkumulációs képességüknek köszönhetően jó biológiai indikátorai mind a nehézfémeknek, mind a szerves szennyezőknek. (DEKOCK, 1993, MERSH, 1993). Mindezen tulajdonsága alapján a hazai honos kagylók közül a vándorkagyló (*Dreissena polymorpha*) kapott kitüntetett szerepet az ökológiai vízminőség monitorozásában. 1996-ban íródott az a tanulmány, mely Magyarországon elsőként telepített vándorkagylókat a Duna teljes hazai szakaszára 9 ponton – vízminőség-ellenőrzés céljából. A kihelyezést követő 7. hét elteltével a kagylók szöveti nehézfémkoncentrációját (Ag, Co, Cu, Mn, Pb, Cd, Cr, Fe, Ni, Zn) határozták meg, ezáltal felmérték a szennyezettség szezonális ingadozását. (OERTEL, 1997) A fentiekén túl ugyanezen kagylókat alkalmazták hidrofób szennyezők (mint a PCB-k és PAH-ok) monitorozására a közelmúltban. (ROPER, 1996)

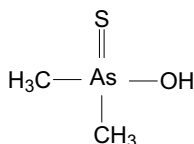
Az édesvízi kagylókban mért teljes arzénkoncentráció a tengeri kagylók koncentrációtartományába esik (mg/kg száraz anyagra vonatkoztatva), azaz szignifikánsan magasabb más édesvízi élőlényekhez képest. (KOCH, 2001, SOEROES, 2005c) Ennek ellenére kevés arzénspeciációs tanulmány foglalkozik az édesvízi kagylókkal. A munkák legnagyobb része arzénszennyezett vízben nevelt állatok akkumulációs/metabolizációs képességét vizsgálja, csupán két olyan közleményt találtam, melyekben természetes körülmények között gyűjtött kagylókat vizsgálnak. Slejkovec és munkatársai vándorkagylókat gyűjtöttek szlovéniai folyókból. Speciációs vizsgálataik szerint a kagylókból kinyert arzén 51%-a AB/TMAO formájában volt jelen (analitikai módszerük nem tudott különbséget tenni a két vegyület között). Munkájukban feltételezték, hogy ez a komponens a tengeri kagylókhhoz hasonlóan AB. (SLEJKOVEC, 2004) Ezzel szemben Koch és kutatócsoportja azt találta, hogy *Margaritifera sp.* kagylókban AB nem detektálható, a módosulatok nagy része DMA és arzenocukor. (KOCH, 2001) Ugyanez a kutatócsoport még *Anadonta* fajokat is vizsgált, melyek esetében szintén az arzenocukrok domináns előfordulását tapasztalta.

A tio-arzén vegyületek a szervesarzén-módosulatok egy új csoportját alkotják, melyeket csak az utóbbi években mutattak ki környezeti mintákban (HANSEN 2004).

Az arzén biokémiájában központi szerepet tulajdonítunk a biometilációs folyamatoknak, melyek kéntartalmú vegyületek (pl. S-adenozil-metionin, SAM) segítségével valósulnak meg. Köztudott, hogy az arzénnek különleges affinitása van a kénhez, és ezáltal az arzenit előszeretettel kötődik kéntartalmú proteinekhez és peptidekhez, mint pl. a glutation (GSH) (SUZUKI, 2002), metallothionein (TOYAMA, 2002), aktin és tubulin (MENZEL, 1999), galektin I tioredoxin peroxidáz II. (CHANG, 2003). Ez a kölcsönhatás tehát feltételezi, hogy az arzenit nem szabadon, hanem kénhez kötődve fordul elő az intracelluláris térben. A GSH nagy koncentrációban (mM) jelen levő makromolekuláris alkotója a sejteknek, ezáltal gondolható, hogy főként ez a molekula felelős az arzenit intracelluláris kötődéséért. Ennek ellenére a kutatások *in vivo* is kimutatták, hogy a GSH nagy mennyisége ellenére más SH-proteinekhez is kötődik szignifikáns mennyiségű arzenit. A fentiek alapján elmondható, hogy a sejten belüli arzénkomponensek összetételét és mennyiségét nagy mértékben befolyásolja a jelen levő kéntartalmú nagymolekulák jelenléte.

Annak ellenére, hogy az arzén nagy affinitással kötődik a kénhez, természetes mintákban mindezidáig nem mutattak ki trimetilált/trialkilált kéntartalmú ($R_3As=S$) komponenseket, azonban dimetilált kéntartalmú molekulák jelenlétét már több publikációban is jelentették. Ilyenek például az öt vegyértékű DMAA valamint DMA tio-formája, melyeket birka vizeletében mutattak ki arzenocukortartalmú algák fogyasztását követően (20. ábra) (HANSEN 2004). Ezekben a

vegyületekben a kén kettős kötéssel kapcsolódik az arzénhez. A kéntartalmú módosulattá alakítás (redukció) bakteriális lehetőségéről számolt be Yoshida és Kuroda, akik patkány bélcsatornájából gyűjtött baktériumokat (*E. Coli* A3-6) inkubáltak DMA(V) és cisztein keverékével. A táptalajban tio-DMA volt kimutatható. (20. ábra) (YOSHIDA, 2001, KURODA, 2001).



20. ábra Tio-DMA(V) vegyület szerkezeti képlete

A tio-arzén módosulatok szintetikus előállítás viszonylag egyszerű és már régóta közzismert: a megfelelő oxovegyület oldatán keresztül H_2S gáz átbuborékolásával megoldható. Ezt figyelembevéve elképzelhető, hogy a tio-módosulatok bioszintézise is hasonló módon történik, azaz a kéntartalmú makromolekulák bomlása következtében H_2S keletkezik. Korábban bebizonyosodott, hogy az L-cisztein molekula *E. coli* baktériumok közreműködésével gyorsan H_2S lehasadásával bomlik. (BERGLIN, 1985) Emlős állatok szöveteiben az L-cisztein \rightarrow H_2S bomlásnak több reakciómechanizmusa is ismert. (JULIAN, 2002) A cisztein deszulfhidrációs folyamat a kutatások szerint legintenzívebb az agyszövetben, de a májban és a vesében ($0.02 \mu\text{mol H}_2\text{S}/\text{perc} \times \text{g}$) is számottevő. (STIPANUK, 1982, WARENYCIA, 1989). A szövetekben található nagy mennyiségű H_2S talán magyarázhatja a tio-arzén komponensek előfordulását.

Mint korábban említettem, ezeket a vegyületeket csak az utóbbi időben fedezték fel, annak ellenére, hogy az arzenit affinitása a kénhez ismert, valamint az is köztudott, hogy a sejtekben bőségesen található kéntartalmú peptid, protein. Késői felfedezésük oka az analitikai módszerek korlátozottságára vezethető vissza, ugyanis a komponensek retenciós viselkedése, stabilitása, kinyerhetősége eltér az oxo-analógoktól. Erre adott példát Hansen és munkatársa, akik alga-extraktumot (arzenocukrok) kezeltek birka májsejt (kénvegyületek) citoszollal. Kísérletükben kiderült, hogy a 92%-ban oxo-arzenocukrot tartalmazó alga extraktumban két ismeretlen komponens csúcsa jelent meg. ES-MS technikával bebizonyították, hogy ezek a két domináns arzenocukor komponens tio-módosulatai. Kísérletükben bemutatták, hogy a szokványos anion- és kationcserés elválasztástechnikai módszerekkel az ismeretlen vegyületek egyike nagyon hosszú retenciós idővel eluálódik (anioncsere esetén 3 óra, kationcsere esetében 45 perc). A könnyebb azonosítás érdekében magasabb pH-t alkalmaztak, miáltal a két tio-módosulat egymástól 10 perc alatt jól azonosíthatóan elvált. Munkájukban azt is bizonyították, hogy a tio-vegyületek az extraktumban oly instabilak, hogy 24 órás szobahőmérsékleten tartás után

100%-ban oxo-módosulattá alakultak. A kísérletükből bizonyítást nyert, hogy a standard analitikai módszerek nem alkalmasak a tio-vegyületek azonosítására. (HANSEN, 2004) Ezáltal tehát feltételezhető, hogy az eddigi irodalmi adatok alulbecsülték az arzénmódosulatok környezeti szerepét, legfőképpen a tio-módosulatokét, melyek valószínűleg az elkövetkezőkben sokkal nagyobb nyilvánosságot kapnak.

Az édesvízi kagylókban elsőként azonosított tio-arsenocukor vegyületekről a 5.6 fejezetben számolok be.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

Mintavételezést követően a szilárd mintákat ioncserélt vízzel alaposan átmostam, majd fagyaszttva szárítási technikával vízmentessé tettem, amihez Christ Alpha 1-4 (Christ, Németország) készüléket használtam. A vízmentes mintákat laboratóriumi darálóval (Fritsch 14.702, Németország) porítottam és homogenizáltam. A teljesarzen-meghatározáshoz, valamint a speciációs elemzésekhez a homogén pormintákat használtam.

4.1 A teljesarzen meghatározásához végzett mintaelőkészítés

A meghatározáshoz a mintákat nedves roncsolással készítettem elő, melyhez kétféle berendezést alkalmaztam: (i) alacsony nyomásállóságú teflonbombákat, illetve (ii) nagy nyomásállóságú roncsolóberendezéseket (Mutiwave 3000 mikrohullámú feltáró, Anton Paar, Ausztria; HPA-S feltáró/hamvasztó, Anton Paar, Ausztria; Milestone ultraCLAVE II feltáró, EMLS, Németország).

Az első esetben a bombák nyomásállósága kb. 2 bar. A roncsolóedényekbe műanyag spatulával 200–300 mg száraz pormintát mértem, azokhoz 2-2 ml koncentrált salétromsavat és hidrogén-peroxidot adtam, majd az edényzetet lefedtem és legalább 8-10 órán keresztül állni hagytam, hogy az oxidáció során keletkező gázok jelentős része eltávozhasson. Ezután a teflonbombákat lezártam, és laboratóriumi nyomástartó edényben 1 óráig 110 °C hőmérsékleten tartottam őket. Kihűlés után a bombák tartalmát maradék nélkül ioncserélt vízzel 10–50 ml-es mérőlombikba mostam át, melyeket jelre töltöttem.

A nagynyomású roncsolóedények nyomásállósága 30–40 bar. Az edényekbe – melyek teflonból (Mutiwave 3000 és HPA-S) vagy kvarcból (Milestone ultraCLAVE) készültek – 200–500 mg száraz pormintát mértem be, majd a mintákhoz 4–5 ml koncentrált salétromsavat adtam. Az edényeket lezártam, majd a rendszert a roncsolási program szerint 200–250 °C hőmérsékletre fűtöttem. A roncsolási idő felfűtéssel együtt 60–120 percrek adódott. A mintákat kihűlés után az előzőekhez hasonlóan lombikba mostam, a lombikokat jelig töltöttem.

4.2 A teljesarzen meghatározására használt berendezések és módszerek.

A teljesarzen-meghatározáshoz munkámban ICP-AES (Thermo Jarrel Ash ICAP-9000), ICP-TOF-MS (Leco Renaissance, Franciaország) és ICP-Q-MS (Agilent 7500ce, Németország) műszereket használtam. Az ICP-AES méréseket Bertényiné Divinyi Zsuzsa egyetemi tanársegéd végezte.

A roncsolt mintákat – kézi adagolás közvetítésével (ICP-TOF-MS) vagy automata mintaadagolóval (ICP-Q-MS) – perisztaltikus pumpa szállítja az ICP-MS detektorba, mely elemspecifikus detektorként szolgál. A mérést a 75 tömeg/töltés aránynál végeztem (⁷⁵As), emellett folyamatosan rögzítettem a 77-es (⁴⁰As³⁷Cl és ⁷⁷Se) és a 82 (⁸²Se) tömeg/töltés arányokat is az esetleges ArCl interferenciák azonosítása érdekében. A teljes arzénkoncentráció detektálási határai oldatra vonatkozóan 3.5 ng/ml (ICP-TOF-MS) és 0.1 ng/ml (ICP-Q-MS). Az alkalmazott mérési paramétereket a 7-8. táblázat tartalmazza.

7. táblázat ICP-TOF-MS készülék működési paraméterei

<i><u>Műszerparaméterek</u></i>		
Kicsatolt plazma teljesítmény		1250 W
Iontükör alacsony feszültsége		191 V
Iontükör alacsony feszültsége		1526 V
Porlasztó gáz		1.08 ml/perc
Porlasztó típusa		Meinhard
Mintavevő kónusz		Nikkel, 1mm-es réssel
Belső mintatvevő (szkimmer)		Nikkel, 0.4mm-es réssel
Mintavételi mélység		5.8mm
<i><u>Mérési paraméterek</u></i>		
Monitorozott tömegek		⁷⁵ As, ⁷⁷ Se vagy ⁴⁰ Ar ³⁷ Cl, ⁸² Se
Integrációs idő		3s
Ismétlések száma		3
<i><u>Ionkiütések</u></i>		
Start (us)	Szélesség(us)	Kiütött ionok (amu)
0.916	0.118	12-16
1.204	0.360	23-40
1.781	0.030	56
2.089	0.030	80

8. táblázat ICP-Q-MS készülék működési paraméterei

<i><u>Műszerparaméterek</u></i>		
Kicsatolt plazma teljesítmény		1500 W
Visszavert teljesítmény		<1W
Plazma gáz		14.6 l/perc
Öblítő gáz		0.95 l/perc
Porlasztó gáz		1.15 l/perc
Porlasztó típusa		Babington
Ködkamra		2°C-ra hűtött
Mintavevő kónusz		Nikkel, 1mm-es réssel
Belső mintatvevő (szkimmer)		Nikkel, 0.4mm-es réssel
Mintavételi mélység		5.8mm
<i><u>Mérési paraméterek</u></i>		
Monitorozott tömegek		⁷⁵ As, ⁷⁷ Se vagy ⁴⁰ Ar ³⁷ Cl, ⁸² Se
Integrációs idő		3s
Ismétlések száma		5
Öblítési idő		60s, 2ml/perc
Stabilizációs idő		60s, 0.4ml/perc

4.3 Arzénspeciációhoz alkalmazott mintaelőkészítés

A különböző mintaelőkészítési technikákat az 'Eredmények' fejezetben az egyes mintatípusoknál részletesen tárgyalom. A módszerekben azonban annyi közös, hogy a bemért mintákhoz (200–500 mg) 10 ml térfogatban extraháló szert adagolok és a kinyerést energiaközléssel végzem – például rázógép, hő vagy ultrahang segítségével. Extrahálószernek ioncserélt vizet, metanolt, vagy a kettő elegyét alkalmaztam. A műveletet követően a szuszpenziót centrifugáltam (Hettich Zentrifugen, Németország), metanol esetében bepároltam (Maxi Dry Lyo, Dánia), majd a maradékot 10 ml ioncserélt vízben oldottam fel. A felülúszót, illetve az így kapott oldatot cserélhető membránlappal ellátott 0.45 µm pórusátmérőjű cellulóznitrát fecskendőszűrővel (Whatman, Anglia) tisztítottam meg a lebegő komponensektől. Speciációs elemzésekre közvetlenül a leszűrt vizes oldatokat használtam.

4.4 Arzénspeciációhoz alkalmazott kapcsolt rendszerek.

Arzénspeciációs elemzéseket az alábbi négy csatolt műszeregyüttessel végeztem.

HPLC-HG-AFS (I. rendszer). A rendszer a detektálást megelőző közvetlen hidridképzésen alapul. Az eluens szállítását HPLC nagynyomású pumpa valósítja meg, melyet a Merck cégtől vásároltuk. Az oszlopról eluálódó effluens nyomásálló PEEK reakciókamrába jut, melybe a hidridképző reagenseket vezettem be. Reagensként 20 v/v% sósav oldatot és 0.7 m/v%-os NaOH tartalmú 1.5 m/v%-os NaBH₄ oldatot használtam. A reakciókamrából a folyadék egy jégűtőn keresztül a folyadék-gáz szeparátorba áramlik, majd innen a száraz gázt argonáram szállítja Perma Pure folyadékmentesítőn keresztül a detektorba. Detektáláshoz AFS detektort használtam (PSA 10.033 Excalibur, Orpington, Kent), mely arzén vájtkatódlámpát tartalmazott (BDHCS, Photron, Super Lamp, Victoria, Australia).

HPLC-PO-HG-AFS (II. rendszer). A közvetett hidridképző rendszer az előzőekhez hasonló, azonban foto-oxidációs (PO) egységgel egészül ki. A közvetlenül nem hidridképző arzénkomponensek detektálása érdekében az elválasztást követően UV-fotooxidációt (PO) alkalmaztam, mely lehetővé tette a komponensek on-line roncsolását, így azok hidridképző módosulatokká alakíthatók. A reakcióhoz – a hidridképző reagensek bevezetését megelőzően – a folyadékáramot UV-fénycső köré tekert 0.8 mm belső átmérőjű tefloncsőbe vezettem, majd 1,5 m/v% K₂S₂O₈ oldattal reagáltattam. (5. ábra)

HPLC-ICP-Q-MS (III. rendszer). A komponensek folyadékkromatográfiás elválasztásához Agilent 1100 HPLC rendszert (Agilent, Németország) használtam, mely buborékmentesítő egységet, kétsatornás pumpát, automata mintaadagolót és termosztáttal ellátott kolonnatartó részt tartalmazott. A

kolonnát elhagyó folyadékáram egy PEEK kapillárison keresztül (0.125mm belső átmérő) a porlasztóba áramlik, a detektálást ICP-Q-MS elemszelektív detektor végzi.

HPLC-HG-ICP-Q-MS (IV. rendszer). Ez a műszerkapcsolás a két előbbieken említett technika ötvözése. A komponensek elválasztásához a fent leírt Agilent HPLC rendszert alkalmaztam, de az effluenshez az előzőekben részletezett hidridképző reagenseket vezettem. A folyadék-gáz áram a szeparátorba jut, ahol az elválasztott gázáramot egy PEEK kapilláris közvetlenül az ICP-MS detektorba vezeti. A rendszert azon célból állítottam össze, hogy a közvetlenül, oxidáló reagens hozzáadása nélkül is hidridképző módosulatokat szelektíven, nagyon jó kimutatási határral mérhetővé tegyem.

4.5 Az arzénkomponensek elválasztásához alkalmazott oszlopok és módszerek.

A folyadékkromatográfias oszlopokat a Merck (LiChrospher 100 RP-18, fordított fázisú töltet, Németország), az Agilent (Zorbax 300-SCX kationcserélő kolonna, Németország), a Supelco (SupelCosil LC-SCX kationcserélő kolonna, USA) és a Reno (Hamilton PRP-X100 anioncserélő kolonna, USA) cégektől szereztük be. A LiChrospher oszlopot anionpároképzős, a Zorbax 300 SCX és a SupelCosil LC-SCX kolonnákat kationcserés, a Hamilton PRP-X100 kolonnát anioncserés kromatográfias módszerekhez használtam. A kapcsolt technikákat és a vizsgálataim során azokhoz alkalmazott elválasztástechnikai módszereket a 9. táblázatban mutatom be.

9. táblázat Kapcsolt technikákhoz alkalmazott elválasztástechnikai módszerek

Munkám során alkalmazott kapcsolt rendszerek	A rendszerekhez használt kromatográfias módszerek
HPLC-HG-AFS	anioncserés ionpároképzéses
HPLC-PO-HG-AFS	anioncserés kationcserés
HPLC-ICP-Q-MS	anioncserés kationcserés
HPLC-ICP-HG-Q-MS	anioncserés

A táblázatból látható, hogy a rendszerek arzénspeciációs szempontból egymás analógjai, egymást tökéletesen helyettesíthetik – pl. HPLC-HG-AFS és HPLC-HG-ICP-Q-MS. Egymást követő alkalmazásuk azonban abból adódik, hogy a feladatok megoldása folyamán tanszékünk műszerekkel egyre bővült, továbbá külföldi ösztöndíjakra kaptam lehetőséget, melyek során a hazaitól eltérő rendszereket ismerhettem meg. Az alkalmazott kromatográfias módszereket a 10. táblázatban ismertetem, melyek részletes tárgyalására a következő fejezetben térek vissza.

10. táblázat Munkám során alkalmazott kromatográfiás rendszerek

	a)	b)	c)	d)
Kromatográfiás módszer	kationcserés	kationcserés	anioncserés	anionpároképzős
Álló fázis	SupelCosil LC-SCX	Zorbax 300 SCX	PRP-X100	LiChrospher 100 RP-18
Mozgó fázis	ioncserélt víz (1-10 perc), 300 mM piridin-formiát (10-25 perc), gradiens	20 mM piridin-formiát	20 mM H ₂ PO ₄ /HPO ₄ ²⁻	10 ⁻⁵ M DDAB, 0.5 v/v% MeOH, 50 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄
pH	2.0	2.6	5.6	6.0
Kromatogram hossza	25 perc	4 perc	15 perc	7 perc
Elválasztott arzénmódosulatok	AB, AC	Oxo-glicerol- arzenocukor, AB, TMAO, AC, TETRA	As(III), DMA, MA, oxo-foszfát- arzenocukor, As(V), oxo-szulfonát- arzenocukor, oxo- szulfát-arzenocukor	As(III), DMA, MA, As(V)

4.6 A mérésekhez alkalmazott vegyszerek, standardek és hitelesített anyagminták.

Vizsgálataim során analitikai tisztaságú vegyszerekkel dolgoztam. Ioncserélt vízként minden esetben Elgacan Ultra-Pure patronnal (Elga Ltd., High Wycombe Bucks, Anglia) $R < 10 \Omega$ ellenállásig tisztított vizet használtam.

A különböző pufferek készítéséhez használt K₂HPO₄, Na₂HPO₄, (NH₄)₂HPO₄, KH₂PO₄, NaH₂PO₄, NH₄H₂PO₄ sókat, NaOH-ot, hangyasavat, sósavat, piridint és az ammóniát a Reanal (Magyarország) cégtől, a DDAB ionpároképző reagenst és a metanolt a Carlo Elba (Olaszország) cégtől szereztük be. A NaBH₄ reagenst és a K₂S₂O₈-ot a Sigma-Aldrich (Németország) cég, a HNO₃-at és a H₂O₂-ot a Merck (Németország) cég gyártja.

Arzenát törzsoldatot a Merck (Németország) cégtől vásároltuk, az As(III), DMA, MA oldatokat pedig a megfelelő sók ioncserélt vízben oldásával állítottuk elő. As₂O₃-ot a Reanal-tól, CH₃AsO₃Na x 6 H₂O vegyületet a Carlo Elba cégtől, a (CH₃)₂AsO₂Na x 3 H₂O-t pedig a Sigma-Aldrich Kft.-től (Németország) rendeltük. Az arzenocukor standardek, az AC-t, AB-t, TMAP-t, TMAO-t és TETRA vegyületeket a Tanszék Kevin Francesconi professzortól (Ausztria) ajándékba kapta, az osztrák laborban pedig szintézissel állították elő.

A mérések minőségbiztosításához DOLT-2 (tőkehal máj, National Research Council, Kanada), DORM-2 (Tőkehalizom, National Research Council, Kanada), és NIST 2711 (Montana talaj, National Institute of Standard and Technology, USA) hitelesített referenciaanyagokat, valamint BCR-710 (osztrigaszövet, MULSPOT projekt) hitelesítésre jelölt anyagot használtam.

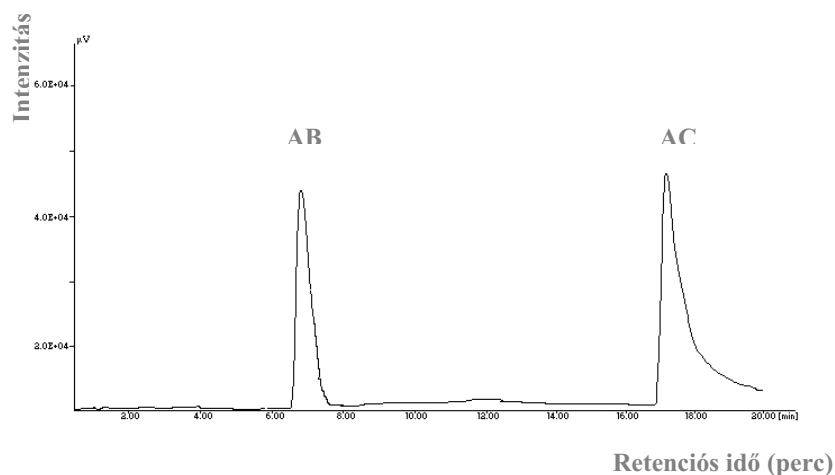
5. EREDMÉNYEK

5.1 ELVÁLASZTÁSTECHNIKAI MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE ARZÉNSPECIÁCIÓHOZ

Doktori munkám első felében kromatográfiai módszereket dolgoztam ki az arzénvegyületek elválasztására és meghatározására, melyeket a későbbiekben – a rendelkezésemre álló műszerpark bővülésével – tovább fejlesztettem. Kiindulási pontnak az irodalomban közölt ioncserés és ionpárhépzős módszereket vettem alapul.

5.1.1 *Kationos/protonálható arzénkomponensek kromatográfiai elválasztása*

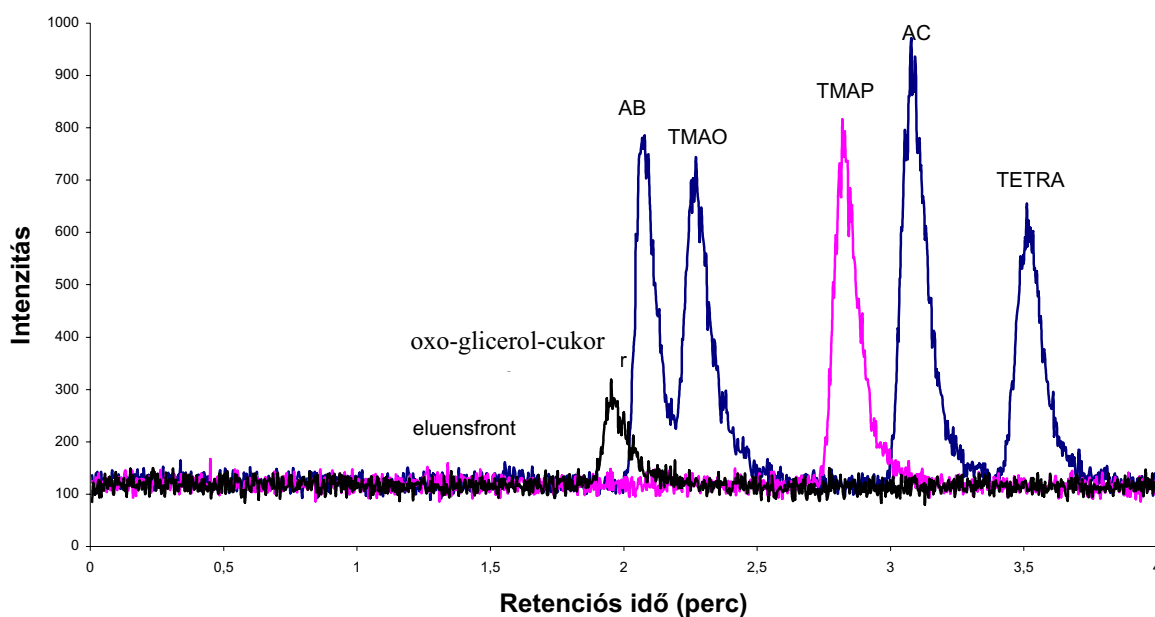
Munkám során kétféle szilikagél alapfázisú kationcserés kromatográfiai oszlopot használtam a kationos arzénkomponensek meghatározására. Az első esetben, bár a kationos komponensek közül csak az AB és az AC standard vegyületek álltak rendelkezésemre, ezek elválasztását a Supelcosil LC-SCX kolonnával sikeresen megvalósítottam. (21. ábra) A kolonna felületét és az ebből adódó fizikai-kémiai folyamatokat a 3.7.6.2.1. fejezetben tárgyaltam. (7. ábra)



21. ábra AB és AC elválasztása a Supelcosil LC-SCX kolonán

Az ábrán látható, hogy az AB ikerionos szerkezete miatt kisebb mértékben kötődik az álló fázishoz a kationos AC-hoz képest.

Ugyanezen célokra munkám második felében egy új fejlesztésű kationcserés kromatográfiás kolonnát (Zorbax 300-SCX) választottam. (8. ábra, 3.7.6.2.1. fejezet) Ezzel a töltettel rövidebb idő alatt a négy kationos komponensen kívül még a glicerol cukor, valamint a TMAP módosulatok elválasztását oldottam meg. (22. ábra)



22. ábra Kationos komponensek elválasztása Zorbax 300-SCX kationcserélő oszlopon

A standard vegyületek kationos karakterüknek megfelelően eltérő visszatartással mosódnak le az oszlopról, ezáltal egymástól elválaszthatók. A kolonna esetében a gyártók trifunkcionális organoszilán reagenssel egységesítették a felületet, miáltal a szilanol-csoportok zavaró jelenlétére kevésbé kellett számítanom. Ez lehet az oka annak, hogy az AC ez utóbbi kolonnát alkalmazva sokkal kisebb retencióval (3 perc) hagyja el a felületet mint a Supelcosil LC-SCX oszlop esetében (18 perc) (21. és 22. ábra).

Az optimális mozgófázis-összetétel kialakításakor az alábbi szempontokat vettem figyelembe. Az AC és a TETRA állandó kationok (4. táblázat), ezért azok ionos állapota a pH-val nem befolyásolható. TMAO esetében célom az volt, hogy a módosulat protonált állapotban legyen jelen az oldatban ezért $\text{pH} < 3.6$ (4. táblázat) kémhatást kellett beállítanom. Másfelől, az oszlop alkalmazásának határt szab pH-érzékenysége, mely által az $\text{pH} < 2$ nem használható. Ebből kifolyólag az AB ikerionos szerkezetté alakulása nem kerülhető el ($\text{pK}_a = 2.2$), azaz számítottam arra, hogy a módosulat csak kissé tartható

vissza a kationcserés kolonnán. Kísérletemben 50 mM eluenskonzentráció mellett $2.0 < \text{pH} < 3.6$ tartományban vizsgáltam a rendelkezésemre álló kationos komponensek visszatartását.

A puffersó választásánál fontos kritérium, hogy a kívánt pH a választott sóval pufferelhető legyen. A pH-tartomány beállítására piridint és hangyasavat alkalmaztam. Munkámban törekedtem az izokratikus módszer alkalmazására. Az ioncserés kromatográfiában a tipikusnak mondható pufferkoncentráció 1–500 mM, de irodalmi adatokra támaszkodva munkámban a 10–400 mM közé eső pufferkoncentráció értékeket vizsgáltam meg.

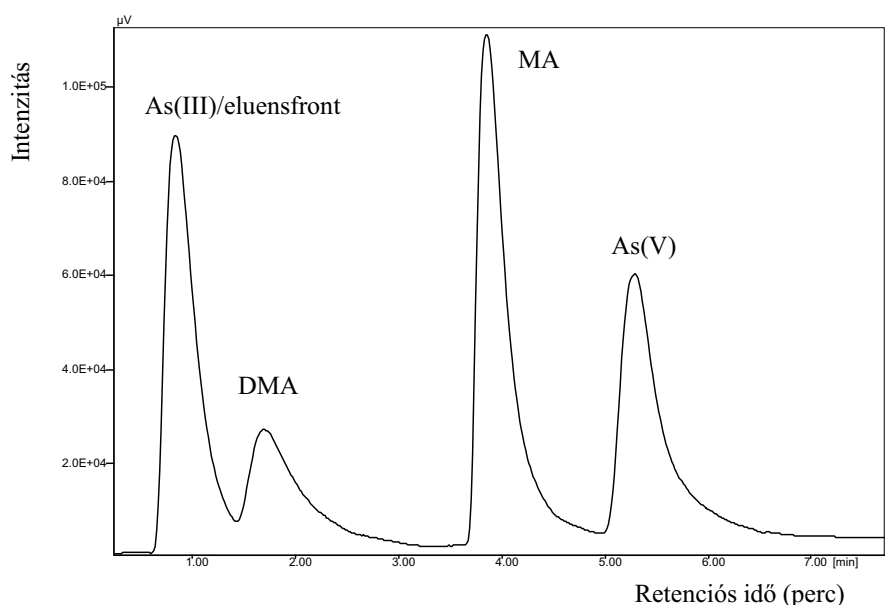
A fenti kísérletek által a két kationcserés kolonna segítségével a következő elválasztástechnikai rendszereket valósítottam meg: SuperCosil LC-SCX kolonnával AB és AC elválasztása 25 perc alatt $\text{pH} = 2.0$ mellett ionerősség gradienssel (ioncserélt víz – 300 mM) (21. ábra); valamint Zorbax 300 SCX kolonnával oxo-glicerol cukor, AB, TMAO, TMAP, AC és TETRA elválasztása 4 perc alatt $\text{pH} = 2.6$ mellett izokratikus módszerrel (20 mM) (22. ábra). A jelen bekezdésben fel nem sorolt módosulatok értelemszerűen nem tarthatók vissza a kationcserés kolonnákon, ezáltal azok az eluensfronttal hagyják el az álló fázist.

5.1.2 Anionos/deprotonálható komponensek kromatográfiás elválasztása

Doktori munkám során ionpárképző kromatográfiás rendszert alakítottam ki vízminták arzénspeciációs elemzésére. Mivel a vízmintákban szervesetlen arzénmódosulatok – esetlegesen nyomokban DMA és MA – találhatók, az álló fázis felületét anionpárképző reagenssel módosítottam. Álló fázisként LiChrospher 100 RP-18 LiChroCART fordított fázisú kolonnát, ionpárképző reagensnek didodecil-dimetil-ammónium-bromidot (DDAB) használtam, mely apoláros alkiláncával kölcsönhatásba lép a fordított fázisú kolonna felületével. (11. ábra és 3.7.6.2.2. fejezet)

Az ioncserélő komponens só alakban vásárolható (jelen esetben bromidként), melyet nem adunk közvetlenül az eluenshez, hanem abból törzsoldatot készítünk, és azt hígítjuk. Munkám során az eluenshez 10^{-5} M koncentrációban adtam DDAB reagenst. Fontos megemlíteni, hogy a gyenge kölcsönhatások és az esetleges mátrixhatás miatt sajnos gyakran a mintával együtt a felülethez kötött ionpárképző is „leomosodik” az oszlopról, ezért minden mérés után az oszlopot újból DDAB-dal kondicionálni szükséges. Ezt az eluenshez képest ötször töményebb DDAB oldattal végeztem. A regeneráló lépést célszerű a gradiens program utolsó lépéseként automatikusan beiktatni.

A DDAB-val módosított fordított fázisú kolonnán az As(III), DMA, MA, As(V) módosulatok elválasztását oldottam meg. (23. ábra)



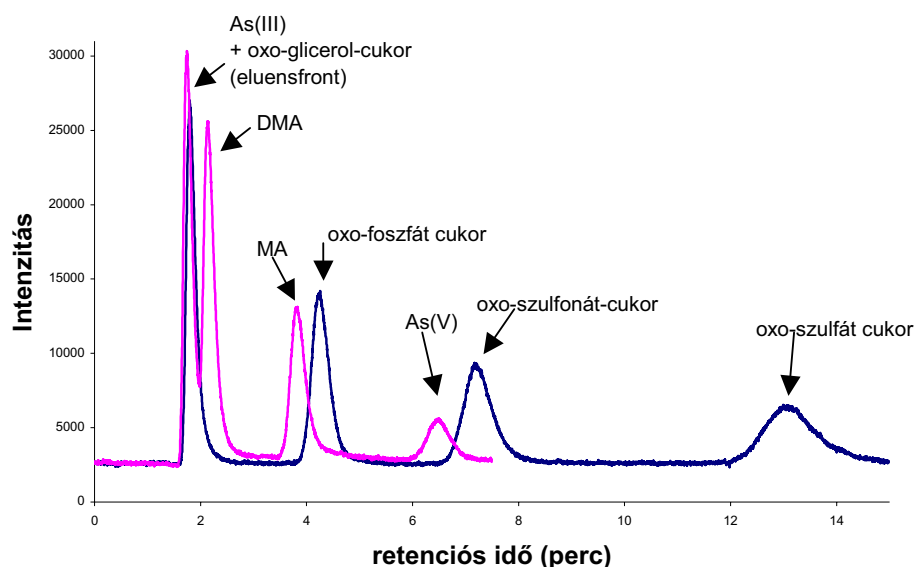
23. ábra Anionos komponensek elválasztása DDAB-val módosított LiChrospher 100 RP-18 LiChroCART oszlopon

Az ionpárhépző (DDAB) koncentrációjának növelésével egyre több aktív ionos kötőhely alakul ki az álló fázis felületén, ezáltal nő a retenció. Ez a jelenség egy határig figyelhető meg, melynél az álló fázis már nem képes több reagenst megkötni, ezáltal nem várható tovább a szelektivitás növekedése. Doktori munkámban az ionpárhépző koncentrációjának hatását 10^{-3} – 10^{-7} M DDAB tartományban vizsgáltam.

Megfigyeltem, hogy 0.5 v/v% metanol (szerves módosító) előnyösen befolyásolja a DMA visszatartását, mely által az könnyebben elválasztható lett az MA módosulattól. A jelenség magyarázata feltehetően a metil-csoportok apoláros kötődése a szabadon maradt alkilcsoportokhoz.

Az ionpárhépzés paramétereinek optimalizálásával a következő elválasztástechnikai rendszert valósítottam meg: LiChrospher 100 RP-18 kolonnával As(III), DMA, MA és As(V) vegyületek elválasztása 7 perc alatt pH = 6.0 mellett izokratikus elúcióval (10^{-5} M DDAB, 0.5 v/v% MeOH, 50 mM $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ puffer). (23. ábra)

Munkám második felében a Hamilton cég által gyártott PRP-X-100 szerves polimer alapú ioncserélő kromatográfiás kolonnát használtam az anionos karakterű arzénkomponensek elválasztására. (9. ábra, 3.7.6.2.1. fejezet) A kolonnával a fenti négy vegyületen kívül további három oxo-arzenocukor (foszfát, szulfonát és szulfát arzencukrok) elválasztását oldottam meg. (24. ábra)



24. ábra Anionos komponensek elválasztása Hamilton PRP-X-100 anioncserélő oszlopon

Az optimális mozgófázis-összetétel kialakításakor mindenképp a komponensek pK_a értékeit kell figyelembe vennünk. Látható, hogy az arzénessav közülük a leggyengébb sav, melynek disszociációja csak $pH > 9$ valósul meg (4. táblázat). A lúgos pH alkalmazása azonban nem javasolt, mert ez a többi komponens ionos állapotba alakulását nagy mértékben elősegíti, ezáltal azok már nem választhatók el egymástól. Az előbbieket miatt tehát kompromisszumra kényszerülünk: az arzénessav protonált állapotban marad, azaz visszatartás nélkül eluálódik az oszlopról. A komponensek közül az MA esetében legalább $pH = 4.6$ (pK_a értékénél 1-2 egységgel nagyobb) szükséges az anionos állapot kialakításához. Ezen a pH-n az arzénessav már disszociált, a DMA viszont még protonált állapotban van jelen. A fenti elgondolást követve a módszerfejlesztéshez 50 mM ionerősség mellett a $4.6 < pH < 6.5$ tartományban vizsgáltam a komponensek visszatartását az anioncserélő kolonnán. A pufferelevést $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$ rendszerrel valósítottam meg.

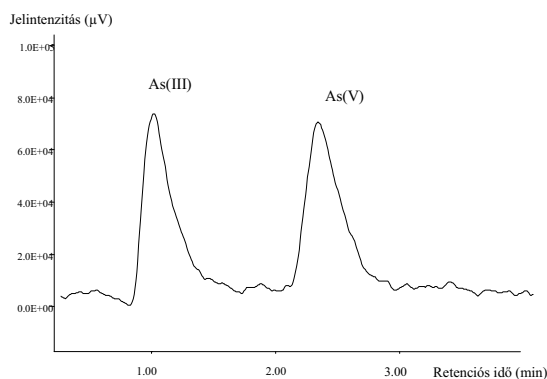
Második lépésként az elválasztáshoz szükséges ionerősséget optimáltam az irodalmi adatokat alapul véve 10–100 mM között. A kísérletek során az As(III), DMA, MA, oxo-foszfát-arsenocukor, As(V), oxo-szulfonát és oxo-szulfát arsenocukrok elválasztását a PRP-X-100 anioncserélő kolonnán 15 perc alatt pH = 5.6 mellett, 20 mM pufferrel valósítottam meg. (24. ábra)

5.2 ARZÉNSPECIÁCIÓ IVÓVÍZMINTÁKBAN

Amint a 3.9 számú irodalmi fejezetben bemutattam, az ivóvízminták arzénspeciációs elemzése két fontos tudományterület számára nyújt hasznos információkat. Egyrészt a módosulatarányból következtetni lehet a várható, felszín alatti arzénmobilizációs folyamatokra, másfelől az arzénmentesítési technológiák fejlesztésénél az As(III)/As(V) arány az arzénmentesítés mértékét meghatározó fontos mutató. Az irodalmi részben kitértem a speciációt érintő nehézségekre, melyek ivóvízminták elemzésénél – ahol a szervesetlen arzénformák kizárólagos jelenlétére kell számítani – még fokozottabban jelentkeznek, hiszen a két forma a legkisebb környezetváltozás hatására is könnyen átalakulhat egymásba.

Jelen fejezetben kísérletes munkámról számolok be, melyben As(III)/As(V) meghatározását végeztem el különböző ivóvízminták esetében. A mintavételezést megelőzően kísérletet végeztem a minták tárolására vonatkozóan, meghatároztam az optimális tárolási körülményt és időtartamot, mely alatt a mintavételezés pillanatában létező As(III)/As(V) arány szignifikánsan nem változott. A kísérletek során a mintavételt minden esetben külső személy, ill. szervezet végezte saját tervezés alapján, ezért erre vonatkozó információval nem rendelkezem.

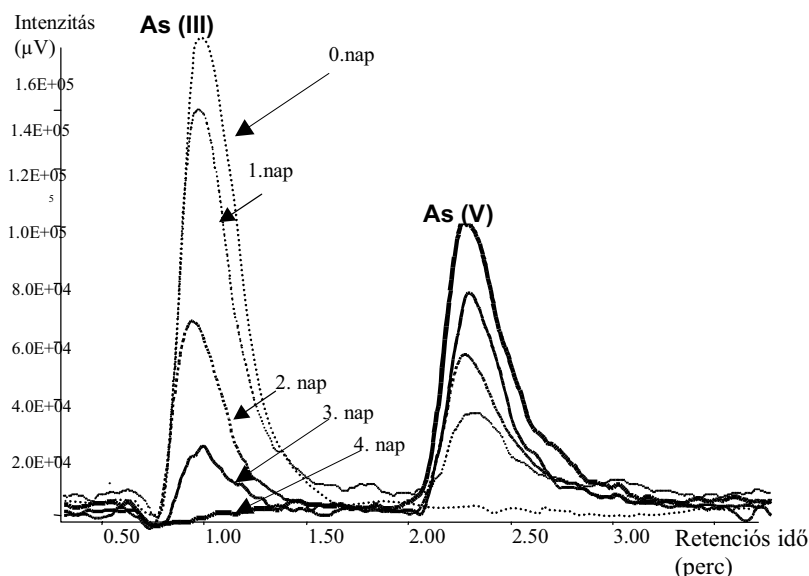
Arzénspeciációhoz az „Anyag és módszer” fejezetben leírt HPLC-HG-AFS rendszert használtam anionpárképzős elválasztástechnikai egységgel. Mivel a mintákban előzetes irodalmi adatok alapján a két szervesetlen módosulat megjelenésére számítottam, az elválasztástechnikai paramétereket úgy állítottam be, hogy a lehető legjobb elválasztást a legrövidebb idő alatt valósítsam meg. Erre a célra 70 mM $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pufferrendszert alkalmaztam mozgó fázisként, melybe 0.5 v/v% MeOH-t és 10^{-5} M DDAB ionpárképző reagenst tettem. Ezáltal a két szervesetlen módosulat elválasztása 3 perc alatt megvalósítható (25. ábra).



25. ábra 25 ng As / ml koncentrációjú standard oldat kromatogramja

5.2.1 A vízminták tárolására vonatkozó kísérlet

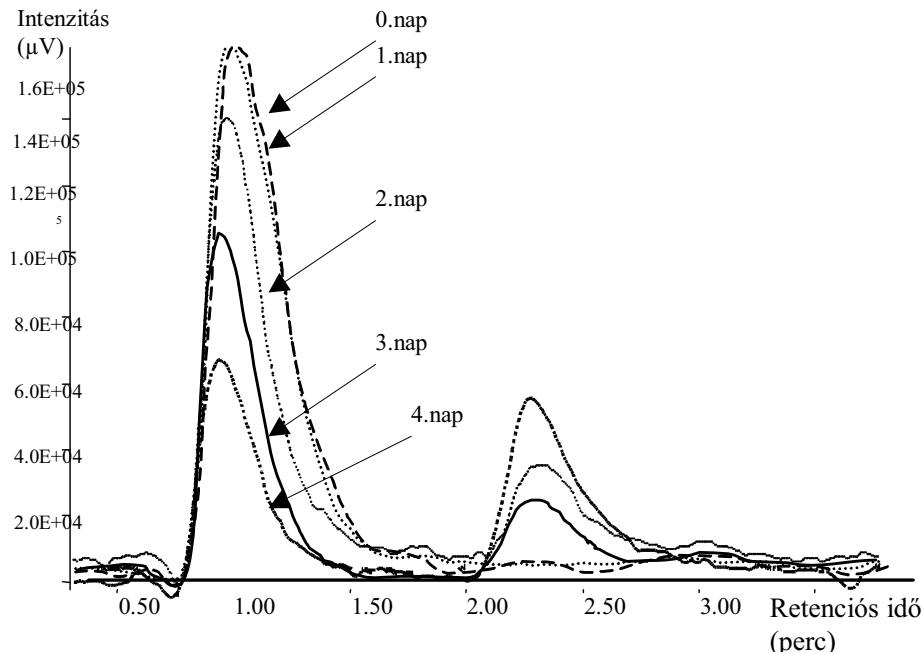
Ahhoz, hogy a mérés pillanatában meghatározott As(III)/As(V) arány a természetes állapotot tükrözze, előkísérletek során meg kellett határozni, hogy milyen tárolási körülményekkel és mennyi ideig tarthatók el a minták oxidációs állapotváltozás nélkül. Ismeretes, hogy az arzenit stabilitását jelentősen befolyásolja a hőmérséklet, magasabb hőmérséklet az oxidációnak kedvez. A vizsgálatokat olyan vízmintákon végeztem, melyek Magyarország nem szennyezett területéről származtak. A kiválasztott minták nem tartalmaztak kimutatható mennyiségben As(III)-t. A három minta mindegyikéből 2 x 10 ml-t kivettem, majd azokat As(III) oldattal addicionáltam. Az így kapott 100 µg/l As(III) koncentrációjú természetes vizek egyik sorozatát +4 °C-on hűtőszekrényben, másik sorozatát szobahőmérsékleten tároltam sötét polietilén tartályban, hogy a fény esetleges oxidációs hatását kizárjam. Mélyhűtést az irodalomban leírt lehetséges irreverzibilis változások bekövetkezésének elkerülése érdekében nem alkalmaztam. (GOMEZ-ARIZA, 2001) Az edényekből a 0., 1., 2., 3., és 4. napokon mintát vettem, és arzénspeciációs elemzést végeztem. Az 26. ábra az első minta szobahőmérsékleten tartott részletének arzénspeciációs kromatogramját mutatja.



26. ábra 25°C-on tárolt vízminta arzénspeciációs kromatogramja. (Teljesarzen koncentráció: 100 µg/l. Kromatográfias oszlop: LiChrospher 100 RP-18, eluens: 10⁻⁵ M DDAB, 0.5 v/v% MeOH, 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH=6.0)

Látható, hogy viszonylag gyorsan, már a minta tárolásának első napján oxidáció következik be, a minta teljes arzéntartalmának 25%-a As(V)-té alakul. Az addicionálást követő negyedik napon már a

minta teljes arzéntartalma As(V) formájában van jelen. A 27. ábrán ugyanezen minta hűtőben tárolt részletének kromatogramját szemlélteti.



27. ábra +4 °C-on, sötét helyen tárolt vízminta arzénspeciációs kromatogramja

Látható, hogy a folyamat lényegesen lassabb, az első nap gyakorlatilag oxidáció nem történik (kimutatható As(V) mennyiség nincs az oldatban). A negyedik napra a minta teljes arzéntartalmának 50%-a alakul át As(V)-té.

A kísérletből következtetésként elmondható, hogy a mintákat a mintavételezést követően sötét, hűtött helyen – legfeljebb 4 °C-on – tárolva, valamint a mintavételt követő legkésőbb első napon mérve megelőzhető az esetleges oxidáció, így a mintavétel pillanatában fennálló specieszarány megőrizhető.

5.2.2 A dél-alföldi régióban gyűjtött ivóvízminták arzénspeciációs elemzése

A mintavétel és a mintatartósítás már a tárolásra vonatkozó kísérlet eredményeinek ismeretének birtokában történt. A mintavételt külső személyek végezték: 15 vízmintát gyűjtöttek a bevezetőben bemutatott arzénszennyezés szempontjából kritikusnak mondható dél-alföldi régióban az alábbi helyeken: Makó (12 kútból), Földeák (1 kútból), Óföldeák (1 kútból) és Maroslele (1 kútból). A minták tárolására sötét polietilén tartályt használtunk, a szállítás alatt a mintákat +4 °C-on tárolták. A speciációs méréseket a mintavételt követő első napon végeztem. A 11. táblázat első oszlopaiban összefoglaltam a mintákban talált As(III)/As(V) specieszek arányát.

11. táblázat A kijelölt kutakból gyűjtött vízminták arzénspeciációs eredményei

Mintavételi hely	As(III) koncentráció (ng/ml) ^{a)}	As(V) koncentráció (ng/ml) ^{a)}	As(III)+As(V) (ng/ml)	Teljes As (ng/ml, flow injection módszer)	Teljes As (ng/ml, GF- AAS módszer)
Makó 1. kút	30 (79%)	8.0 (21%)	38	39	41
Makó 2. kút	28 (75%)	9.2 (25%)	37	35	35
Makó 3. kút	28 (72%)	11 (28%)	39	40	38
Makó 4. kút	37 (80%)	9.2 (20%)	46	48	48
Makó 5. kút	30 (76%)	9.6 (24%)	40	41	44
Makó 6. kút	49 (80%)	12 (20%)	61	62	55
Makó 7. kút	22 (77%)	6.4 (23%)	28	27	27
Makó 8. kút	22 (75%)	7.3 (25%)	29	28	31
Makó 9. kút	28 (82%)	6.3 (18%)	34	34	33
Makó 10. kút	56 (87%)	8.1 (13%)	64	65	68
Makó 11. kút	51 (88%)	6.9 (12%)	60	58	60
Makó 12. kút	28 (82%)	6.2 (18%)	34	33	30
Földeák 1. kút	44 (80%)	11 (20%)	55	56	52
Óföldeák 1. kút	46 (74%)	16 (26%)	62	65	62
Maroslele 1. kút	219 (83%)	44 (17%)	263	250	255

^{a)} a zárójelben a módosulatok százalékos megoszlása látható

Vízmintánként 3-3 párhuzamost mértem, az RSD 5–8%-nak adódott. A táblázatban látható, hogy az ivóvízmintákban a domináns arzénmódosulat az arzenit, mely a teljes arzénkoncentráció $79 \pm 5\%$ -át teszi ki. A Makó, Földeák és Óföldeák helységekből gyűjtött minták teljes arzéntartalma nem mutat nagy eltérést egymástól, míg a Maroslelén gyűjtött vízminta öt-hatszor több arzént tartalmaz, az előbbiekhöz hasonló specieszeloszlással. Látható, hogy kivétel nélkül mindegyik mintavételi hely arzénrel szennyezett, hiszen meghaladja a jelenleg érvényben levő arzénre vonatkozó határértéket (10 ng/ml).

Eredményeim alátámasztják az arzénfelszabadulásról alkotott anaerob hipotézis elméletét, mely szerint a zárt közetrendszerű víztározókban a közetekhez adszorbeálódott arzén redukációs folyamatok során kerül a vízrendszerbe, döntő többségében arzenit formájában. Az eredményekből egyértelműen látszik, hogy mindegyik vízmű esetében szükséges az arzénmentesítés a Magyarországon is érvénybe lépett európai határérték betartásához. Mivel a hazánkban alkalmazott technológiák nagyobb hatásfokkal szűrik ki az As(V) módosulatot, a vizsgált ivóvizek esetében előoxidációs lépés szükséges a megfelelő arzenát-többség eléréséhez.

5.2.3 A mérés minőségbiztosítása

A kísérletes munka speciációs rendszerrel mért eredményeinek helyességét összarzén mérésekkel támasztottam alá. A vízminták teljesarzén-koncentrációját két független módszerrel határoztam, ill. mérettem meg: 1) a mintákat savasan roncsoltam, majd oszlop nélkül ún. 'flow injection módban' megmértem a teljesarzén-koncentrációt, valamint 2) külső labor közreműködésével grafitkemencés atomadszorpciós módszerrel határoztuk meg a teljes arzén mennyiségét. Az eredményeket összevettem a speciációs eredményekkel (11. táblázat második fele). Minden minta esetében a három, független módszerrel végzett teljes As koncentráció meghatározása között szignifikáns különbség nem adódott, a speciációs mérés minősége ezáltal megfelelőnek nyilvánítható.

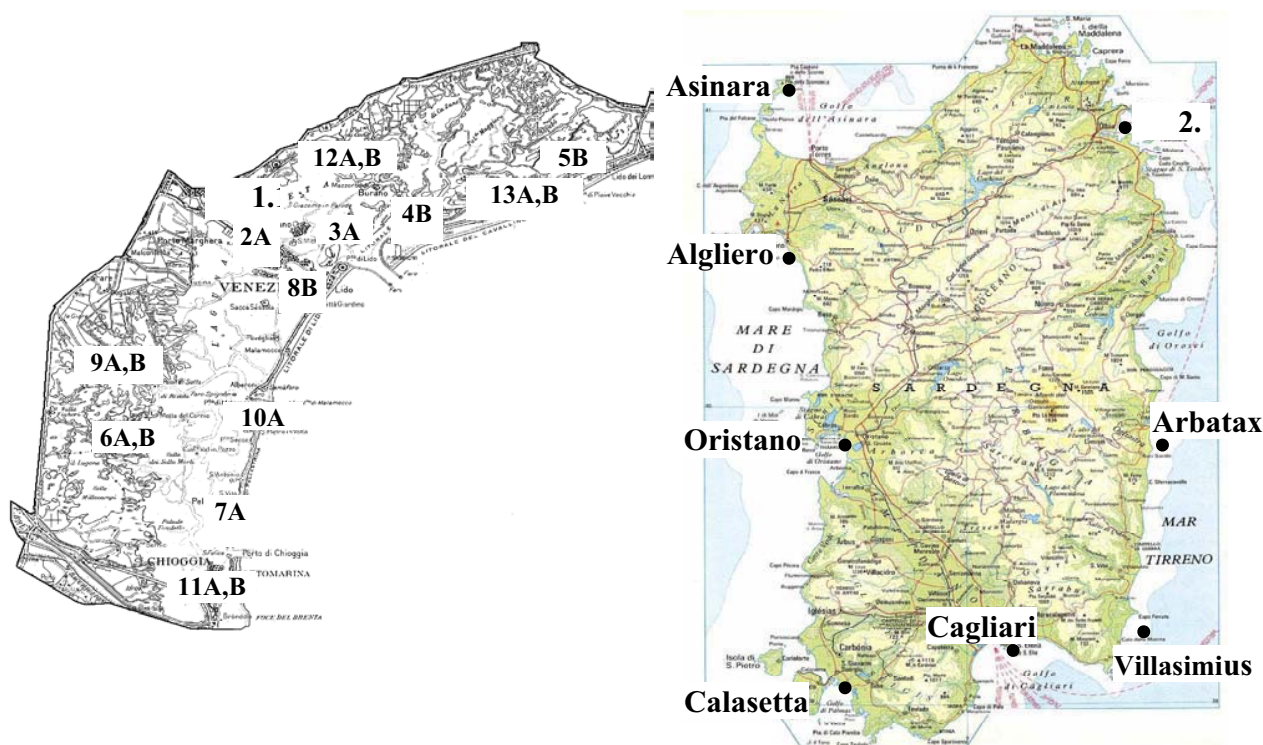
Összefoglalóan elmondható, hogy minden minta esetében a teljesarzén-koncentráció szignifikánsan nagyobbak bizonyult, mint a jelenlegi határértékben foglaltak (10 ng/ml). Az As(III)/As(V) arány megállapítása nagyon jó eszköz lehet a későbbi kutatások számára a vizek redoxiállapotának jellemzésére mint geokémiai indikátor, és fontos adat az eltérő adszorpciós képesség miatt az arzénmentesítési technológiák számára. Bizonyítottam, hogy a specieszek arányának megőrzése érdekében az analízist a mintavételt követően a lehető leggyorsabban el kell végezni, a mintákat az analízisig +4 °C-on kell tárolni.

5.3 ARZÉNSPECIÁCIÓ TENGERI KAGYLÓKBAN

A 3.10 fejezetben az irodalmi adatok feldolgozásával mutattam be a tengeri állatokon végzett arzénspeciációs eredményeket. Említettem, hogy a kagylók képesek nagy mennyiségben arzént felhalmozni, a bennük található módosulatok közül a nem toxikus AB domináns előfordulása figyelhető meg. Jelen fejezetben a doktori tevékenységem második kutatási témáját teszem közzé, melyben a Velencei-öbölben valamint a Szardínia-sziget köré kihelyezett kagylóminták speciációs meghatározását végeztem el. Megvizsgáltam, hogy a teljesarzen-koncentráció és a módosulatmintázat között van-e összefüggés, toxikológiai értelemben véve nyújt-e extra információt a módosulatelemzés a teljes arzénmeghatározással szemben. Vajon általános érvényű az AB dominancia, vagy a módosulatok arányát befolyásolja a felvett arzénmennyiség? Feltételeztem, hogy nagyobb arzénakkumuláció mellett a kagyló (vagy a vele szimbiózisban élő mikroorganizmus) egy mennyiségen túl már „nem győzi” a toxikus anyag méregtelenítését, ezáltal azt eredeti (szervetlen) formában hagyja. Mérési eredményeimet az „Analytical and Bionanalytical Chemistry” című tudományos folyóirat 2003/377. számában publikáltuk. Jelen fejezetben az eredmények összefoglalását teszem közzé. (SÖRÖS, 2003)

5.3.1 *Mintavétel*

A kísérletben eredetileg tributil-ón biomonitorozására használt kagylómintákat elemeztem. A kagylókat ipari területtől távol, a Santa Gilla-öbölben, Olaszországban nevelték, majd a felnőtt példányokat a Velencei öböl területére (13 vizsgálati pont, számozva), valamint a Szardínia-sziget köré (8 vizsgálati pont, helységekkel jelölve), helyezték el az aljzattól 1.5-10 méter közé (a felszíntől egyik esetben sem távolabb, mint 5 méter). A mintavételi helyeket a 28. ábra mutatja. A Szardínia-szigethez *Mytilus galloprovincialis*, a Velencei-öbölbe *Mytilus galloprovincialis* (A), valamint *Mytilus edulis* (B) kagylókat telepítettek. (28. ábra) Az állatokat 4 héttel a kihelyezést követően összegyűjtötték, és fagyasztva szárították. A laboratóriumba már a száraz, homogén porminták érkeztek.



28. ábra Mintavételi helyek elhelyezkedése a Velencei-öbölben és a Szardínia-sziget körül

5.3.2 *Mintaelőkészítés*

A teljesarzén-meghatározáshoz a mintákat nedves roncsolásnak vettem alá. Teflonbombákba kb. 200 mg mintát mértem be, majd a mintákhoz 2 ml tömény HNO_3 -t, valamint 2 ml 30%-os H_2O_2 -t adtam. A roncsolást laboratóriumi nyomásálló edényben egy órán át végeztem. A roncsolmányokat ioncserélt vízzel 10 ml végtérfogatra hígítottam.

Arzénspeciációs elemzésekhez a mintákból kb. 300 mg-ot mértem be polikarbonát edénybe, majd a mintákhoz 3 ml ioncserélt vizet adtam. Az edényeket 60 percig $85\text{ }^\circ\text{C}$ -on vízfürdőben rázattam. A szuszpenziót ezután 25 percig centrifugáltam, majd a felülúszó 2 ml-es részletét ioncserélt vízzel 10 ml-re hígítottam. A mintákat folyadékkromatográfiás elválasztás előtt $0.45\text{ }\mu\text{m}$ lyukméretű membránszűrő segítségével tisztítottam meg a lebegő szennyeződésektől.

5.3.3 *A teljesarzén-koncentráció és az arzénmódosulatok meghatározása*

A minták teljes arzén koncentrációját Thermo Jarrel Ash ICAP-9000 ICP-AES rendszerrel mérettük.

Az anionos komponensek (As(III), DMA, MA, As(V)) elválasztására és detektálására anioncserés HPLC-HG-AFS rendszert, a kationos módosulatok közül az AB és az AC meghatározására

kationcserés HPLC-PO-HG-AFS rendszert használtam. (10. táblázat/c, a) Doktori munkám ezen szakaszában még nem álltak rendelkezésemre TMAO, TETRA és arzenocukor standard vegyületek, ezért ezen módosulatokat nem tudtam vizsgálni. Az elválasztást a 10. táblázatban részletezett paraméterek mellett végeztem. A rendszerrel kapott kimutatási határok szárazanyagra vonatkoztatva a vizsgált komponensekre az alábbiak voltak: AB (20 ng/g), AC (40 ng/g), As(III) (15 ng/g), As(V) (30 ng/g), DMA(10 ng/g), MA(55 ng/g).

5.3.4 A mérés minőségbiztosítása

A mérés minőségbiztosítását három módszerrel végeztem.

Egyrészt speciációs referenciaanyagot alkalmaztam a mérési módszer pontosságának meghatározására. Mint a korábbiakban is vázoltam, a speciációs mérésekhez használt referenciaanyagoknak három fontos kritériumnak kell megfelelnie: (i) a mérendőhöz hasonló mátrix legyen, (ii) a mérendővel azonos/részben azonos arzénmódosulatokat tartalmazzon, valamint (iii) a hitelesített koncentrációk és a mérendő koncentrációk azonos nagyságrendben legyenek. A valóságban nagyon ritka, hogy mindhárom kritérium teljesül. Jelen esetben a vizsgálandó mátrix a tengeri kagyló, melyhez a rendelkezésünkre álló referenciaanyagok közül a leginkább hasonló alapanyagoknak a még hitelesítő eljárás alatt álló, de már indikatív értékekkel rendelkező BCR-710 (kagyló szövet) bizonyult. Ez a referenciaanyag AB-re és DMA-ra rendelkezik indikatív koncentrációértékekkel. (12. táblázat) A 12. táblázatban alapján állítható, hogy a meghatározott AB és DMA koncentrációk illeszkednek a hitelesített tartományokba.

12. táblázat A referenciaanyagban meghatározott módosulatok

	Mért konc. ($\mu\text{g/g}$)	Indikatív konc. ($\mu\text{g/g}$)
AB	*30.46 \pm 0.13	*32.98 \pm 5.08
As (III)	*0.31 \pm 0.01	
DMA	*1.05 \pm 0.04	*1.05 \pm 0.62
MA	*0.94 \pm 0.04	
As (V)	*0.09 \pm 0.00	
Teljes arzén	19.71 \pm 1.00	
Kinyert arzén	16.32 \pm 0.92	
Üledékben maradt arzén	3.02 \pm 0.13	

* molekulatömegben megadva

Másrészt a mérés minőségét teljes anyagmérleg készítésével is biztosítottam. A speciációs analízist megelőzően az extraktumok felülúszóját, valamint az üledéket nedves roncsolásnak vettem alá, majd

a teljes arzén koncentrációkat ICP-AES technikával mérettem. A méréseket helyesnek ítélttem, ha az üledék és a felülúszó arzéntartalmának összege nem különbözött szignifikánsan a száraz minta teljes arzénkoncentrációjától. A 13. táblázatban a szardíniai minták teljes anyagmérlege látható.

13. táblázat Teljes anyagmérleg (szardíniai minták)

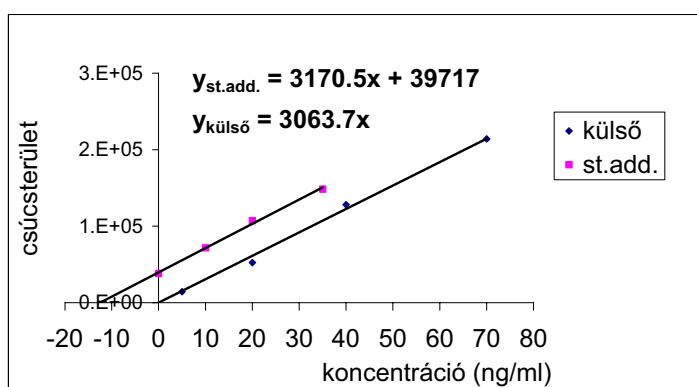
Mintavételi hely	Teljes As (µg/g)	RSD (%)	Kinyert As (µg/g)	Kinyert As/ Teljes As x 100 (a) (extrakciós hatásfok)	Üledékben mért As (µg/g)	Üledékben mért As/ Teljes As x 100 (b)	(a) + (b) (%)
Arbatax	11.1	11.2	8.6	77	1.8	16.2	94
Villasimius	13.8	3.8	10.5	76	3.2	23.2	99
Calasetta	9.6	2.6	7.3	76	2.2	22.9	99
Cagliari	7.5	2.2	5.3	71	1.6	14.7	92
Oristano	7.5	11.1	4.5	60	3.0	40.0	100
Alghero	10.3	8.9	8.3	81	2.2	21.4	102
Asinara	7.6	15.9	4.3	57	3.6	47.4	104
Olbia	9.7	7.0	5.7	59	3.0	30.9	90
átlag:							97±7

A táblázat szerint a szardíniai kagylókból kinyert arzén mennyisége átlagosan 70 ± 9 %-a a teljes arzén koncentrációnak. A maradék 27 ± 11 % az üledékben kimutatható arzénmennyiség, ami az extrahált mennyiséggel együtt átlagosan 97 ± 7 %-osan megközelíti a teljesarzén-koncentrációt.

A mérés minőségbiztosítására harmadikként a kalibrációs módszerek összehasonlítását végeztem. A speciációs rendszerben mérési hibát okozhat a mátrixhatás, mely nem csak az elválasztás minőségét ronthatja (vagy változtathatja meg), hanem a hidridképzésre is hatást gyakorolhat. Ez esetben a külső kalibrációs oldat komponenseinek jelintenzitása eltérhet a vele azonos koncentrációjú, de mátrixot is tartalmazó mintaoldat komponenseinek jelintenzitásától. A jelenség vizsgálatára a referenciaanyag anionos és kationos módosulatait mind külső, mind standard addíciós kalibrációs módszerrel számszerűsítettem. Ha a két módszerrel nyert adatok között nincs szignifikáns különbség, akkor a mátrixhatás elhanyagolható, azaz külső kalibrációs módszer alkalmazásával megfelelően pontos számszerűsítés végezhető. Ez esetben elkerülhető a nagyobb idő- és munkaigényes standard addíció. Az eredmények a 14. táblázatban láthatók.

14. táblázat A CRM mintában külső, valamint standard addíciós kalibrációs módszerrel meghatározott komponensek mennyisége.

	Számszerűsítés külső kalibrációval (ng/ml)	Számszerűsítés standard addícióval (ng/ml)
As (III)	8.4 ± 0.3	8.1 ± 0.3
DMA	26.6 ± 1.0	25.1 ± 1.0
MMA	6.4 ± 0.2	6.8 ± 0.3
As (V)	1.9 ± 0.1	4.1 ± 0.2
AsBet	482 ± 18	463 ± 18
AsCol	< DL	



29. ábra Külső, valamint standard addíciós kalibráló görbék (DMA) összehasonlítása a CRM minta esetén

A táblázat adatai alapján mondhatjuk, hogy a két kalibrációs módszer között nincs szignifikáns különbség, kivétel az As(V) esetében, ahol a standard addíciós módszer pontatlansága a kimutatási határ közelében végzett térfogatos adagolás bizonytalanságára vezethető vissza. A DMA-ra felvett kalibráló görbék azonos meredeksége (29. ábra) mutatja, hogy a vizsgált mátrix nincs hatással a komponens jelintenzitására. A többi komponens esetében ugyanez tapasztalható.

5.3.5 Eredmények

A gyűjtött kagylóminták mérési eredményeit a 15. táblázat mutatja. A liofilezett minták teljes arzéntartalma 7.4–30.8 mg/kg volt, mely koncentrációtartomány jól egyezik az irodalomban közölt tengeri kagylók esetében mért értékekkel. (SCHAEFFER, 2005) Ha a *Mytilus edulis* (A) kagylófajt nézzük, a táblázat utolsó oszlopában közzétett teljesarzen-koncentrációkban különbség mutatkozik a Velencei-öböl keleti (3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13) és nyugati (1, 2, 6, 9, 12) mintavételi helyei között. A keleti part mellett gyűjtött minták közel kétszer nagyobb mennyiségben akumulálták az arzént, mely a környezet nagyobb arzénszennyezettségére utal. Hasonló tendencia figyelhető meg a *Mytilus galloprovincialis* (B) faj esetében is. Szintén észrevehető, hogy a *Mytilus galloprovincialis* (B) faj több

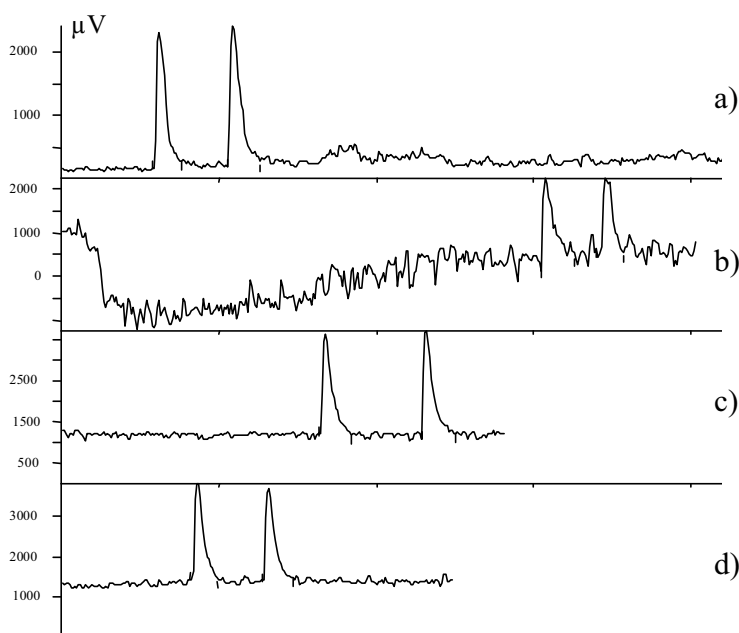
arzén halmozott fel, mint az azonos helyen gyűjtött *Mytilus edulis*. A megfigyeléssel egyetértésben Slejkovec publikált hasonló eltérést a két faj között. (SLEJKOVEC, 1996b) A szardíniai minták arzéntartalma között nincs ilyen mérvű különbség, a teljesarzén-tartalom a mintavételi helyek között nagyjából egyenletesen oszlik meg. A teljes arzénkoncentráció eredményei jól tükrözik a két mintavételi hely arzénszennyezettsége közötti különbségeket.

15. táblázat A mintákban meghatározott arzénmódosulatok

minták	anionos komponensek összege (ng/g)	Anionos komponensek (ng/g)				AB (µg/g)	total As (µg g ⁻¹)
		As (III)	DMA	MMA	As (V)		
1A	605	203	137	136	129	5.4	7.4
2A	101	51	<DL	<DL	49	6.3	9.6
3A	441	101	58	136	146	9.8	13.2
4B	587	127	71	288	101	11.1	12.8
5B	283	187	<DL	<DL	96	8.9	12.9
6A	491	138	142	108	103	7.35	7.4
6B	545	476	<DL	<DL	69	4.55	8.4
7A	367	80	162	125	<DL	24.9	30.8
8B	414	76	<DL	280	58	7.2	13.9
9A	314	97	130	<DL	87	5.7	8.3
9B	534	200	40	136	157	5.9	10.1
10A	534	173	172	98	90	12.2	12.3
10B	629	165	78	239	146	<DL	14.7
11A	90	51	<DL	<DL	39	12.8	13.3
11B	653	319	199	<DL	135	24.3	22.8
12A	296	120	105	<DL	71	7.75	7.8
12B	540	206	234	<DL	100	5.15	9.6
13A	468	76	89	207	97	11.6	13.3
13B	720	238	55	194	233	15.5	18.9
Arbatax	48	34	14	<DL	<DL	8.5	11.1
Villasimius	221	61	160	<DL	<DL	10.2	13.8
Calasetta	97	53	44	<DL	<DL	7.2	9.6
Cagliari	131	29	101	<DL	<DL	5.15	7.5
Oristano	226	81	145	<DL	<DL	4.2	7.5
Algliero	229	46	183	<DL	<DL	8	10.3
Asinara	166	57	109	<DL	<DL	4.1	7.6
Olbia	261	37	224	<DL	<DL	5.4	9.7

Mielőtt a speciációs eredményekre rátérek, hangsúlyozni szeretném, hogy ebben a munkában alkalmaztam először a módosulatok meghatározására kifejlesztett elválasztástechnikai rendszert. A mintákban az anionos komponensek (As(III), DMA, MA, As(V)) kis mennyiségű jelenlétére számítottam, ezért célul tűztem ki a minél jobb jel/zaj arány biztosítását ezen módosulatok esetén. Az irodalomban leggyakrabban használt mozgófázis erre a célra a NaH₂PO₄ sót tartalmazó puffer, melyet munkám első felében magam is alkalmaztam. Az első minták mérésekor azonban kiderült, hogy a

mozgó fázis által okozott nagy mértékű zaj nem teszi lehetővé a mintákban kis koncentrációban jelen levő anionos komponensek észlelését. A megfigyelést követően kísérletet végeztem, melyben célul tűztem ki olyan ionösszetételű mozgó fázis kialakítását, mely által a legnagyobb jel/zaj arány biztosítható. A kromatográfiai rendszert „flow-injection” módban használtam. Mozgó fázisként négyféle oldatot vizsgáltam: KH_2PO_4 (30. ábra/a), NaH_2PO_4 (30. ábra/b) és $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (30. ábra/c) tartalmú oldatokat, valamint ioncserélt vizet (30. ábra/d).



30. ábra A különböző mozgófázis összetételekkel elért jel/zaj arány 20 ng/ml As(V) kétszeri injektálása alapján. a) 20 mM KH_2PO_4 , b) 20 mM NaH_2PO_4 , c) 20 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, d) ioncserélt víz

A folyamatosan áramló mozgó fázisokba 20 ng/ml koncentrációjú arzenát standard oldatot injektálva mértem a rendszerek által keltett jel/zaj arányt. Az ioncserélt víz mint ionmentes mozgó fázis referenciaként szolgált. Az eredmények a 30. ábrán láthatók, ami alapján úgy tűnik, hogy az $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ alkalmazásával érhető el a legjobb jel/zaj arány. A jelenség a következőképpen magyarázható. A hideg hidrogén-lángban spektrális zavarás nem várható. Ám ha a lángba – az elégtelen gáz/folyadék szétválasztás következtében – nagy mennyiségű K vagy Na ion jut, a láng energiát veszít, ami által az arzin disszociációja kisebb mértékű lesz, azaz a jel/zaj arány csökken. Feltételezhetően, az illékony NH_3 a lángban könnyen, kis energiabefektetéssel disszociál, ezért nem okoz jelintenzitás csökkenést. Ezen felül az ammónia feltehetőleg elősegíti a reakciócellában lejátszódó hidridképzési folyamatokat, ezáltal nagyobb mennyiségű As kerülhet a detektorba.

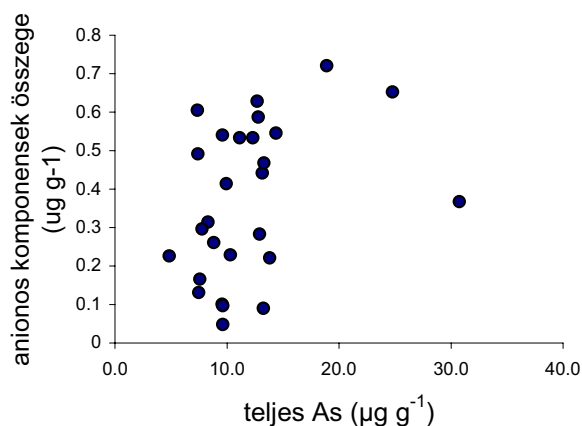
A fentiek alapján a tengeri kagylók arzénspeciációs elemzésére anioncserés HPLC-HG-AFS csatolt rendszerben 20 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ puffert (pH = 5.6) használtam. Ez esetben az elválasztás 10 perc alatt megvalósult As(III), DMA, MA és As(V) elúciós sorrenddel.

Mivel a kationos komponensek közvetlenül nem hidridképzők, a fenti rendszerben jelet nem adnak. Az AB és az AC elválasztását és detektálását HPLC-PO-HG-AFS rendszerrel valósítottam meg. Ez esetben az UV-fény energiája, valamint az oxidáló ágens segíti a kationos komponensek bomlását, ami által azok hidridképzésre alkalmassá válnak. A rendszerben az anionos komponensek az AB előtt, az eluensfronttal távoznak az oszlopról. A rendszerek részletes leírását a 3.7.6.2, a 4.5 és a 5.1 fejezetek tartalmazzák.

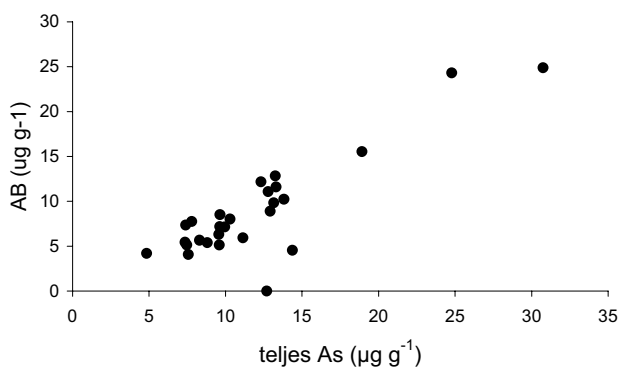
A 15. táblázatban az anionos módosulatok mennyisége látható. Az AB-nél jóval toxikusabb anionos módosulatok összege 48-720 ng/g, mely három nagyságrenddel kevesebb, mint a nem toxikus AB mennyisége. A velencei mintáknál a legtöbb esetben mind a négy toxikusnak mondott anionos módosulatot detektáltam. A Szardínia-sziget körül gyűjtött mintáknál csak két módosulat mennyisége volt a kimutatási határt meghaladó, MA-t és As(V)-t nem detektáltam. A teljes arzénkoncentrációval ellentétben az anionos speciesz-mintázatok alapján nem adódik különbség az egyes mintavételi helyek között.

A kationos komponensek közül a munkámban az AB és az AC módosulatok mennyiségét határoztam meg. A retenciós idők alapján (AB: kb. 6 perc, AC: kb. 18 perc) a két komponens elválasztása 20 perc alatt megvalósítható. (21. ábra) Az eredmények szerint (15. táblázat) AC egyik mintában sem volt kimutatható mennyiségben, míg az irodalmi eredményekkel egyezően minden esetben nagy mennyiségű AB-t detektáltam (SHIOMI, 1987, CULLEN, 1989). Ha az AB koncentrációkat vizsgáljuk, látható, hogy a Velencei-öböl keleti partján gyűjtött azonos fajú kagylókban nagyobb mennyiség mérhető, mint a nyugati partnál. Ez a megfigyelés tehát a teljes arzénkoncentráció esetében megfigyelt tendenciával azonos. Ehhez hasonlóan a Szardínia-mintákban meghatározott AB nagyjából egyenletes eloszlást mutat.

A monitorozás eredményei alapján látható, hogy a kagylók által felvételre került módosulatok több mint 90%-ban nem toxikus AB formájában raktározódtak. Az anionos módosulatok mennyisége és a teljes arzén-koncentrációk között összefüggést nem találtam, miáltal kijelenthető, hogy a nagyobb mennyiségben felvett arzén nem jelenti a nagyobb toxicitású anionos módosulatok felhalmozódását. (31. ábra/a) Ezzel ellentétben, ha az AB mennyiségét a teljes arzénkoncentráció függvényében ábrázoljuk látható, hogy egyenes arányosság állítható fel: nagyobb arzénakkumuláció esetében nagyobb mennyiségű nem toxikus AB detektálható (31. ábra/b).



31. ábra/a Anionos komponensek mennyisége a teljes arzénkoncentráció függvényében



31. ábra/b AB koncentráció a teljes arzénkoncentráció függvényében

A bevezetésben feltett kérdésre az eredmények alapján a következő válaszok adhatók.

1. A kagylókban talált AB egyenes arányú összefüggést mutat a teljes arzén mennyiségével, míg az anionos komponensek esetében ez nem mondható el.
2. Monitorozási szempontokból a teljesarzén-koncentráció megfelelően mértékben tükrözi a környezet arzénszennyezettségét, a speciációs eredmények által nem jutunk többletinformációhoz.
3. Az AB dominancia kagylók esetében általános érvényű, és az arzénakkumuláció mértékével arányosan nő. Ezáltal a nagyobb mértékben arzénszennyezett területről származó kagylóminta nagyobb mennyiségű nem toxikus AB-t halmoz fel, miáltal nem jelent egészségügyi kockázatot a fogyasztó számára.

5.4 GOMBAMINTÁK ARZÉNSPECIÁCIÓS ELEMZÉSE

Amint a 3.11 számú irodalmi fejezetben bemutatásra került, a gombák képesek nagy mennyiségben arzént akkumulálni. Mára már az is kiderült, hogy a gombák arzénspeciációs mintázata nagyon különböző lehet, de a legtöbb vadon élő faj főként szerves arzénmódosulatokat tartalmaz. Ebben a fejezetben a bevezetőben is megfogalmazott kérdésekre keresem a választ miszerint: (i) összehasonlítok néhány gyakran alkalmazott kinyerési technikát speciesösszetétel és kinyerési határfok szempontjából, valamint (ii) megvizsgálom, hogy az arzén milyen mértékben és milyen formában dúsul fel a mesterségesen arzénszennyezett talajon termesztett gombában.

5.4.1 *Extrakciós technikák összehasonlítása*

A kísérletben arra kerestem választ, hogy az irodalomban említett extrakciós technikák alkalmazásával adódik-e szignifikáns különbség a kinyerhetőségben, illetve a speciesz mintázatban. Vadon élő *Amanita muscaria* (Légyölő galóca) gombát gyűjtöttünk Geisthal községben, mely a Stíriai Alpokban fekszik. A gombákat mintagyűjtést követően fagyasztva szárítottuk, majd laboratóriumi darálóval porrá őröltük, homogenizáltuk. A gombák átlagosan 90% víztartalommal bírtak. A minta teljesarzén-mennyiségének meghatározásához a nedves roncsolást alkalmaztam. Kvarccsőbe 500 mg száraz port mértem be, a mintákhoz 2-2 ml salétromsavat adtam, majd a mintákat zárt roncsolóban 40 bar nyomáson és 250 °C-on 1 órán át roncsoltam (Mutiwave 3000 mikrohullámú feltáró). Roncsolás után a víztiszta roncsolmányt ioncserélt vízzel 10 ml-re hígítottam. A minta arzénkoncentrációja három párhuzamos mérésből számolva 2.27 ± 0.06 mg/kg. A mintákban található arzénmódosulatokat extrakciós technikákkal vontam ki. Kísérletemben az irodalomban talált vizes-, metanol-vizes rázatás technikákat, valamint az ultrahang segítségével végzett extrakciós módszereket hasonlítottam össze. Érdekesképpen, eltérő polaritású oldószerekkel is végeztem kinyeréseket, melyekkel az apoláris arzénmódosulatok esetleges jelenlétét terveztem bizonyítani. A kinyeréseket az alábbiak szerint végeztem.

Rázatás szobahőmérsékleten: A bemért mintamennyiséghez 10 ml ioncserélt vizet adtam, majd az így előkészített szuszpenziót éjszakán át szobahőmérsékleten rázattam.

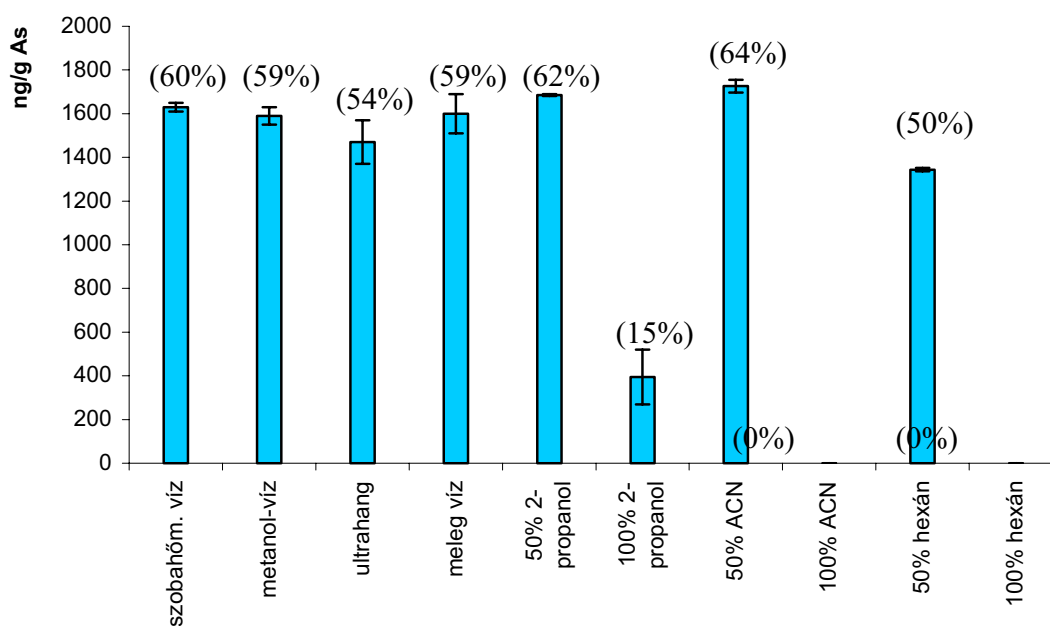
Extrakció ultrahang segítségével: A bemért mintához 10 ml ioncserélt vizet adtam, majd a mintákat 20 percre szobahőmérsékletű ultrahangos fürdőbe állítottam. A minták a 20 perc alatt átmelegedtek.

Meleg vizes rázatás: A mintákhoz 10 ml ioncserélt vizet adtam, majd a szuszpenziót temperált vizes rázóban, 80 °C-on egy éjszakán át rázattam.

Extrakció metanol-víz 1:1 elegyével: Hasonlóan az előzőekhez, de extrahálószerként az oldószerkeveréket alkalmaztam.

Extrakció különböző polaritású oldószerekkel: 2-propanol, acetonitril (ACN) és hexán 50 v/v%-os és 100 v/v%-os elegyével végeztem az extrakciókat (a hígításhoz ioncserélt vizet használtam).

Minden esetben 500 mg körüli mennyiségeket mértem be. Az extrakciós technikákkal kinyert arzénkoncentráció mennyiségi meghatározását nedves roncsolással hajtottam végre. Kvarccsőben az extraktum 1 ml-éhez 1 ml tömény salétromsavat adtam, majd a minták szerves anyag tartalmát az előzőekhez hasonlóan zárt roncsolóberendezésben roncsoltam. A mintákat ioncserélt vízzel 10 ml-re hígítottam. A kinyert arzénmennyiséget a minta teljesarzén-koncentrációjához hasonlítva számoltam az extrakciós hatásfokot. A különböző extrakciós technikákkal kinyert arzénkoncentrációkat a 32. ábra mutatja.



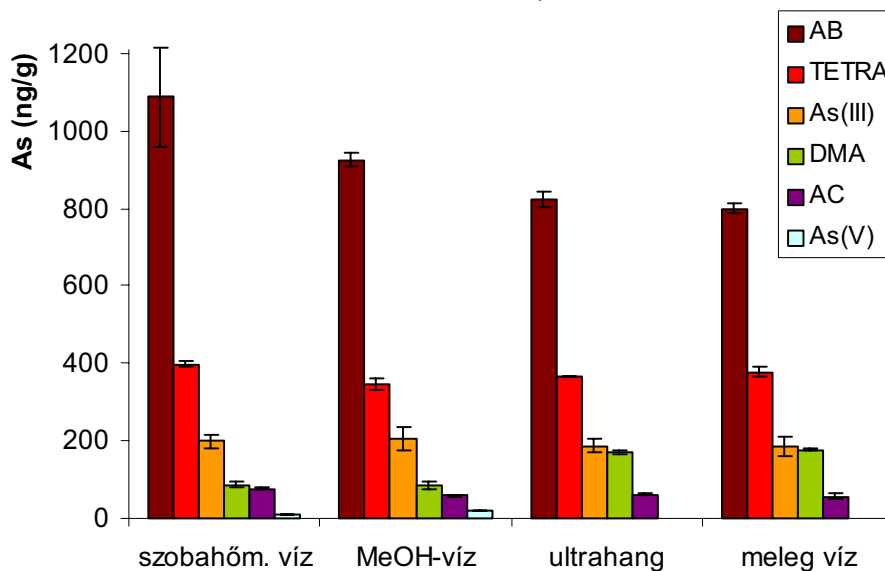
32. ábra Az alkalmazott extrakciós technikákkal kinyert arzénkoncentrációk. Zárójelben a kinyerési hatások látható.

Az ábrán látható, hogy az irodalmi adatok alapján leggyakrabban alkalmazott extrakciós technikák között (első négy technika) szignifikáns különbség nem adódott. A kinyerési hatások átlagosan 58%. Ez alulmarad az irodalomban említett 70–80%-tól, mely magyarázható az egyes gombafajok közti eltéréssel. A gombában nincs kimutatható mennyiségben lipidoldékony arzénmódosulat, hiszen mint az ábrán látszik, az acetonitriles és a hexános rázással nem oldódott ki detektálható arzénmennyiség. Az 50 v/v% ACN-víz, illetve hexán-víz technikáknál a vízfázisnak köszönhető a kismértékű kioldás. A

metanolnál kevésbé polárosabb izopropanol a vízoldható módosulatok csak egy részét képes kioldani, míg vízzel keverve a teljes arzénkoncentráció 62%-a kinyerhető. Jelenleg nem ismerünk megoldást arra, hogy milyen módszerrel vonható ki a maradék 40%. Mint a bevezetőben erre már kitértem, a kinyerhetőségnek határt szab a módosulatszemplélet, miszerint az arzénmódosulatot eredeti formájában kell hagyni ahhoz, hogy megfelelő következtetéseket levonhassunk. Egy határon túl már nem használhatunk drasztikusabb oldószereket/módszereket, melyek magában hordják a módosulatátalakulás veszélyét. Ezekben az esetekben meg kell elégedni a kisebb kinyerési hatásfokkal, mely bár kevesebb információt szolgáltat a módosulatok összességéről, mégis az valóság. A kérdésre megoldási alternatívát kínálhat a több lépésben végrehajtott extrakció, mely feltételezhetően nagyobb mennyiségű módosulatot tenne szabaddá.

A továbbiakban megvizsgáltam, hogy specieszösszetétel szempontjából van-e különbség az egyes (a táblázatban első négy) technikák között. A speciációs mérésekhez anioncserés és kationcserés HPLC-ICP-MS technikát alkalmaztam, mely által 12 arzénmódosulat meghatározása hajtható végre. (10. táblázat/b, c, 24. ábra, 22. ábra) A gombában az irodalmi adatokkal jól összecsendő specieszmintázatot találtam: AB alkotta a módosulatok nagy részét, kisebb részben TETRA, DMA, AC és szervesetlen As módosulatokat detektáltam (33. ábra) (KUEHNELT, 1997). Ismeretlen komponenseket a mintákban nem találtam. Az egyes extrakciós technikák által kinyert specieszek eloszlását a 33. ábra mutatja.

33. ábra Az alkalmazott extrakciós technikákkal kinyert arzénmódosulatok eloszlása



33. ábra Az alkalmazott extrakciós technikákkal kinyert arzénmódosulatok eloszlása

Az első észrevehető különbség az As(III)-As(V) arányban látható, ami a meleg vizet használó technikák esetében (ultrahang és meleg vizes rázatás) az As(V) felé tolja el az egyensúlyt. Ez a jelenség a vízmintákkal foglalkozó fejezetben részletezett okok miatt könnyen magyarázható. Másik különbség a DMA és az AB koncentrációjában adódik. Az ábra szerint az első két technika esetében magasabb AB koncentrációk, míg a második két technika esetében magasabb DMA, de kisebb AB koncentráció volt mérhető. Felfedezhető, hogy minden technikánál a DMA és az AB koncentrációjának összege azonos. Elvileg feltételezhető, hogy az AB (trimetilált módosulat) DMA-ra (dimetilált módosulat) bomlana fizikai behatás (ultrahang vagy magasabb hőmérséklet) hatására. Ez az átalakulás azonban kis mértékű, hiszen az AB mennyiségének kevesebb, mint 10%-át érinti. Másrészt, irodalmi adatok alapján a feltételezést teljes mértékben el kell vetnem, hiszen bizonyítást nyert az AB nagy mértékű hőstabilitása (GOESSLER, 2003) A többi detektált módosulat esetében a négy technika között különbség nem adódott. Összességében tehát elmondható, hogy szignifikáns eltérés a módosulatok egymáshoz viszonyított arányában nincs. A technikák mindegyike alkalmas arzén módosulatanalitikai mintaelőkészítésre azt a szempontot figyelembe véve, hogy a szervesetlen módosulatok speciációs szempontból együtt kezelendők. A legegyszerűbb módszernek a hideg vizes rázatás tűnt, ezáltal ezt a módszert alkalmaztam gombavizsgálatokra a későbbiekben.

5.4.2 Arzénfelvétel és metabolizmus vizsgálata termesztett gombában

A kísérlethez kontrollált körülmények között termesztett csiperkegombát – *Agaricus bisporus* – használtam, melyet (i) 1000 mg/kg arzenát tartalmú komposzton (kezelt), valamint (ii) kezeletlen komposzton (kontroll) neveltek a kerecsendi Quality Champignons Kft. gombaüzemében Dr. Rácz László közreműködésével és segítségével. A munka célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk, milyen mértékben képes a gomba a termesztési ciklus folyamán arzént akkumulálni (biokoncentrációs faktor), valamint a felvett arzén milyen módosulat formájában jelenik meg a gombában. Az eredményeket a Food Control folyóirat 2005/16. számában adtuk közzé, melynek összefoglalását jelen fejezetben tárgyalom. (SOEROES, 2005a)

A gombatermesztéshez az üzemben rutinszerűen alkalmazott komposztot használták, melyet búzaszalma és trágya keverékéből állítottak össze. A „kezelt” termesztőközeg előállításához Erlenmeyer lombikba 9.8 g As₂O₅-t mértünk be, majd a higroszkópos anyagot 100 ml ioncserélt vízben oldottuk fel. Ezt az oldatot adagoltuk 20 kg száraz, sterilizált komposzthoz, majd a termesztő közeget még egyszer homogenizáltuk. A „kontroll” termesztőközeg arzénoldatot nem kapott. Kb. 800 g micéliummal oltottak be 20 kg termesztőközeget, mely aztán fekete, lukacsos műanyag zsákba került. A zsákok egy hónapon keresztül sötét helyen, 20 °C hőmérsékleten inkubálódtak, ahol a levegő

nedvességtartalmát 90–95%-ra állították be. A gombatermést egy hónap elteltével szüreteltük. A gombák felületén, színén mérgezésre utaló nyomokat nem találtunk. A kísérletben teljesarzenmeghatározást valamint arzénspeciációs elemzést végeztem a „kezelt”, illetve a „kontroll” termőtesteken, valamint a „kontroll” termesztőközegen (a „kezelt” gombakomposzton arzénmeghatározást nem végeztem, mert mint korábban említettem, mesterségesen arzenáttal dúsított közegről van szó, melyben a teljes arzéntartalom számolás alapján 1004 mg/kg).

Az összegyűjtött mintákat fagyasztva szárításos technikával vízmentesítettük, majd laboratóriumi darálóban homogenizáltuk. A teljes arzénkoncentráció meghatározásához nedves roncsolást, az arzénspeciációhoz a gombaminták esetében hideg vizes rázatást, a „kontroll” termesztőközeg esetében az irodalomban is alkalmazott 1.5 M ortofoszforsav oldattal végzett rázatást alkalmaztam. Ez utóbbi savas extraktumot kromatográfias elválasztást megelőzően ammóniával semlegesítettem. A speciációs mérésekhez anion- és kationcserés HPLC-ICP-MS technikákat használtam. A biokoncentrációs faktor számolásához elsőként meghatároztam a termesztőközeg és a gombaminták teljesarzenkoncentrációját. (16. táblázat)

16. táblázat Teljes arzén koncentráció a „kontroll” és a „kezelt” mintákban, koncentrációs faktorok.

	‘Kontroll’		‘Kezelt’	
	Termesztőközeg	Gomba	Termesztőközeg	Gomba
Teljes As [mg/kg száraz anyag]	3.8 ± 0.2	0.50 ± 0.03	1004*	22.8 ± 1.0
Biokoncentrációs faktor	0.131		0.023	

*számolt érték

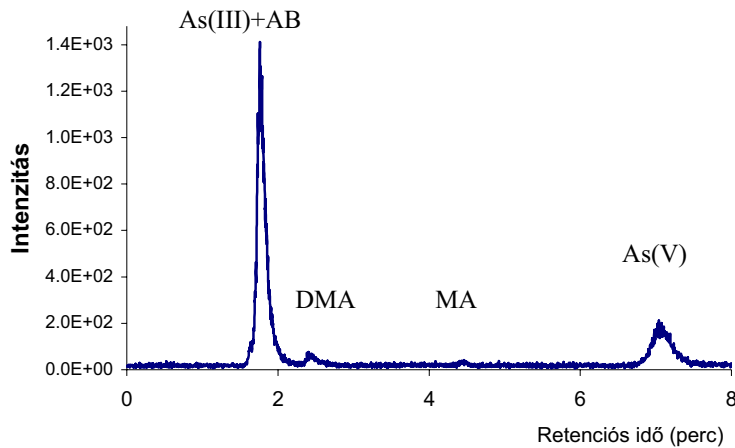
Az eredmények szerint a „kontroll” termesztőközegben mért arzénmennyiség jól illeszkedik az irodalomban is olvasható nem szennyezett talaj koncentrációtartományába (1–40 mg/kg) (MONTPERRUS, 2002) A „kontroll” és a „kezelt” gombaminták rendre 0.50 és 22.8 mg/kg arzént tartalmaztak. A kontroll gomba esetében elmondható, hogy ez a koncentráció jól egyezik az irodalomban nemrég leírt, svájcban termesztett csiperke átlagos arzéntartalmával (0.05-1.50 mg/kg, STIJVE, 2003). A biokoncentrációs faktor egy jelzőszám, mely az elemfelhalmozás mértékéről nyújt információt és a gombában, illetve a talajban található teljes arzénmennyiség aránya. A faktor mindkét esetben kisebb volt, mint egy, azonban a „kontroll” minta esetében egy nagyságrenddel nagyobbak adódott, mint a „kezelt” mintánál. Az adatok szerint a gombák által felvett arzén mennyisége nem áll egyenes arányosságban a termesztőközegben mért arzénkoncentrációval. Zhang definíciója szerint

azokat az élőlényeket nevezhetjük hiperakkumulátornak, melyek akkumulációs faktora >1 , miszerint ez a gombafaj nem hiperakkumulátor; azonban kétségkívül bizonyos mértékben képes arzént felhalmozni.(ZHANG, 2002)

17. táblázat A termesztőközegben és a gombában meghatározott arzénkomponensek

	Arzén koncentráció [ng/g]		
	„kontroll” minta		„kezelt” minta
	Termesztőközeg	Gomba	Gomba
As(III)	548 ± 15	<8	14500 ± 400
DMA	225 ± 25	116 ± 2	192 ± 23
MA	<16	10.9 ± 2.1	40.3 ± 9.3
As(V)	1360 ± 20	15.4 ± 1.4	5760 ± 250
AB	<10	307 ± 77	141 ± 44
TMAO	379 ± 28	<5	<25

A 17. táblázat az arzénmódosulatok eloszlását mutatja a vizsgált mintákban. A „kontroll” termesztőközegben legnagyobb mennyiségben a toxikus szervesetlen specieszeket mutattam ki, míg kisebb mennyiségben TMAO-t és DMA-t is meghatároztam. Ez utóbbi módosulatok nem tipikus összetevői a talajmintáknak, de jelen esetben előfordulásuk azzal magyarázható, hogy a vizsgált termesztőközeg tulajdonképpen biotrágya és szalma speciális keveréke. Ezzel ellentétben a nem kezelt közegen nevelt csiperke főleg szerves módosulatokat tartalmazott, és csak a módosulatok 4%-a volt jelen szervesetlen arzén formában. DMA mind a termesztőközegben, mind a gombában jelen volt, MA-t csak a gombában detektáltam. Érdekes, hogy a gombából kinyerhető arzénmennyiség 68%-a AB volt, mely módosulatot nem találtam a termesztőközegben. Hasonló nagyságrendben mutattam ki AB-t a „kezelt” gombában is, míg a DMA és az MA mennyisége ez utóbbiban 2-4-szer nagyobbak adódtak, mint a kezeletlen gomba esetében. Ez a megfigyelés a gombaszervezet kífokú metilációs képességére enged következtetni. Mint a táblázatban is látható, a leginkább domináns arzénmódosulat a „kezelt” gombában a szervesetlen arzén volt, mely a kinyert arzénmennyiség 98%-át tette ki. Ez alapján állítható, hogy a gomba a termesztőközegben található arsenát nagy részét az egészségre ártalmas szervesetlen arzén (As(III) és As(V)) formájában veszi fel, és beépíti a gombaszövetbe anélkül, hogy szignifikáns mértékben szerves módosulattá alakítaná. A „kezelt” *Agaricus bisporus* anioncserés kromatogramja az 34. ábrán látható.



34. ábra A kezelt *Agaricus bisporus* gomba extraktumának anioncserés kromatogramja. (Kromatográfias oszlop: PRP-X100, eluens: 20 mM $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, pH=5.6)

Ebből a szempontból tehát a termesztett csiperkegomba különbözik a vadon élő gombáktól, melyek biometilációs folyamatok során szintetizált, döntően szerves arzénmódosulatot tartalmaznak. Erre a megfigyelésre logikus magyarázatként szolgálhat a micéliumok eltérő élethossza. A természetben a vadon élő micélium több évig életképes – tudtommal a legidősebb micélium 400 évig élt (SLEJKOVEC, 1996a) –, élete során rendszeres időközönként termőtesteket érlel. Ezzel szemben a termesztett csiperke esetében a szaporítóanyagot (micélium) csak 1 hónappal a termőtest érése előtt oltották a komposztba. Ez az időintervallum valószínűleg nem elég hosszú a bonyolult metilációs anyagcsere-folyamatok lejátszódásához. Hozzá kell tennünk, hogy a vadon élő gomba természetes erdőtalajon növekszik, mely számos mikroorganizmusnak is otthont ad, míg a termesztéstechnológia során az esetlegesen romlást beindító folyamatok elkerülése végett a komposztot sterilizálják. Ez a művelet szintén befolyásolhatja a metilációs folyamatokat. Az adatok szerint fel kell hívni a figyelmet arra, hogy a termesztett csiperke képes nagy mennyiségű As(V) felvételére, ezért mindenképpen javasolt a termesztőközeg előzetes kémiai ellenőrzése.

5.4.3 A mérés minőségbiztosítása

A gombaminták speciációs arzénelemzéséhez olyan CRM-ekre lenne szükség, melyek a vizsgálat mintákkal azonos nagyságrendben tartalmazzák az arzént, azonos formákat tartalmaznak és mint legfontosabb kritérium, azonos mátrixanyagok a vizsgálandóval. Ezen kritériumok egyike sem teljesíthető a rendelkezésünkre álló hitelesített anyagminták felhasználásával. Több mint két arzénmódosulatra hitelesített CRM nem létezik, a tengeri állatok akkumulációs képessége pedig a gombákét meghaladja, valamint a specieszmintázat is eltérő, ezért fenntartásokkal alkalmazhatók

CRM-ként. Jobb lehetőség hiányában a gombaminta és a természetközeg teljesarzen-meghatározásának minőségbiztosításához DORM-2 (Tőkehal izom, National Research Council, Kanada), valamint NIST 2711 (Montana talaj, National Institute of Standard and Technology, USA) hitelesített anyagmintákat használtam. Arzenspeciációs elemzésekhez szintén a DORM-2 anyagminta AB-re hitelesített mérési adata szolgált referenciául. Minden esetben a mért koncentrációértékek a hitelesített tartományban voltak (18. táblázat)

18.táblázat Hitelesített referenciaminták arzenspeciációs eredményei

	Teljes As koncentráció (mg/kg)		AB koncentráció (mg/kg)	
	mért érték	hitelesített érték	mért érték	hitelesített érték
Nist 2711	107 ± 11	105 ± 8		
DORM-2	17.9 ± 0.8	18.0 ± 1.1	15.6 ± 0.4	16.4 ± 1.1

Összefoglalásként elmondható, hogy (i) a vadon élő Légyölő galóca (*Amanita muscaria*) arzenspeciációs vizsgálatához alkalmazott tízféle extrakciós módszer hatásfoka között négy esetben szignifikáns különbséget nem találtam. (ii) Bizonyítottam, hogy a négy leggyakrabban alkalmazott kinyerési technikával extrahált arzénvegyületek eloszlása azonos, módosulatanalitikai célra a technikák mindegyike alkalmas azt figyelembe véve, hogy a szervesetlen arzénvegyületek speciációs szempontból együtt kezelendők. (iii) Munkámban bizonyítást nyert, hogy a termesztett csiperke (*Agaricus bisporus*) az arzenáttal dúsított komposztból képes arzént felvenni, de azt a továbbiakban szignifikáns átalakítás nélkül, szervesetlen arzénmódosulat formájában raktározza, miáltal a természetközeg előzetes kémiai ellenőrzése javasolt.

5.5 ARZÉNSPECIÁCIÓ ÉDESVÍZI KÖRNYEZETBEN I. – ÉDESVÍZI HALAK

A 3.12 fejezetben bemutattam, hogy az a néhány közlemény, amely az édesvízi halak arzénspeciációs elemzéséről számol be nem mutat egybehangzó képet a módosulatok eloszlásáról. Utaltam arra, hogy a hazai adottságok (dél-alföldi arzénes rétegvizek) fokozottan indokoltá teszik a tenyésztett, valamint a szabadon élő halak arzénspeciációs vizsgálatát.

Doktori munkámban az arzénszennyezettséggel érintett dél-alföldi területen tenyésztett halak módosulatanalitikai vizsgálatát végeztem el, mely munka eredményeiről a Journal of Agricultural and Food Chemistry című folyóirat 53/23-as számában számoltam be. Jelen fejezetben a kézirat összefoglalását teszem közzé. (SOEROES, 2005b)

5.5.1 Mintavétel

Az adatok megbízhatóságának érdekében munkámban nagy hangsúlyt fektettem a mintavételre. Minden mintavételi helyen $n > 6$ számú halmintát vettem, melyeknek melluszony feletti izomszövetéből kb. 200 g-ot hasítottam ki. A mintákat ioncserélt vízzel átmostam, 2-3 cm-es darabokra vágtam, a mintákat mélyfagyasztottam, majd fagyasztva szárítottam. Minden mintavételi pont esetében polietilén csövekbe vízmintát is merítettem, melyeket a laboratóriumba érkezést követően salétromsavval savanyítottam (1%), és az analízisig 4°C-on tartottam.



35.ábra Mintavételi pontok elhelyezkedése. Kör jelzi az arzénszennyezett rétegvizek előfordulását Magyarországon. Mintavételi pontok: 1: Füzesgyarmat, 2, 3, 7: Szarvas, 4: Tuka, 5: Szajol, 6: Biharugra, 8: Látvány.

A vizsgálat során nyolc mintavételi helyről gyűjtöttem hal- és vízmintákat. A mintavételi pontok elhelyezkedését az 35. ábra szemlélteti. Látható, hogy a pontok közül hat (1, 2, 3, 5, 6, 7) a körrel jelölt arzénszennyezett területre esik, kettő (8, 4) pedig – mint kontroll mintavételi helyek – a területtől távol helyezkednek el. Munkámban két halfaj elemzését végeztem el.

A pontyokat (*Cyprinus carpio*) halgazdaságoktól vásároltam, melyek esetében a felszíni vízkészletet (tavakat, víztározókat) használják a halak tenyésztésére. A pontyok haltápot nem kaptak, a halastóban kialakult természetes biológiai rendszerben éltek.

Az afrikai harcsákat (*Clarias gariepinus*) tankokban nevelik, melyeken folyamatosan meleg (28 °C-os) termálvizet áramoltatnak keresztül. Ilyen tenyésztőtelep fényképét mutatja a 36. ábra.



36.ábra Afrikai harcsa tenyésztőtelep Békés megyében

A mesterséges környezetben nevelt harcsák hetente 3 alkalommal automata etetőberendezés segítségével haltápot kapnak, melynek összetétele nem ismert. Munkám során a liofilezett haltáp arzénspeciációs elemzését is elvégeztem. A különböző mintavételi helyekhez rendelt halfajokat a 19. táblázatban mutatom be.

19. táblázat A különböző mintavételi helyeken gyűjtött minták, valamint azokban mért teljes arzénkoncentráció.

Mintavételi pontok	Gyűjtött minták	n	Átlagos hossz [cm] (RSD%)	Halak teljes As koncentrációja [$\mu\text{g kg}^{-1}$] (RSD%)	vízminták eredete	Vízminták teljes As koncentrációja [ngml^{-1}] (RSD%, n=3)	
1	Füzesgyarmat	10	51 (6)	4720 (12)	mélyiségi víz	162**	
2	Szarvas termálkút A	10	49 (8)	2980 (18)	mélyiségi víz	152 (0.5)	
3	Szarvas termálkút B						
	Afrikai harcsa (<i>Clarias gariepinus</i>)		8	42 (4)	2510 (32)	mélyiségi víz	187 (0.5)
4	Tuka	8	46 (4)	2650 (14)	mélyiségi víz	15.1 (1.4)	
5	Szajol	10	40 (5)	168 (62)	felszíni víz	2.5 (21)	
6	Biharugra	10	44 (5)	62.2 (38)	felszíni víz	0.7 (7.1)	
7	Szarvas halastó						
	Közönséges ponty (<i>Cyprinus carpio</i>)		8	36 (7)	90.3 (44)	felszíni víz	13.2**
8	Látrány	6	39 (3)	363 (11)	felszíni víz	3.2**	
	haltáp		3		2880 (1.7)		

n: ismétlések száma

** : kevesebb, mint három minta állt rendelkezésemre

Látható, hogy a harcsamintákat a kitüntetett régióon belül Füzesgyarmat, valamint Szarvas településeken működő tenyésztőtelepekről gyűjtöttem be. Szarvason a telep vízellátását két, egymástól független (vízzáró réteggel elválasztott) termálkútból valószínűsítjük meg (A és B minták). Kontroll mintának a Tuka településen gyűjtött harcsákat szántam, mivel ez a terület több mint 80 km-re helyezkedik el az arzénszennyezett régiótól. A pontymintákat a szajoli, a biharugrai és a szarvasi halastavakból gyűjtöttem. Kontroll mintaként a Balaton mellett fekvő látrányi halgazdaságból vásárolt halakat használtam, mely terület 250 km-re fekszik a kijelölt régiótól.

5.5.2 Mintaelőkészítés

A teljes arzénkoncentráció meghatározásához az „Anyagok és módszerek” fejezetben részletezett nedves roncsolásos technikát alkalmaztam Milestone ultraCLAVE mikrohullámú roncsolóberendezés segítségével.

Arzénspeciációs elemzéshez metanolos extrakciót használtam. Ez esetben az 500–1500 mg bemért száraz pormintákhoz 10 ml metanolt adtam, majd a szuszpenziót éjszakán át szobahőmérsékleten rázattam. A minták centrifugálását követően (1800 rpm, 10 min) aliquot részt (2ml) polipropilén centrifugacsövekbe mértem, majd az oldatot szobahőmérsékleten Maxi Dry berendezés segítségével szárazra pároltam. A bepárlási maradékra 2 ml (harcsák esetében) és 1 ml (pontyok, haltáp esetében)

ioncserélt vizet öntöttem, majd az oldatot újból homogenizáltam. Mérés előtt a mintákat 0,22 µm-es Nylon filterrel szűrtem.

5.5.3 *Anyagok és módszerek*

A munka során az „Anyagok és módszerek” fejezetben felsorolt reagenseket és műszereket használtam. A teljes arzén meghatározásához Agilent 7500c ICP-MS készüléket, az arzénspeciációhoz Hamilton PRP-X-100 anioncserélő és Zorbax 300-SCX kationcserélő kolonnákat használtam. Azon célból, hogy az anioncserés speciációs rendszer kimutatási határát javítsam, egy hidridképző egységet is beépítettem a kolonna és az ICP-MS közé. Ezzel a módszerrel a hidridképző módosulatok (As(III), As(V), DMA, MA, arzenocukrok) meghatározását végeztem el.

5.5.4 *Eredmények*

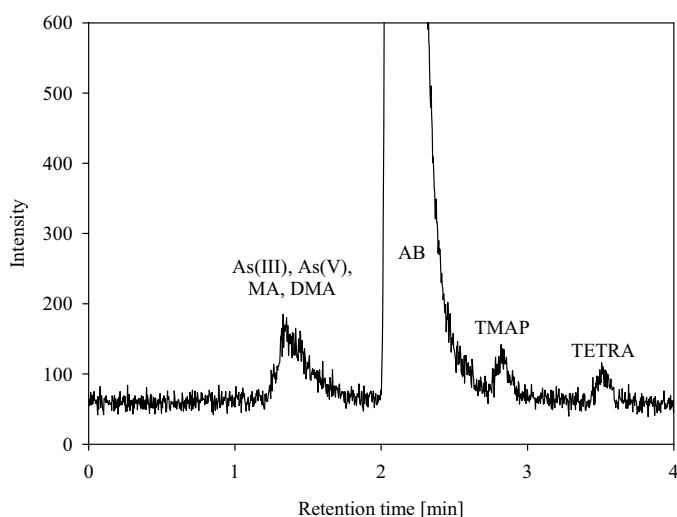
5.5.4.1 *Teljesarzén-koncentráció*

A mérési eredmények tárgyalását a vízminták teljesarzén-koncentrációjával kezdem. (19. táblázat) A legnagyobb arzénkoncentrációt a Füzesgyarmaton és Szarvason (1–3 mintavételi pontok, 35. ábra) gyűjtött termálvizekben mértem, ahol ez az érték 162–187 ng/ml-nek adódott. A jelenleg is érvényben levő ivóvízszabványban leírt maximális arzénkoncentrációhoz (10 ng/ml) képest ez a mennyiség 15–18-szor nagyobb. A kontroll területen (Tuka, 4. mintavételi pont) gyűjtött termálvíz a fentiekhez képest szignifikánsan kisebb mennyiségű, 15 ng/ml arzént tartalmazott. Ezek a mérési adatok jól egyeznek Csanády és munkatársai hasonló témában végzett kutatási eredményeivel. (CSANÁDY, 1998) A felszíni vizekben mért arzénkoncentráció általában alacsony (≤ 3.2 ng/ml), egyetlen kivétel a szarvasi halastó, melyben 13 ng/ml arzénkoncentrációt detektáltam. A nagyobb mennyiség azzal magyarázható, hogy a tavat a Körös folyó táplálja, mely antropogén eredetű arzénnel szennyezett. (GERGELY, 1997)

A pontyminták 60–360 ng/g arzént tartalmaznak. (19. táblázat) Mérési eredményeim jól egyeznek más, nem arzénszennyezett területről származó édesvízi halak arzénkoncentrációs értékeivel. (SLEJKOVEC, 2004, DAS, 2004) Ugyanakkor az afrikai harcsák arzénakkumuláló képessége szignifikánsan nagyobb, mint a pontyoké: 2510–4720 ng/g arzénmennyiséget halmoztak fel. (19. táblázat) Ez az érték sokkal nagyobb bármely irodalomban publikált édesvízi hal eredményeihez képest. (KAISE, 1997, HUANG, 2003, ZHENG, 2004, CHEN, 2000, KOCH, 2001) Feltételezem, hogy a nagyobb arzénterheltség a 2880 ng/g arzéntartalmú haltáp rendszeres fogyasztásával magyarázható. (19. táblázat) Sem a ponty, sem pedig az afrikai harcsák esetében nincs korreláció a vízben és a halakban meghatározott arzénmennyiségek között.

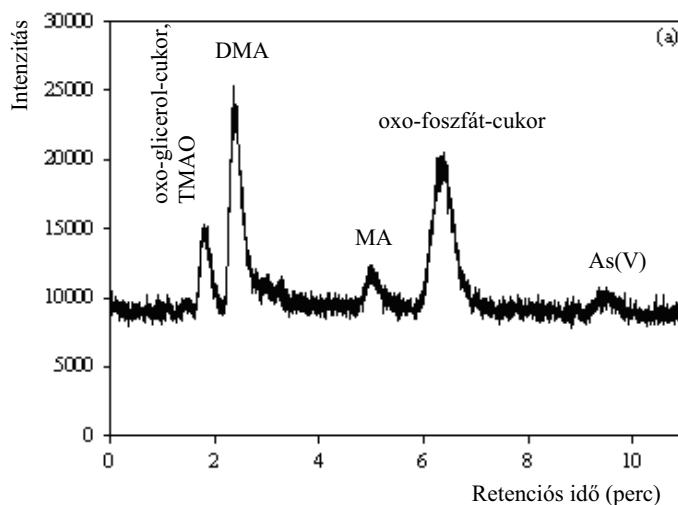
5.5.4.2 Arzénspeciáció

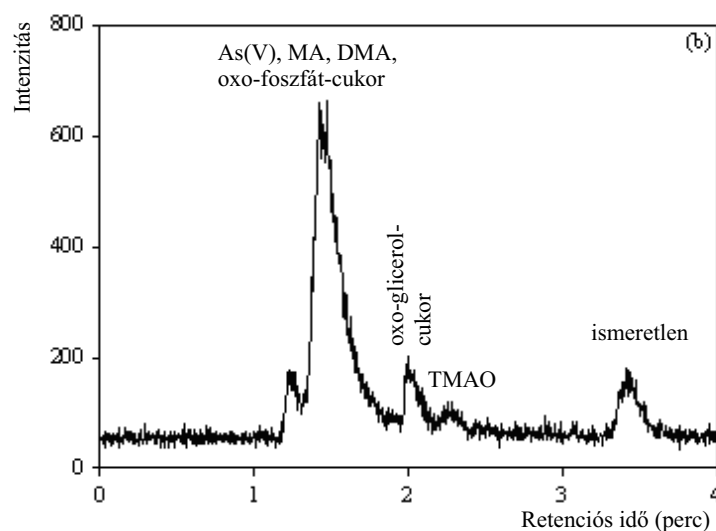
A minták speciációs analízise kapcsán nagy különbség rajzolódik ki a két halfaj esetében. (20. táblázat) A harcsákban – a tengeri halakkal egyezően – több mint 90%-ban az AB domináns jelenléte tapasztalható. Néhány más arzénmódosulatot is detektáltam, de csak nyomnyi mennyiségekben, mint például a TMAP, TETRA, DMA, MA, As(V) és As(III). (37. ábra)



37. ábra Fűzesgyarmaton (1. mintavételi pont) gyűjtött afrikai harcsa minta extraktumának kation-cserés kromatogramja (kromatográfias oszlop: Zorbax 300-SCX, eluens: 20 mM piridin-formiát, pH=2.6)

Ezzel szemben egyik pontyminta sem tartalmazott detektálható mennyiségű AB-t, a legtöbb esetben csak a négy anionos módosulatot (As(III), MA, DMA, As(V)) mutatható ki. Kivételnek számít a nyolcas mintavételi hely (kontroll), ahol az oxo-foszfát-arzenocukor módosulat domináns jelenléte detektálható. (38. ábra)





38. ábra (a) Látrányban (8. mintavételi pont) gyűjtött pontyminta extraktumának anion-cserés kromatogramja (kromatográfiás oszlop: Hamilton-PRP-X100, eluens: 20 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ / $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pH=5.6)

(b) Látrányban (8. mintavételi pont) gyűjtött pontyminta extraktumának kation-cserés kromatogramja (kromatográfiás oszlop: Zorbax 300-SCX, eluens: 20 mM piridin-formiát, pH=2.6)

Ezen minták mindegyikében nyomnyi mennyiségben TMAO-t és egy ismeretlen módosulatot is kimutattam, mely utóbbi az AC és a TETRA molekulák között eluálódott a kationcserés oszlopról. (38. ábra) Általánosságban elmondható, hogy a pontyokban meghatározott arzénmódosulatok koncentrációja 5–50-szer kisebb, mint a harcsák esetében. Ez a különbség leginkább az étrendi eltérésekkel magyarázható, de ennek bizonyításához el kellett végeznem a haltáp speciációs analízisét. (20. táblázat) Mint a 20. táblázat mutatja, az afrikai harcsák táplálékában – a halakhoz hasonlóan – AB nagy arányú előfordulását (>90%) mutattam ki. Érdekes, hogy szervetlen arzént a haltápban nem, viszont a harcsa izomszövetében detektáltam.

20.táblázat Arzénmódosulatok eloszlása a vizsgálat halmintákban.

minta Mintavételi hely	haltáp	harcsa	harcsa	harcsa	harcsa	ponty	ponty	ponty	ponty
	[ng As / g]	1	2	3	4	5	6	7	8
		[µg As kg ⁻¹]							
AB	1930 ± 10	5010 ± 430	3190 ± 710	2170 ± 610	2900 ± 500	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
TMAP	7.3 ± 0.5	19.4 ± 4.6	17.5 ± 2.5	nyomokban	16.7 ± 1.5	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
TMAO	<1.7	<10	<10	<10	<10	<2.5	<2.5	<2.5	nyomokban
AC	6.1 ± 0.4	<10	<10	<10	<10	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
TETRA	15.3 ± 0.7	10.6 ± 2.1	nyomokban	nyomokban	<10	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
As(III)	24.0	28.2 ± 3.1	26.8 ± 2.4	24.1 ± 3.0	19.3 ± 3.1	0.9 ± 0.6	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	nincs adat
DMA	17.9	7.6 ± 1.7	9.6 ± 5.2	6.8 ± 1.3	4.9 ± 1.2	2.1 ± 1.7	1.3 ± 0.5	1.6 ± 0.2	10.7 ± 1.0
MA	5.0	27.0 ± 1.8	28.4 ± 3.5	29.1 ± 3.9	25.7 ± 4.0	1.0 ± 0.5	0.5 ± 0.2	1.1 ± 0.5	1.1 ± 0.5
As(V)	<1.7	nyomokban	nyomokban	10.1 ± 5.9	nyomokban	nyomokban	nyomokban	nyomokban	nyomokban
oxo-arzenocukor- foszfát	<3.3	<20	<20	<20	<20	<5	<5	<5	74.2 ± 6.3
oxo-arzenocukor- glicerol	<1.7	<10	<10	<10	<10	<2.5	<2.5	<2.5	3.8 ± 0.7 *
Ismeretlen csúcs									10.5 ± 3.2 *
Módosulatok összege/ teljes As x 100 (%)	70	101	108	97	120	2.3	4.9	4.6	29

* TETRA módosulatot használtam számszerűsítéshez.

A fentiek szerint tehát valószínűsíthető, hogy a harcsamintákban mért nagy mennyiségű AB táplálék eredetű, míg a kis mennyiségben kimutatott szerves arzén a termálvízből kerülhetett a halak szervezetébe. Bár a tápanyag összetételéről a halgazdaságoktól nem kaptam információt, feltételezem, hogy tengeri eredetű anyagról van szó, hiszen a nagy mennyiségű AB jellemző paramétere a tengeri kagylóknak, halaknak.

A pontyok specieszösszetételét tanulmányozva felmerül a kérdés, hogy vajon miért hiányzik az arzenobetain. Az a tény, hogy a tengeri halak nagy AB koncentrációjával szemben az édesvízi halak nem tartalmazzák ezt a módosulatot, sejteti, hogy talán a víz sótartalmában keresendő a válasz. Mint a jelen fejezethez tartozó bevezető részben (3.12 fejezet) említettem, ésszerű magyarázatként szolgálhat az AB glicinbetainhoz hasonló kémiai szerkezete. (19. ábra) Ezáltal az AB, melynek kémiai szerkezete nagyon hasonlít az ozmolit glicin-betainra, ahhoz hasonlóan viselkedik (a szerkezet összetéveszti a két molekulát) és a vegyület felhalmozódik a tengervízben élő halak szervezetében, míg édesvízben ez a folyamat nem indokolt. A harcsákban talált nagy mennyiségű AB viszont a táplálék összetételére vezethető vissza. Amlund és munkatársai kimutatták, hogy a táplálék eredetű AB nagyon könnyen,

nagy hatásokkal akkumulálódik mind tengeri, mind édesvízi lazacok szervezetében. (AMLUND, 2004) Munkám ezt a megállapítást alátámasztja.

A jelen fejezetben részletezett speciációs munka alapján toxikológiai következtetéseket is levonhatunk. Köztudott, hogy az AB nem toxikus arzénforma, míg a szerves arzénmódosulatok erősen toxikusak. Bár az afrikai harcsák nagy mennyiségű arzént akkumulálnak (max. 5 mg/kg), ezen mennyiség nagy része a nem toxikus AB formában van jelen. A pontyok esetében a kis mennyiségű arzénkoncentráció (ált. <0.2 mg/kg), még ha teljes egészében szerves formában is volna jelen, szintén nem jelent egészségügyi szempontból kockázatot. A 8. mintavételi helyről (kontroll) származó pontyminták esetében a nagyobb mennyiségben felhalmozott arzén (kb. 0.3 mg/kg) csak kis része található szerves formában, többnyire (a kinyert mennyiség több, mint 75%-a) arzenocukrok formájában detektálható.

A kinyerési hatások ismerete híján azonban a toxikológiai következtetések nem helytállóak. Fontos kérdés, hogy vajon a teljes arzénmennyiség milyen arányát sikerül speciációs analízissel az egyes molekulaformákhoz rendelni. Természetesen minden munka során a 100%-ra törekszünk, de ez sajnos nem mindig sikerül. Az afrikai harcsák esetében a teljesarzen-koncentráció 97–120%-át sikerült azonosítanom a speciációs analitikai módszerrel. (20. táblázat) A magas kinyerési hatások feltehetően a nagy arányú AB jelenlétével magyarázható (hasonlóan a tengeri halakhoz). Tehát elmondható, hogy a speciációs analízis komplett képet ad a halak arzénmódosulatainak eloszlásáról és az adatok segítségével toxikológiai következtetések levonhatók. Ugyanez nem igaz a pontyok esetében, ahol a felvett arzén csupán 2–29%-át sikerült számszerűsíteni az elválasztás követően. (20. táblázat)

Az édesvízi halak esetében tapasztalt alacsony extrakciós hatásokról több publikáció is említést tesz, ennek oka azonban még egyelőre ismeretlen. (SLEJKOVEC, 2004)

Fontosnak tartom kiemelni az „extrakciós hatások” fogalom gyakori félreértelmezését. A publikációk szinte mindegyikében „extrakciós hatások” alatt értik a kromatográfiás elválasztást követően detektált arzénmódosulatok összegének arányát a teljesarzen-koncentrációhoz viszonyítva. Képlet szerint:

$$\text{Extrakciós hatások (\% (irodalmi))} = 100 \times \frac{\text{detektált módosulatok koncentrációjának összege}}{\text{száraz minta teljes arzénkoncentrációja}}$$

Saját tapasztalataimból ismerem, hogy a „detektált módosulatok koncentrációjának összege” nem minden esetben egyezik meg a kinyert (azaz az extraktumban jelen levő) arzénmennyiséggel. A két érték aránya az oszlopviszanyerés, mely képlet szerint:

$$\text{Oszlopviszanyerés (\%)} = 100 \times \frac{\text{detektált módosulatok koncentrációjának összege}}{\text{az extraktum teljes arzénkoncentrációja}}$$

Ezek szerint az extrakciós hatások helyesen felírva tehát a következő:

$$\text{Extrakciós hatások (\%)} = 100 \times \frac{\text{az extraktum teljes arzénkoncentrációja}}{\text{száraz minta teljes arzénkoncentrációja}}$$

Az „az extraktum teljes arzénkoncentrációját” könnyen, roncsolásos technikával, vagy flow-injection technikával számszerűsíthetjük. (12. ábra)

Munkám során meghatároztam a kinyerési hatásfokot, amelyhez az extraktum teljes arzénkoncentrációját flow-injection technikával mértem meg. Meglepően, az eredmények azt mutatták, hogy a pontyok esetében a kinyerési hatásfok magas, 50–70%. Ez tehát arra enged következtetni, hogy a HPLC elválasztás során – hiszen ez a rendszer a flow-injection technikához képest csak az oszlop jelenlétében különbözik – némely komponens nem eluálódik az oszlopról, hanem irreverzibilisen kötődik az álló fázishoz. Kísérletemben egy alkalommal két órán keresztül figyeltem az injektálást követő detektorjelet, de hosszú retenciós idővel eluálódó arzénvegyületet nem mértem. A kérdés alapos vizsgálatára és megválaszolására jelenleg kísérletsorozatot tervezek.

5.5.5 Következtetések

Jelen munkában megállapítottam, hogy

- (i) az édesvízi halak képesek a táplálék eredetű AB bioakkumulációjára,
- (ii) az ezáltal felhalmozott arzén több, mint 90%-ban nem toxikus AB formájában jelent meg az afrikai harcsák izomszövetében,
- (iii) a pontyok arzénspeciációs mintázata kevésbé ismert, hiszen csupán a felvett arzén 2–29%-át sikerült azonosítani,
- (iv) a pontyok arzénfelhalmozása nem jelentős,

(v) a pontyminták esetében tapasztalt alacsony oszlopviszanyerés további vizsgálatokat igényel.

5.6 ARZÉNSPECIÁCIÓ ÉDESVÍZI KÖRNYEZETBEN II. – ÉDESVÍZI KAGYLÓK

Az édesvízi halak esetében tapasztalt tengeri rokonaiktól nagyban különböző specieszmintázat, valamint extrakciós tulajdonságuk alapján érdemesnek tartottam az édesvízi környezet arzénspeciációs vizsgálatainak folytatását. Ebben a fejezetben azonban nem élelmiszertoxikológiai, hanem sokkal inkább környeztkémiai szempontokat helyeztem előtérbe. A bevezető 3.13 fejezetében bemutattam, hogy az édesvízi kagylók használhatók környezetmonitorozási célokra, hiszen bizonyos szennyezők nagy mértékű akkumulációjára képesek. Ezen tulajdonságuknál fogva fontos kiemelni a táplálékláncban betöltött szerepüket, mely során a szennyezők viszonylag gyorsan átkerülhetnek a magasabb rendű élőlények szervezetébe, végül a halakat fogyasztó emberbe. Az édesvízi kagylók arzénspeciációs vizsgálata a halakéval összevetve egyszerűbb feladatnak tűnt, hiszen irodalmi adatok alapján arzénakkumulációs képességük ppm nagyságrendű (száraz anyagra számolva). Emiatt még a halakéhoz hasonló nagyon alacsony extrakciós hatások mellett is marad megbízhatóan számszerűsíthető arzénmennyiség.

Jelen fejezetben a Dunából gyűjtött kagylókon végzett speciációs analitikai vizsgálataimat mutatom be. A munkával poszterdíjat nyertem a 2004-ben Münchenben megrendezett 'Third International Conference in Trace element Speciation in Biomedical, Nutritional and Environmental Sciences' konferencián. (Poszter címe: Arsenic speciation in freshwater mussels.) A Konferenciát követően vizsgálati eredményeimet a Journal of Environmental Monitoring című tudományos folyóiratban tettem közzé, ahol mint 'hot article' azonnali publicitás díját nyerte el. (SOEROES, 2005c)

5.6.1 Mintavétel

A mintákat dr. Csányi Béla, a VITUKI (Környezetvédelmi és Vízgazdálkodási Kutató Intézet Közhasznú Társaság) munkatársa bocsájtotta rendelkezésemre 2004-ben. A VITUKI Vízhigiénés Laboratóriuma egy nemzetközi projekt kapcsán 1999-ben gyűjtötte a kagylókat a hazai Dunaág 5 pontján (22. táblázat). A fel nem használt mintákat 2004-ig mélyhűtőben tartották. A mintavétel az öt legnagyobb arányban előforduló kagylófajra terjedt ki: ezek az *Unio tumidus*, *Unio pictorum*, *Anadonta anatina*, *Sinanadonta woodiana* és *Dreissena polymorpha* voltak. (22. táblázat) A kagylókat búvárfelszerelés segítségével 0.2–2 m mélységben kézzel gyűjtötték, majd a laboratóriumba szállítást követően 24 órán belül a mélyhűtőbe kerültek. 2004-ben a mintákat a Tanszék laboratóriumába szállítottam, felengedtem, az egyes példányok hosszát külön-külön megmértem, majd a puhatestet a héjtól elkülönítettem, ioncserélt vízzel alaposan átöblítettem. A kagylófajokat, illetve

mintavételi helyüket tekintve 11 csoportot alakítottam ki. (22. táblázat) A mintákat liofilizáltattam, majd laboratóriumi dörzsmozsárban kézzel porítottam és homogenizáltam.

5.6.2 Mintaelőkészítés

A teljesarzen-koncentráció meghatározásához az „Anyagok és módszerek” fejezetben részletezett nedves roncsolásos technikát alkalmaztam Milestone ultraCLAVE mikrohullámú roncsolóberendezés segítségével.

Arzénspeciációs elemzéshez a 5.5.2 fejezetben részletezett metanolos extrakciót alkalmaztam. A bemérés kb. 200 mg volt, a bepárlást követően pedig a mintákat 5-5 ml ioncserélt vízben oldottam vissza.

5.6.3 Anyagok és módszerek

A munka során az „Anyagok és módszerek” fejezetben felsorolt reagenseket és műszereket használtam. A teljes arzén meghatározásához Agilent 7500c ICP-MS készüléket, az arzénspeciációhoz Hamilton PRP-X-100 anioncserélő és Zorbax 300-SCX kationcserélő oszlopokat használtam a 10. táblázat szerint.

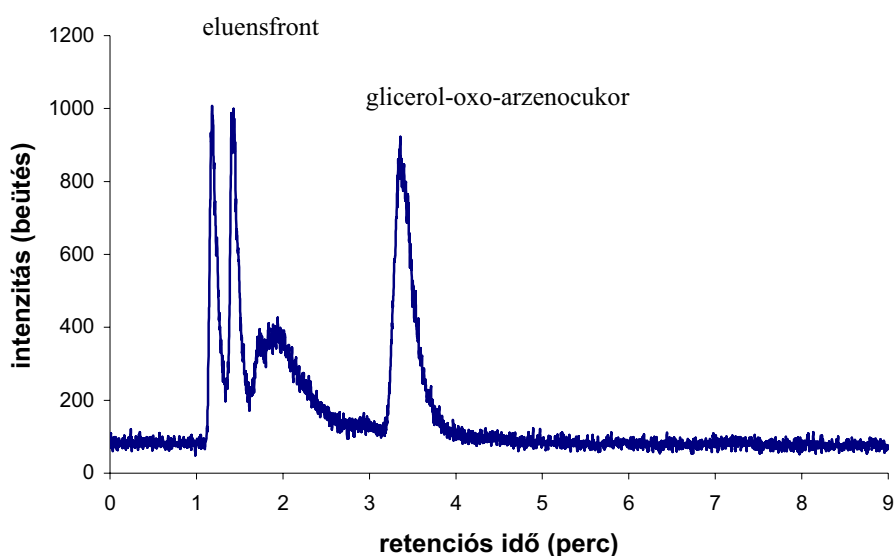
5.6.4 Eredmények

5.6.4.1 Az édesvízi kagylók teljes arzénkoncentrációja

A Dunából gyűjtött kagylóminták teljes arzénkoncentrációját az 22. táblázatban mutatom be. Látható, hogy az értékek 3.8–12.8 mg As/kg tartományba esnek, mely jól összevethető Koch *et al.* által vizsgált *Margaritifera sp.* (3.1 mg As/kg) és *Anadonta sp.* (6.7 mg As/kg) kagylóival, annak ellenére, hogy a szerző a mintáit arzénnel szennyezett kanadai folyókból gyűjtötte. (KOCH, 2001) A Duna-víz arzénkoncentrációja jelenleg alacsony (1.1 ng/ml, SCHAEFFER, 2005), és nem valószínű hogy öt évvel korábban szignifikánsan magasabb lett volna. A „Mussel Watch Project” jelentése szerint – mely keretében az Egyesült Államok különböző részéről gyűjtött tengeri kagylók arzénakkumulációját vizsgálták – a tengeri kagylók 11.1 ± 3.4 mg/kg arzént tartalmaznak. (O’CONNOR, 2002) Az adatok szerint tehát nincs szignifikáns különbség a tengerből és az édesvízből gyűjtött kagylók arzénfelhalmozási képessége között. Ez a megállapítás más édesvízi szervezetek esetében nem állja meg a helyét (pl. halak, algák), melyekben néha a tengeri rokonaikhoz képest több százszor kisebb arzénkoncentráció mérhető.

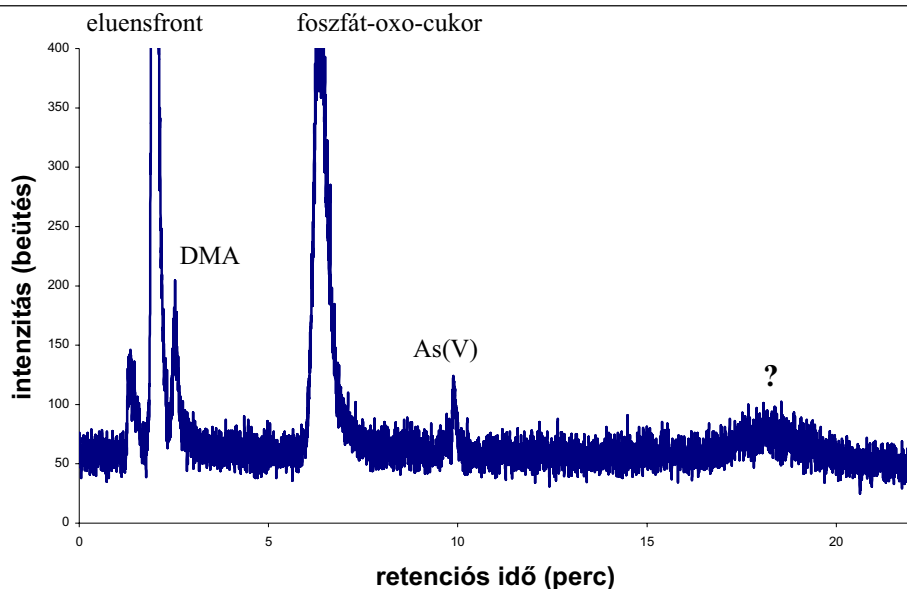
5.6.4.2 *Az édesvízi kagylók arzénspeciációs elemzése*

A minták arzénmódosulatainak vizsgálatára anion- és kationcserés kromatográfiai módszereket használtam. Kationcsere segítségével AB, glicerol-oxo-arzenocukor, TMAO, AC, TMAP és TETRA módosulatok elválasztása és mennyiségi meghatározása lehetséges, mint ahogy azt a 10. táblázatban bemutattam. A Dunaföldváron gyűjtött *Unio pictorum* kationcserés kromatogramját az 39. ábra szemlélteti. Látható, hogy az eluensfront két keskenyebb és egy szélesebb csúcsra különül, egyetlen visszatartással rendelkező komponensként a oxo-glicerol-arzenocukrot detektáltam. (Hasonló kromatogramot kaptam a többi minta esetében is, azzal a különbséggel, hogy három esetben 3.1 perc retenciós időnél nyomnyi mennyiségű AB volt kimutatható.) A rendelkezésemre álló arzenokomponensekkel standard addíciót végeztem, így kiderült, hogy az összes anionos komponens az eluensfronttal hagyja el az oszlopot.



39.ábra Dunaföldváron gyűjtött *Unio pictorum* kationcserés kromatogramja (kromatográfiai oszlop: Zorbax 300 SCX, eluens: 20 mM piridin-formiát, pH=2.6)

Anioncserés kromatográfia segítségével As(III), As(V), DMA, MA, oxo-foszfát-arzenocukor, oxo-szulfonát-arzenocukor, valamint oxo-szulfát-arzenocukor vegyületek elválasztása és számszerűsítése lehetséges. (24. ábra) A kagylóextraktumokban csupán három, nevezetesen a DMA, a oxo-foszfát-arzenocukor és az As(V) jelenlétét mutattam ki. A 40. ábrán egy minta anioncserés kromatogramja látható.



40.ábra Dunaföldváron gyűjtött *Unio pictorum* anioncserés kromatogramja (kromatográfiai oszlop: PRP-X100, eluens: 20 mM $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$, pH=5.6)

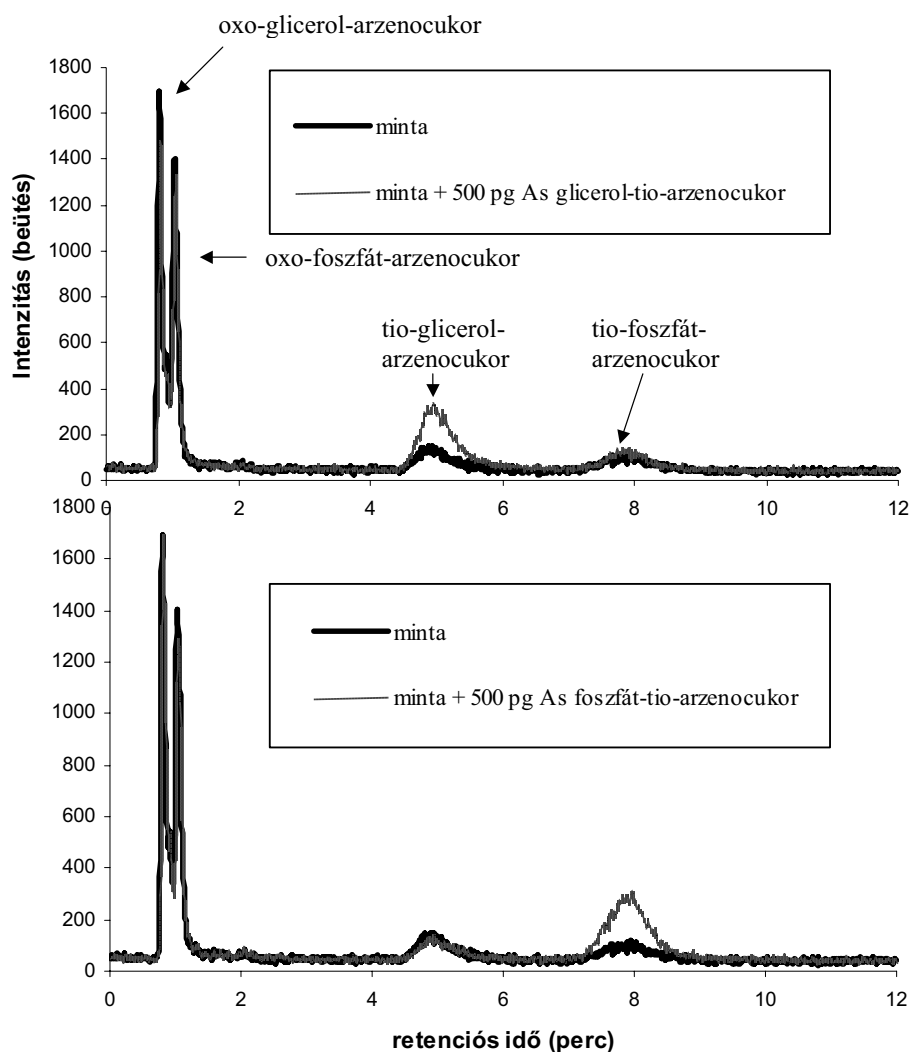
Látható, hogy 18.1 perc retenciós idővel egy erősen visszatartott ismeretlen komponens hagyja el az oszlopot (a 40. ábrán kérdőjellel jelölve). A komponens retenciós viselkedése hasonlóságot mutatott a nemrégiben, közreműködéssel felfedezett tio-arsenocukor molekulával, melyet egy tengeri kagylóból készült konzerv levéből sikerült kimutatni (SCHMEISSER, 2004). A feltételezés bizonyítása érdekében egy új kromatográfiai módszert alkalmaztunk, melyet korábban a grazi kutatócsoport a tio-arsenocukor komponensek meghatározására fejlesztett ki. A módszer paramétereit a 21. táblázat tartalmazza. Az elválasztás tulajdonképpen a pH-ban különbözik az eddigiekben általam használt anioncserés kromatográfiai rendszertől. Az ionerősség beállítására használt NH_4HCO_3 puffer működési pH-tartománya ($9 < \text{pH} < 11$) mellett azért is előnyös, mert illékonyága miatt összeférhető a szerkezetazonosításra alkalmas szerves tömegspektrométerrel. Ezt a módszert alkalmaztam – kiegészítésként az eddigiek mellett – a kagylóextraktumok tio-arsenocukor módosulatainak speciációs vizsgálatára.

21.táblázat A tio-arsenkomponensek azonosítására és számszerűsítésére alkalmazott kromatográfiai paraméterek

Kromatográfiai oszlop	Hamilton PRP-X-100
Mozgó fázis	20 mM NH_4HCO_3
pH	10.3 (25% NH_3 -val)
Injektálási térfogat	20 μl
Áramlási sebesség	1.5 ml/perc
A módszerrel számszerűsíthető arzenmódosulatok	As(V), tio-glicerol- arsenocukor, f tio-foszfát- arsenocukor

Mint a 41. ábrán látható, As(V) mellett két kezdetben ismeretlen csúcs jelent meg a kromatogramon 5.1 és 7.9 perces retenciós időkkel. A feltételezésünk további igazolása érdekében szintetikus tio-arzenocukor komponenseket (glicerol-, foszfát-, szulfonát-, szulfát-arzenocukor) állítottunk elő. A szintézis nagyon egyszerűen kivitelezhető: a megfelelő oxo-cukor oldaton H_2S gáz átbuborékolásával. Ezt követően a kagyló extraktumokat a tio-arzenocukor standard oldatokkal addicionáltam. A standard addíció eredményeképpen egyértelműen bizonyítást nyert, hogy a két komponens a glicerol-, valamint a foszfát-arzenocukrok tio-analógjai. (41. ábra) A kagylókban az előzőekben meghatározott oxo-glicerol-arzenocukor, oxo-foszfát-arzenocukor és DMA módosulatok – mint az ábrán is látható – nem jól elkülönülve a kromatogram elején hagyják el az oszlopot. A módszerrel azt is sikerült igazolni, hogy a 40. ábrán látható későn eluálódó csúcs a tio-glicerol-arzenocukorhoz rendelhető.

Az arzenocukrok tio-analógjainak retenciós viselkedése szokatlan. Bár az arzenocukrok pK_a értékei nem ismertek, mégis az oxigén (EN= 3.5) és a kén (EN= 2.4) elektronegativitásának különbségéből kiindulva feltételezhető, hogy a tio-arzenocukor molekulák pK_a értékei kisebbek az oxo-analógokétól. Ezek alapján tehát logikus, hogy a kéntartalmú vegyület lúgos pH-n kevésbé anionos, azaz kevésbé kötődik az álló fázishoz, mint az oxo-vegyület. Mindezek ellenére a 40. ábrán látható oxo- és tio-arzenocukor esetében tapasztalt retenciós idő különbség magyarázatához ez a logika kevés. Másfelől, azt is feltételezem, hogy a különböző arzenocukor komponensek visszatartásában nem csupán az oxigén/kén protonáltsági állapota játszik szerepet – hiszen nézzük meg a 24. ábrát (5.1.2 fejezet), izokratikus körülmények (pH = 5.6) mellett a négy arzenocukor kiválóan elválasztható az anioncserés oszlopon.



41. ábra A Dunaföldváron gyűjtött *Unio pictorum* 21. táblázatban részletezett kromatográfiai paraméterek mellett rögzített kromatogramja. (Kromatográfiai oszlop: PRP-X100, eluens: 20 mM NH_4HCO_3 , pH=10.3)

Ezek szerint az oldalláncnak nagy szerepet tulajdoníthatunk a komponensek elúciós sorrendjében. Az arsenocukrok oxo- és tio-analógjainak oldallánca azonban azonos, ezáltal ez sem magyarázhatja az ilyen mértékű visszatartási különbségeket. Marad az a feltételezés, hogy az állófázis esetlegesen olyan elemeket/ionokat/vegyületeket tartalmaz szennyezőként, melyek nagy affinitással kötik a ként, ezáltal a kéntartalmú molekula csak lassan képes az állófázis elhagyására. Ilyen szennyezések lehetnek például a fémek. A kérdés tisztázásához további vizsgálatok szükségesek.

A 22. táblázatban mutatom be a kagyló extraktumokban azonosított és számszerűsített arzénmódosulatokat.

22. táblázat A vizsgált kagylók mérete, teljes arzén koncentrációja és az extraktumokban meghatározott arzénmódosulatainak eloszlása

Kagyló faj	Mintavételi hely	Átlagos hossz [cm] (RSD%) n= ismétlések	Teljes As koncentráció [µg As kg ⁻¹ száraz anyag]**	AB ^a	DMA ^b	As(V) ^c	oxo-gycerol- arzenocukor ^a	oxo-foszfát- arzenocukor ^b	tio-glicerol- arzenocukor ^c	tio-foszfát- arzenocukor ^c	Módosulatok összege (teljes As %-os arányában)
<i>Anadonta anatina</i>	Dunafajsز	8.3 (26) n=3	5180	16.3 (2.1)	41.4 (5.2)	28.1 (3.6)	248 (31.3)	216 (27.3)	99.4 (12.6)	142 (17.9)	791 (15)
<i>Anadonta anatina</i>	Dunamedve	7.9 (6) n=4	4150	<d.l.	39.0 (5.8)	25.9 (3.8)	145 (21.5)	210 (31.2)	107 (15.9)	147 (21.8)	674 (16)
<i>Anadonta anatina</i>	Vág	7.2 (20) n=4	4680	46.1 (4.4)	35.4 (3.4)	44.3 (4.2)	353 (33.6)	273 (26.0)	142 (13.5)	158 (15.0)	1052 (22)
<i>Dreissena polymorpha</i>	Dunafajsز	<0.8 n=25	4500	<d.l.	39.6 (6.0)	69.3 (10.6)	194 (29.6)	182 (27.8)	79.9 (12.2)	89.8 (13.7)	655 (15)
<i>Sinanadonta woodiana</i>	Dunaföldvár	9.9 (19) n=4	5140	<d.l.	96.6 (10.8)	11.3 (1.3)	192 (21.5)	404 (45.1)	58.1 (6.5)	133 (14.9)	895 (17)
<i>Sinanadonta woodiana</i>	Dunafajsز	14.0 n=1	3800	<d.l.	41.1 (10.1)	ny	72.5 (17.9)	180 (44.4)	25.0 (6.2)	86.9 (21.4)	406 (11)
<i>Unio pictorum</i>	Dunafajsز	9.0 (20) n=3	6850	ny	52.7 (4.8)	18.5 (1.7)	356 (32.4)	397 (36.1)	100 (9.1)	176 (16.0)	1100 (16)
<i>Unio pictorum</i>	Dunaföldvár	10.4 (10) n=3	12770	<d.l.	93.2 (5.5)	ny	678 (39.8)	503 (29.5)	195 (11.4)	235 (13.8)	1704 (13)
<i>Unio pictorum</i>	Vác	10.3 (12) n=3	8860	<d.l.	92.1 (5.2)	15.6 (0.9)	701 (39.5)	614 (34.6)	179 (10.1)	171 (9.6)	1773 (10)
<i>Unio tumidus</i>	Vác	9.2 (12) n=3	6530	<d.l.	52.5 (6.2)	ny	329 (39.0)	284 (33.7)	91.7 (10.9)	85.5 (10.1)	843 (13)
<i>Unio tumidus</i>	Vág	8.6 (14) n=3	5960	<d.l.	56.1 (5.7)	15.9 (1.6)	323 (32.6)	247 (24.9)	153 (15.4)	196 (19.8)	991 (17)

^a alkalmazott állófázis: ZORBAX 300-SCX oszlop (pH 2.6)^b alkalmazott állófázis: HAMILTON PRP-X100 oszlop (pH 5.6)^c alkalmazott állófázis: HAMILTON PRP-X100 oszlop (pH 10.3)

* As(V) kalibrációs görbéjével kvantifikálva

** három párhuzamos minta eredménye (RSD ≤8.5%, átlagos RSD 3.8%)

d.l.: kimutatási határ (10 µg As kg⁻¹)

ny: nyomokban

Fontos megjegyezni, hogy a detektált arzénmódosulatok összege csupán 10–22%-a a kagylókban mért teljes arzén koncentrációnak, ami nagyon alacsony érték. (22. táblázat) A jövőben tervezem a teljes anyagmérleg elkészítését, illetve az alacsony azonosítási hatások okainak részletes feltérképezését. A táblázatból kiderül, hogy a különböző helyen gyűjtött és a különböző fajba tartozó kagylók speciesmintázata között nincs számottevő különbség: a mintákban az As(V) mellett hat szerves arzénvegyületet detektáltam (AB, DMA, oxo-glicerol-, és oxo-foszfát-arzenocukor, valamint tio-glicerol-, és tio-foszfát-arzenocukor). A kagylókban talált arzénmódosulatok jelenléte három szempontból tekinthető érdekesnek.

Elsőként, a főleg AB-t tartalmazó tengeri kagylókhoz képest az általam vizsgált kagylók AB-t nem vagy csak nyomokban tartalmaznak (egyik esetben sem nagyobb mennyiségben, mint a módosulatok összegének 4.4%-a). Eredményemmel szemben Slejkovec és munkatársai *Dreissena polymorpha* kagylóban AB domináns jelenlétét tapasztalták. (SLEJKOVEC, 1996b) Másfelől, eredményeimmel összehangban Koch *et al.* szintén csak nyomokban talált AB-t *Margaritifera* fajokban, míg *Anadonta* fajokban a módosulatot nem detektálta. (KOCH, 2001)

A második érdekesség, hogy az oxo-glicerol-cukor és az oxo-foszfát-cukor vegyületek a legnagyobb mennyiségben azonosított arzénkomponensek. Erre a kísérlet tervezésekor egyáltalán nem számítottam. A komponensek egyenként átlagosan 30-30%-át alkották az oszlopról eluálódó arzénmódosulatok összegének. Tengeri kagylók esetében az oxo-arzenocukrok nem jellemző komponensek, bár például nyomnyi mennyiségben jelen voltak *Mytilus edulis* kagylókban. (DAGNAC, 1999) Furcsa módon Larsen *et al.* arra a következtetésre jutott, hogy az oxo-arzenocukrok akár domináns módosulatként is előfordulhatnak tengeri kagylókban, ha azok 3500m mélyen, tengeri melegvizes források közelében élnek. (LARSEN, 1997) A mért adataim jól alátámasztják Koch *et al.* eredményeit, aki szintén oxo-arzenocukor módosulatokat talált édesvízi kagylómintáiban hasonló arányban. (KOCH, 2001)

A harmadik érdekes megállapítás a két azonosított tio-arzenocukor molekulával kapcsolatos. Ezeket a komponenseket elsőként csupán 2004-ben sikerült kimutatni tengeri kagylók extraktumában. (SCHMEISSER, 2004, FRICKE, 2004) Jelen kísérletben a kagylók extraktumában talált tio-arzénmódosulatok nem elhanyagolható mértékben voltak jelen: az oszlopot elhagyó arzénmennyiség 6-16%-a tio-glicerol-arzenocukor, 10-22%-a tio-foszfát-arzenocukor. Furcsa, hogy az ilyen mennyiségben jelen levő módosulatok jelenlétére eddig édesvízi kagylókban még nem derült fény. Ennek oka feltételezhetően a komponensek erős kötődése az álló fázishoz – a leggyakrabban használt kromatográfiás technikák mellett. Az irodalomban ismertett instabilitás talán a másik magyarázat a

tio-arzenocukrok „elrejtőzésének”. Jelen munkában elsőként jelentjük ezen módosulatok előfordulását édesvízi eredetű mintákban.

A módosulatok eredete jelenleg még nem ismert, és mára már bebizonyosodott, hogy jelenlétük nem köthető a hosszú tárolási körülményekhez (1999-től 2004-ig), hiszen munkatársam, Schäffer Richárd ugyanilyen összetételű módosulatmintázatot talált frissen gyűjtött dunai kagylókban (SCHAEFFER, 2005)

Eredményeim szerint tehát a tio-módosulatok előfordulását és környezeti szerepét mindeztáig alábecsültük. A jövőben új mintaelőkészítési valamint kromatográfias szemléletre van szükség a tio-módosulatok meghatározása érdekében.

5.6.4.3 *Környezeti hatások*

A kagylókban talált arzénmódosulatok szerves részei az édesvízi biológiai rendszernek. A tápláléklánc által a módosulatok átkerülhetnek magasabb rendű élőlényekbe (végül az emberbe), az idős kagylók pusztulása során pedig az üledék alkotórészévé válnak. A kis mennyiségben detektált AB egyértelműen utal arra, hogy az arzén biokémiai körforgása édesvízi környezetben nagyban eltér a tengeri környezethez képest annak ellenére, hogy a kagylók táplálkozása a két esetben hasonló.

Másik fontos különbség, hogy a kagylókban található arzén csak kis részét (10–22%) sikerült az általam fejlesztett speciációs módszerrel meghatároznom, nagyobb részben a módosulatok kémiája nem ismert. Tengeri kagylók esetében általában a módosulatok >90%-a meghatározásra kerül. Ez azért is érdekes, mert a kagylómátrix a két esetben hasonló (fehérjetartalom, zsírtartalom). A jelenség oka egyelőre még tisztázatlan, de feltételezhetően az eltérő biokémiai folyamatokban keresendő. A nem meghatározott arzénformák mátrixhoz kötődése erősebb, ezáltal a konvencionális extrakciós technikákkal nem nyerhetők ki. Az azonban bizonyos, hogy a ki nem nyert arzén nem AB, hiszen ez a módosulat vízben jól oldódik és könnyen extrahálható. Toxikológiai következtetéseket az alacsony azonosítási arány miatt nem vonhatok le, ez a jövőbeli feladatok egyike.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Arzénspeciációs kromatográfias módszereket fejlesztettem arzénmódosulatok szelektív meghatározására. A módszerek segítségével As(III), As(V), DMA, MA, oxo-glicerol-, oxo-foszfát-, oxo-szulfonát-, oxo-szulfát-, tio-glicerol-, tio-foszfát-arsenocukrok, TMAP, AB, TMAO, AC, TETRA módosulatok elválasztása és számszerűsítése lehetséges.

Megállapítottam, hogy HPLC-HG-AFS csatolt műszeregyüttes alkalmazása esetén NH_4 -ion alkalmazása ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ formában) a mozgó fázisban előnyösebb, mint a Na vagy a K ionoké (NaH_2PO_4 és KH_2PO_4 formában), mert jobb jel/zaj arányt biztosít, mint az utóbbiak.

2. Arzénspeciációs elemzést végeztem 15 dél-alföldi kútból gyűjtött ivóvízmintákon. Megállapítottam, hogy minden minta esetében a teljes arzénkoncentráció szignifikánsan nagyobbak bizonyult, mint a jelenlegi magyar határérték (10 ng As /ml). Meghatároztam a vízmintákban található As(III)/As(V) módosulatok arányát, mely hasznos lehet a későbbi kutatások számára a vizek redoxiállapotának jellemzésére mint geokémiai indikátor, és fontos adat az eltérő adszorpciós képesség miatt az arzénmentesítési technológiák számára. Bizonyítottam, hogy a specieszek arányának megőrzése érdekében az analízist a mintavételt követően egy napon belül el kell végezni, a mintákat az analízisig sötét helyen, +4 °C kell tárolni.
3. Kimutattam, hogy a Szardínia sziget körül és a Velencei öbölben gyűjtött kagylóminták 7.5-30 mg/kg mennyiségben tartalmaznak arzént, de a felhalmozott módosulatok több, mint 90%-a AB, mely nem toxikus arzénvegyület. Megállapítottam, hogy a nagyobb mennyiségben felvett arzén nem jelenti a nagyobb toxicitású anionos módosulatok felhalmozódását. Ezzel szemben nagyobb arzénakkumuláció esetében nagyobb mennyiségű nem toxikus AB-t detektáltam.
4. Megállapítottam, hogy a vadon élő özlábgomba (*Amanita muscaria*) arzénspeciációs vizsgálatához alkalmazott tízféle extrakciós módszer hatásfoka között négy esetben szignifikáns különbség nincs, a célra leginkább a vizes extrakciós technika – viszonylagos egyszerűsége miatt – javasolt. Bizonyítottam, hogy a termesztett csiperke (*Agaricus bisporus*) az arsenáttal dúsított komposztból képes arzént felvenni, de azt a továbbiakban átalakítás nélkül, szervesetlen arzénmódosulat formájában raktározza.

5. Megállapítottam, hogy bár a természetes vizű hazai halastavakban a tengerrel azonos nagyságrendű arzénmennyiség detektálható (1–2 ng/ml), a tavakban gyűjtött pontyminták teljesarzén-koncentrációja a tengeri halakkal ellentétben két nagyságrenddel kisebb. Speciációs vizsgálatok során a halakban <11 µg/kg mennyiségben azonosítottam szerves, mono- és dimetilált arzénmódosulatokat. Bizonyítottam, hogy az afrikai harcsa tenyésztésére használt hazai termálvizek a dél-alföldi régióban geokémiai eredetű arzénnel erősen szennyezettek. A termálvizekben tenyésztett harcsák nagy koncentrációban tartalmaztak arzént (2510–4720 µg/kg), de ezen arzénmennyiség 96%-ban arsenobetain. Kimutattam, hogy a harcsákban talált nagy mennyiségű arsenobetain az etetésre használt tápból ered.

6. Megállapítottam, hogy a dunai kagylóminták a tengeri kagylókkal azonos mértékben képesek arzént akkumulálni. Ezen édesvízi minták a tengeri kagylókkal ellentétben arsenobetaint nem vagy csak nagyon kis mennyiségben tartalmaznak, a domináns arzénmódosulatok az arsenocukrok. Új, eddig még csak tengeri szervezetekben detektált tio-arzén – tio-glicerol- és tio-foszfát-arsenocukor – módosulatokat mutattam ki a vizsgált édesvízi eredetű kagylókban.

7. Bemutattam a mérés minőségbiztosításának (belső standard alkalmazása, CRM-ek, külső-belső kalibrációk, anyagmérleg készítése, 'sodródás' nyomonkövetése) fontosságát a speciációs analitika területén. Megállapítottam, hogy a munkám során erre a célra használt technikák alkalmasak a gyakorlati arzénspeciáció minőségének biztosítására.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Célkitűzéseimben megfogalmazott tevékenységi területem alapvetően két részre tagolható: munkám első felében arzénspeciációs elválasztástechnikai módszert fejlesztettem ki a leggyakrabban vizsgált módosulatok meghatározására, második felében pedig ezeket a módszereket alkalmaztam környezeti minták elemzéséhez.

A módszerek többfélék, hiszen a rendelkezésemre álló technikai lehetőségek köre az idővel bővült, ezáltal egyre több vegyület meghatározása vált lehetővé. A módosulatok elválasztására ionpárképzéses, valamint ioncserés kromatográfiás rendszereket, detektálásukra pedig induktívan-csatolt-plazma tömegspektrométert és atomfluoreszcens technikát használtam.

A dél-alföldi arzénszennyezett kutakból gyűjtött ivóvízminták esetében a jelenlegi határértéket szignifikánsan meghaladó arzénkoncentrációt tapasztaltam, mely döntően arzenit formában volt jelen. Meghatároztam azt a tárolási körülményt is, mely nem befolyásolja szignifikánsan a mintákban eredetileg jelen levő arzenit/arzenát arányt.

A tengeri kagylók arzénfelhalmozása *ppm* nagyságrendű, mely mennyiség több, mint 90%-a nem toxikus arzenobetain formájában van jelen – függetlenül a felhalmozódás mértékétől. Ezzel szemben a Dunából gyűjtött édesvízi kagylók hasonló arzénakkumuláció mellett arzenobetaint csak nyomokban, nagyobb arányban arzenocukrokat tartalmaztak. A megállapítás háttérében az édesvízi környezetben lejátszódó eltérő biokémiai folyamatok állhatnak.

Hasonlóan, az édesvízi halak specieszmintázata nagyban eltér tengeri rokonaikétól. Bár a felszíni vizek arzénterhelése a tengeréhez nagyon hasonló, a pontyok arzénakkumulációja messze alulmarad a tengeri halakéhoz képest. A régióban tenyésztett afrikai harcsák erősen arzénszennyezett termálvízben nevelkednek, ennek ellenére a *ppm* nagyságrendben felhalmozott arzén nem a vízből, hanem döntően a táplálékból ered, miáltal arzenobetain formájában jelenik meg a mintákban.

Kalapos gombák esetében összehasonlítottam néhány gyakran alkalmazott arzén-kinyerési technikát, mely során négy esetben szignifikáns különbséget nem találtam. A mesterségesen arzenáttal szennyezett közegen nevelt csiperkegomba jelentős mennyiségű arzénakkumulációt mutatott, de a módosulateloszlás ismeretében megállapítható, hogy a gombák termesztési ciklusa alatt nem ment végbe jelentős arzénmetabolizáció.

Munkám során a speciációs módszerek minőségének biztosítását korszerű analitikai technikákkal valósítottam meg.

8. SUMMARY

My scientific activity carried out in the frame of PhD studied and includes two main parts: in the first section of the work separation methods were developed for the determination of the most popular arsenic molecules, in the second section these methods were applied for environmental samples.

The methods are diverse, as the available technical possibilities were expanded by time, together with the expanding number of determinable arsenic compounds. For separation of the species ion-pairing as well as ion-exchange methods with different detection techniques including inductively coupled plasma mass spectrometry and atomic fluorescence spectroscopy were used.

In the drinking water samples collected from arsenic-polluted area of Hungary higher arsenic concentration was measured than the presently valid threshold limit, and arsenic was present dominantly in the form of arsenite. The optimum samples-storage condition preserving the original arsenit/arsenate ratio of the samples was also determined.

Marine mussels can accumulate arsenic in the ppm range dominantly in the form of non-toxic arzenobetaine (AB). The species distribution pattern if these samples is general, irrespectively of the accumulated arsenic amount. On the other hand the mussels collected from the Danube show very different speciation distribution: AB was present only in trace, while the arsenosugars were the dominant species in the samples. The dissimilar biochemical processes present in the freshwater ecosystem can be the possible explanation to the results.

Likewise, the species distribution measured in the freshwater fish samples is very different compared to the marine fish. While the arsenic pollution of surface freshwater and the seawater are similar, arsenic accumulation of the carps is much lower than those in the marine fish. African catfish collected from fish farms of the southeast region are living in highly arsenic-polluted thermal water and could accumulate arsenic in *ppm* level. However, it was proven that the arsenic is originated from the fishfood – and not from the water – as it is present in the form of AB.

Between the four methods applied for arsenic extraction from mushroom samples no significantly difference were found. Champignons grown on artificial arsenate polluted medium accumulated high amount of arsenic, but based on the species distribution no metabolism has occurred during the growing cycle of the mushroom.

The quality assurance of all the speciation methods was solved by the use of modern analytical techniques during the work.

9. MELLÉKLETEK

9.1 1. Melléklet

Irodalmi adatok a tengeri élőlényekben meghatározott teljes arzén, valamint arzénmódsulatok mennyiségéről

Faj	Teljes As	AB	AC	TETRA	TMAO	DMA	MA	As(III)	As(V)	arzenocukrok	ismeretlen	Irodalom
Halak												
<i>Pleuronectes platessa</i>	41.9 sz	major	nyomokban	nyomokban	nyomokban	n. d.	n. d.	n.a.	n.d.	n.a.	nyomnyi	Larsen 1993a
<i>Kyphosus sydneyanus</i>	1 n	n. d.	n.d.	minor	major	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	minor	n.d.	Edmonds1997
<i>Cnidogobius macrocephalus</i>	~0.5 n	Major	n.a.	n.a.	szig	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Edmonds 1987
<i>Solea solea</i>	24.8 sz	Major	n.d.	n.a.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.d.	Alberti 1995
<i>Abudefduf vaigiensis</i>	n. a.	Major	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	minor	
<i>Mugil cephalus</i>	4.7 sz.	Major	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	Maier 1999
Héjasok												
<i>Pamulirus</i>	n.a.	Major	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	minor	nyomokban	Edmonds 1992
<i>Cygnus (homár)</i>												
<i>Rimicaris exoculata</i> (rák)	21.8 sz	Major	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.d.	minor	nyomokban	n.a.	n.d.	Larsen 1997
<i>Cancer pagurus</i> (rák)	118 sz	Major	n.d.	nyomokban	nyomokban	n.a.	n.d.	nyomokban	nyomokban	n.a.	nyomokban	Larsen 1993a
<i>Crangon crangon</i> (rák)	9.2 sz	Major	n.d.	nyomokban	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	nyomokban	minor	Francesconi 1999b
Kagylók												
<i>Tridacna maxima</i>	200 n	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	major	nyomokban	Edmonds 1982 Francesconi 92
<i>Meretrix lusoria</i>	3.6 n	major	n.d.	szig	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	szig	Shiomi1987
<i>Placopecten magellanicus</i>	3.9-7.2 sz	major	n.d.	szig	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Lai 1999
<i>Chlamis islandica</i>	2.3-2.4 sz	major	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	szig	Lai 1999
<i>Mytilus edulis</i>	8.5 sz	major	n.d.	n.a.	n.a.	szig	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	minor	Alberti 1995
<i>Haliotis roei</i>	1.0 n	major	n.d.	minor	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	minor	n.d.	Edmonds 1997
<i>Tectus pyramis</i>	4.2 n	major	n.d.	minor	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	sig	Francesconi 1988
<i>Morula musiva</i>	112-339 sz	major	minor	nyomokban	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	nyomokban	nyomokban	Francesconi 1998

sz: szárazanyag, n: nedves anyag,

major: domináns arzénkomponens, mely >50%-ban alkotója a kinyert arzénmennyiségnek,

szig: szignifikáns mennyiségben előforduló arzénkomponens, mely 10<50%-ban alkotója a kinyert arzénmennyiségnek,

minor: kis mennyiségben jelen levő arzénkomponens, mely <10%-ban alkotója a kinyert arzénmennyiségnek,

nyomokban: <1%-ban alkotója a kinyert arzénmennyiségnek,

n.a.: nincs adat, n.d.: nem detektált

9.2 2. Melléklet

Irodalmi összefoglalás a „Az édesvízi halak arzénspeciációs elemzése” témában megjelent publikációkról

Irodalom	Vizsgált halfaj	Teljes As koncentráció	Kinyerés hatásfoka	Az extraktumban talált domináns arzénmódosulatok	Megjegyzés
Das, 2004	<i>Ophicephalus punctatus</i>	20–40 ng As/g sz. a.	nincs adat	nincs adat	A mintákat arzén-szennyezett vízből gyűjtötték.
Zheng, 2004	<i>Esox lucius</i> <i>Micropterus salmoides</i> <i>Perca flavescens</i> <i>Lepomis gibbosus</i>	410 ng As/g n. a. 200 ng As/g n. a. 90 ng As/g n. a. 390 ng As/g n. a.	70.5±8.1% 88.7±7.6% 77.8± 7.2% 66.8± 5.9%	DMA, AB, TETRA, As(III) As(III), TETRA, AB, ismeretlen As(III), As(V) As(III), As(V), TETRA	A mintákat arzén-szennyezett vízből gyűjtötték.
Slejkovec, 1996	<i>Abramis brama</i>	667± 8 ng As/g sz. a.	45%	Szervetlen As, DMA, AB/TMAO	
Kaise, 1997	<i>Plecoglossus altivelis</i> <i>Oncorhynchus masou masou</i> <i>Rhinogobius sp.</i> <i>Phoxinus steindachneri</i> <i>Tribolodon hakonensis</i> <i>Sicyopterus japonicus</i>	51 ng As/g n. a. 146 ng As/g n. a. 333 ng As/g n. a. 267 ng As/g n. a. 100 ng As/g n. a. 370 ng As/g n. a.	nincs adat nincs adat nincs adat nincs adat nincs adat nincs adat	trimetilált As di- és trimetilált As trimetilált As trimetilált As dimetilált As trimetilált As	A mintákat arzénnel szennyezett folyóból gyűjtötték.
Slejkovec, 2004	<i>Silurus glanis</i> <i>Lota lota</i> <i>Barbus barbus</i> <i>Rutilus pigus virgo</i> <i>Chondrostoma nasus</i> <i>Salmo marmoratus</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Salmo trutta</i>	806 ng As/g n. a. 97 ng As/g n. a. 93 ng As/g n. a. 105 ng As/g n. a. 161 ng As/g n. a. 866 ng As/g n. a. 340 ng As/g n. a. 503 ng As/g n. a.	0.4% 77.2% 18.5% 31.0% 5.7% 90.4% 77.2% 64.5%	AB DMA AB AB DMA AB AB AB	
Huang, 2003	<i>Oreochromis mossambicus</i>	184-3291 ng As/g sz. a.	nincs adat	AB és DMA	Feketeláb-betegség endémiás területen tenyésztett halakat vizsgáltak.
Koch, 2001	<i>Caregonus lavaretus</i> <i>Catostomus commersonii</i> <i>Stizostedion vitreum</i> <i>Esox lucius</i>	1400 ng As/g sz. a. 980 ng As/g sz. a. 655 ng As/g sz. a. 1350 ng As/g sz. a.	34% 65% 26% 72%	AB, ismeretlen AB, arzenocukor AB DMA, AB	

n. a.: nedves anyagra vonatkoztatva
sz. a. : száraz anyagra vonatkoztatva

10. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÁS

- ABBAS M. N. D. (2003): Solid phase spectrophotometric determination of traces of arsenate and phosphate in water using polyurethane foam sorbent. *Anal. Lett.*, 36, 1231–1244.p.
- AHMANN D., ROBERTS A.L., KRUMHOLZ L.R., MOREL F.M., (1994): Microbe grows by reducing arsenic (letter). *Nature*, 371, 750. p.
- ALBERTI J., RUBIO R., RAURET G. (1995): Extraction method for arsenic speciation in marine organisms. *Fresenius J Anal Chem*, 351, 420-425.p.
- AMADORI S., FENAUX P., LUDWIG H., O'DWYER M., SANZ M. (2005): Use of arsenic trioxide in haematological malignancies: insight into the clinical development of a novel agent. *Current Medical Research and Opinion*, 21 (3) 403-411.p.
- AMLUND H., BERNTSSON M. H. G. (2004): Arsenobetaine in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*): Influence of seawater adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.*, C 138, 507-514.p.
- BARTHA A., CSALAGOVITS I., HORVÁTH I., SIEWERS U., STUMMEYER J. (1999): A Békésmegyei arzénos rétegvizek arzénfajtái. A 42. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés kiadványa: 16-19 Veszprém.
- BENTLEY R., CHASTEEN T. G. (2002): Microbial methylation of metalloids: Arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66, 250–271.p.
- BERGLIN E.H., CARLSSON. J. (1985): Potentiation by sulfide of hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 49 (3) 538-543.p.
- BISSEN M., GREMM T., KOKLU U., FRIMMEL F. H. (2000): Use of the anion-exchange resin amberlite IRA-93 for the separation of arsenite and arsenate in aqueous samples. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 28, 41–46.p.
- BOHARI Y., LOBOS G., PINOCHET H., PANNIER F., ASTRUC A., POTIN-GAUTIER M. (2002): Speciation of arsenic in plants by HPLC-HG-AFS: extraction optimisation on CRM materials and application to cultivated samples. *J. Environ. Monit.*, 4, 596–602.p.
- BRISBIN J. A., CARUSO J. A. (2002): Comparison of extraction procedures for the determination of arsenic and other elements in lobster tissue by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst*, 127, 921–929.p.
- BYRNE A. R., SLEJKOVEC Z., STIJVE T., FAY L., GOESSLER W., GAILER J., IRGOLIC K. J. (1995): Arsenobetaine and other arsenic species in mushrooms. *Applied Organometallic Chemistry*, 9, 305-313.p.
- BYRNE A. R., TUSEK-ZNIDARIC M. (1983): Arsenic accumulation in the mushroom *Laccaria amethystina*. *Chemosphere*, 12, 1113-1117.p.
- CABON J.Y., CABON N. (2000): Speciation of major arsenic species in seawater by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry. *Fresen. J. Anal Chem.* 68 (5) 484-48p.p.
- CARUSO J. A., HEITKEMPER D. T., B'HYMER C. (2001): An evaluation of extraction techniques for arsenic species from freeze-dried apple samples. *Analyst*, 126, 136–140.p.
- CHANG K.N., LEE T.C., TAM M.F., CHEN Y.C., LEE L.W., LEE S.Y., LIN P.J., HUANG R.N. (2003): Identification of galectin I and thioredoxin peroxidase II as two arsenic-binding proteins in Chinese hamster ovary cells. *Biochemical Journal*, 371, 495-503.p.
- CHEN C. Y., FOLT C. L. (2000): Bioaccumulation and diminution of arsenic and lead in a freshwater food web. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 3878-3884.p.
- CHILVERS D. C., PETERSON P. J. (1987): Lead, Mercury Cadmium and Arsenic in the Environment. New York. 279.p.
- CLIFFORD, D. (1995): Computer-prediction of arsenic ion-exchange. *Journal American Water Works Association*, 87 (4) 10-10.p.

- COLIN F. P., SALWA K. P. (1991): Chromatography today. Amsterdam, the Netherlands. Elsevier Science Publishers B. V.
- CORR J. J., LARSEN E. H. (1996): Arsenic speciation by liquid chromatography coupled with ionspray tandem mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 11, 1215–1224.p.
- CULLEN W. R., REIMER K. J. (1989a): Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.* 89, 713-764.p.
- CULLEN W.R., REIMER K.J.(1989): Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.*, 89, 713-764. p.
- CSANÁDY M. (1998): Mennyi arzén lehet a hazai ivóvizekben?. *Környezetügyi Műszaki Gazdasági Tájékoztató*, 2, 1-4.p.
- DAGNAC T., PADRÓ A., RUBIO R., RAURET G. (1999): Speciation of arsenic in mussels by the coupled system liquid chromatography—UV irradiation—hydride generation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 48, 4, 763-772. p.
- DAS D., BASU G., CHOWDHURY T.R., CHAKRABORTY D. (1995): Bore-hole soil-sediment analyses of some As affected areas. In: *Proc. Int. Conf. On Arsenic in Groundwater: cause. Effect and remedy*. Calcutta
- DAS H. K., MITRA A. K., SENGUPTA P. K., HOSSAIN A., ISLAM F., RABBANI G. H. (2004): Arsenic concentrations in rice, vegetables, and fish in Bangladesh: a preliminary study. *Environ. Internat.*, 30, 383-387.p.
- DEKOCK W.C., BOWMER C.T. (1993): Bioaccumulation, biological effect and food chain transfer of contaminants in the Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). 503-633.p. In: NALEPA T. F., SCHLOSSER D.W. (Szerk.): *Zebra mussels biology, impacts and control*, Lewis Publishers.
- DEL RAZO L. M., STYBLO M., THOMAS D. J. (2000): Determination of trivalent methylated arsenic species in water, cultured rat hepatocytes, and human urine. *4th International Conference on Arsenic Exposure and Health Effects*, Poster 10.
- DERNOVICS M. (2003): Mintaelőkészítési módszerek kidolgozása és referenciaanyagok előállítása módszeranalitikai célokra. *Doktori disszertáció*, Budapesti Corvinus Egyetem, Alkalmazott Kémia Tanszék, 17-30. p.
- DEVESA V., MARTINEZ A., SUNER M. A., VELEZ D., ALMELA C., MONTORO R. (2001): Kinetic study of transformations of arsenic species during heat treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2272–2276.p.
- DIORIO C., CAI J., MARMOR J., SHINDER R., DUBOW M.S. (1995): An Escherichia coli chromosomal ars operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 177, 2050-2056. p.
- DONOHUE, J., ABERNATHY, C. (1999): Exposure to inorganic arsenic from fish and shellfish. 89-98.p. In: *Arsenic Exposure and Health Effects*, CHAPPELL W.R., ABERNATHY C. O., CALDERON R. L. (Szerk.), Oxford, UK, Elsevier Science Ltd.
- EATON A.D. (1994): Determining the practical quantitation level for arsenic. *J. Am. Water Works Assoc.*, 86 (2) 100-114. p.
- EDMONDS J. S., FRANCESCONI K. A. (1987): Trimethylarsine oxide in estuary catfish (*Cnidogobius macrocephalus*) and school whiting (*Sillago bassensis*) after oral administration of sodium arsenate and as a natural component of estuary catfish. *Sci Total Environ*, 64, 317-323.p.
- EDMONDS J. S., FRANCESCONI K. A. (2003): Organoarsenic compounds in the marine environment. 56-93.p. In: *Organometallic compounds in the environment*.
- EDMONDS J. S., FRANCESCONI K. A., CANNON J. R., RASTON C. L. (1977): Isolation, crystal structure and synthesis of arsenobetaine, the arsenical constituent of the western rock lobster *Panulirus longipes cygnus* George. *Tetrahedron Letters*, 18, 1543-1546.p.
- EDMONDS J. S., FRANCESCONI K. A., HEALY P. C., WHITE A. H. (1982): Isolation and crystal structure of an arsenic-containing sugar sulphate from the kidney of the giant clam *Tridacna*

- maxima: X-ray crystal structure of (2S)-3-[5-(dimethylarsinoyl)-B-D-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropyl hydrogen sulphate. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1, 2989-2993.p.
- EDMONDS J. S., FRANCESCONI K. A., STICK R. V. (1993): Arsenic compounds from marine organisms. *Nat. Prod. Rep.*, 10, 421-428.p.
- EDMONDS J. S., SHIBATA Y., FRANCESCONI K. A., RIPPINGTON R. J., MORITA M. (1997): Arsenic transformations in short marine food chains studied by HPLC ICP MS. *Appl Organomet Chem*, 11, 281-287.p.
- EDMONDS J. S., SHIBATA Y., FRANCESCONI K. A., YOSHINAGA J., MORITA M. (1992): Arsenic lipids in the digestive gland of the western rock lobster *Panulirus cygnus*: An investigation by HPLC ICP-MS. *Sci Total Environ*, 122, 321-335.p.
- EDWARDS M. (1994): Chemistry of arsenic removal during coagulation and Fe-Mn oxidation. *Journal American Water Works Association*, 86 (9) 64-78.p.
- FÖLDMŰVELÉSÜGYI ÉS VIDÉKFEJLESZTÉSI MINISZTERIUM KÖZLEMÉNYE (2005): A halászati ágazat strukturális támogatása. Agrár- és Vidékfejlesztési Operatív Program.
- FRANCESCONI K. A., EDMONDS J. S. (1997): Arsenic and marine organisms, *Adv. Inorg Chem*, 44, 147-189.p.
- FRANCESCONI K. A., EDMONDS J. S., HATCHER B. G. (1988): Examination of the arsenic constituents of the herbivorous marine gastropod *Tectus pyramis*: Isolation of tetramethyl-arsonium ion. *Comp Biochem Physiol*, 90C, 313-316.p.
- FRANCESCONI K. A., EDMONDS J. S., STICK R.V. (1992): Arsenic compounds from the kidney of the giant clam *Tridacna maxima*: isolation and identification of an arsenic-containing nucleoside. *J Chem Soc Perkin Trans* 1, 1349-1357.p.
- FRANCESCONI K. A., GAILER J., EDMONDS J. S., GOESSLER W., IRGOLIC K. J. (1999a): Uptake of arsenic-betaines by the mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C (122) 131-137.p.
- FRANCESCONI K. A., GOESSLER W., PANUTRAKUS S., IRGOLIC K. J. (1998): A novel arsenic containing riboside (arsenosugar) in three species of gastropod. *Sci Total Environ*, 221, 139-148.p.
- FRANCESCONI K. A., HUNTER D. A., BACHMANN B., RABER G., GOESSLER W. (1999b): Uptake and transformation of arsenosugars in the shrimp *Crangon crangon*. *Appl Organomet Chem*, 13, 669-679.p.
- FRANCESCONI K. A., KHOKIATTIWONG S., FOESSLER W., PEDERSEN S. N., PAVKOV M. (2000): A new arsenobetaine from marine organisms identified by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chem. Commun.*, 1083-1084. p.
- FRANCESCONI K. A., VISOOTTIVISETH P., SRIDOKCHAN W., GOESSLER W. (2002): Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. *Sci. Total Environ.*, 284, 27-35.p.
- FRANCESCONI K.A., KUEHNELT D. (2004a): Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications 2000-2003. *Analyst*, 129 (5) 373-395.p.
- FRANCESCONI K.A., PERGANTIS S.A. (2004b): Application of selected reaction monitoring tandem mass spectrometry to the quantitative determination of an arsenic-containing nucleoside in a crude biological extract. *Analyst*, 129 (5) 398-399.
- FRICKE M. W., CREED P. A., PARKS A. N., SHOEMAKER J. A., SCHWEGEL C. A., CREED J. T., (2004): Extraction and detection of a new arsine sulfide containing arsenosugar in molluscs by IC-ICP-MS and IC-ESI-MS/MS. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 19, 11, 1454-1459.p.
- FROST R. R., GRIFFIN R. A. (1977): Effect of pH on adsorption of arsenic and selenium from landfill leachate by clay minerals. *Soil Sci. Soc. Am. J.* , 41, 53-57.p.

- GAILER J., FRANCESCONI K. A., EDMONDS J. S., IRGOLIC K. J. (1995): Metabolism of arsenic compounds by the blue mussel *Mytilus edulis* after accumulation from seawater spiked with arsenic compounds. *Appl Organomet Chem*, 9, 341-355.p.
- GAILER J., FRANCESCONI K.A., EDMONDS J.S., IRGOLIC K.J. (1995): Metabolism of arsenic compounds by the blue mussel mytilus-edulis after accumulation from seawater spiked with arsenic compounds. *Applied organometallic chemistry*, 9 (4) 341-355.p.
- GALLAGHER P. A., SHOEMAKER J. A., WEI X. Y., BROCKHOFF-SCHWEGEL C. A., CREED J. T. (2001): Extraction and detection of arsenicals in seaweed via accelerated solvent extraction with ion chromatographic separation and ICP-MS detection. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 369, 71–80.p.
- GARCIA-MANYES S., JIMENEZ G., PADRO A., RUBIO R., RAURET G. (2002): Arsenic speciation in contaminated soils. *Talanta*, 58, 97–109.p.
- GAST C. H., JANSEN E., BIERLING J., HAANSTRA L. (1988): Heavy metals in mushrooms and their relationship with soil characteristics. *Chemosphere*, 17, 789-799.p.
- GERGELY J., HULLÓ I., DRAGUTIN M., GERGELY J. (1997): Ludasi Jegyzetek. Palics, Csornai Richárd Ökológusok Egyesülete, Szabadka. PALICS-LUDAS t.f. közvállalat.
- GHOSH M. M., YUAN J. R. (1987): Adsorption of inorganic arsenic and organoarsenicals on hydrous oxides. *Environ. Progress*, 6, 150-157.p.
- GOESSLER W., PAVKOV M. (2003): Accurate quantification and transformation of arsenic compounds during wet ashing with nitric acid and microwave assisted heating. *Analyst*, 128 (6) 796-802.p.
- GOMEZ-ARIZA J. L. et al. (2001): Sample Treatment and Storage in Speciation Analysis. 51-80. p. In: Ebdon L. et al. (Szerk.) Trace element speciation for environment, food and health. Thomas Graham House, Cambridge. The Royal Society of Chemistry.
- GOMEZ-ARIZA J. L., SANCHEZ-RODAS D., GIRALDEZ I., MORALES E. (2000a): A comparison between ICP-MS and AFS detection for arsenic speciation in environmental sample. *Talanta*, 51, 257–268.p.
- GOMEZ-ARIZA J. L., SANCHEZ-RODAS D., GIRALDEZ I., MORALES E. (2000B): Comparison of biota sample pretreatments for arsenic speciation with coupled HPLC-HG-ICP-MS. *Analyst*, 125, 401–407.p.
- GONG Z., LU X., CULLEN W. R., LE X. C. (2001): Unstable trivalent arsenic metabolites, monomethylarsonous acid and dimethylarsinous acid. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16, 1409–1413. p.
- GONG Z., LU X., MA M., WATT C., LE X. C. (2002): Arsenic speciation analysis. *Talanta*, 58, 77–96. p.
- GONZALEZ J. C., LAVILLA I., BENDICHO C. (2003): Evaluation of non-chromatographic approaches for speciation of extractable As(III) and As(V) in environmental solid samples by FI-HGAAS. *Talanta*, 59, 525–534.p.
- GOYER R. A. (1999): Arsenic in drinking water. Washington DC. National Academy Press. honlap: <http://www.nap.edu/openbook/0309063337/html>
- GRÜTER U. M., KRESIMON J., HIRNER A. V. (2000): A new HG/LT-GC/ICP-MS multi-element speciation technique for real samples in different matrices. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 368, 67–72.p.
- HAJÓS GY., ZAJKÁS G (2000): A táplálkozás egészségkönyve. Budapest. Kossuth kiadó.
- HANAOKA K., GOESSLER W., KOSHIDA K., FUJITAKA Y., KAISE T., IRGOLIC K. J. (1999a): Arsenocholine- and dimethylated arsenic-containing lipids in star-spotted shark *Mustelus manazo*. *Appl Organomet Chem*, 13, 765-770.p.
- HANAOKA K., KAISE T. (1999b): Microbial degradation of arsenobetaine accumulated in marine animals. *J Nat Fish Uni*, 48, 41-47.p.

- HANAOKA K., NAKAMURA O., OHNO H., TAGAWA S., KAISE T. (1995): Degradation of arsenobetaine to inorganic arsenic by bacteria in seawater. *Hydrobiologia*, 316, 75-80.p.
- HANSEN H.R., RAAB A., JASPARS M., MILNE B.F., FELDMANN J. (2004): Sulfur-containing arsenical mistaken for dimethylarsinous acid [DMA(III)] and identified as a natural metabolite in urine: Major implications for studies on arsenic metabolism and toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 17 (8) 1086-1091.
- HEGYI Á. (2000): Vizeink új lakója? *Élet és Tudomány*, 47.
- HEITKEMPER D. T., VELA N. P., STEWART K. R., WESTPHAL C. S. (2001): Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 16, 299–306.p.
- HERING J.G., CHEN P.Y., WILKIE J.A., ELIMELECH M., LIANG S. (1996): Arsenic removal by ferric chloride. *Journal American Water Works Association*, 88 (4) 155-167.p.
- HINWOOD A., SIM M., JOLLEY D., DE KLERK N., BASTONE E. B., GEROSTAMOULOS J., DRUMMER O. H. (2003): Risk factors for increased urinary inorganic arsenic concentrations from low arsenic concentrations in drinking water. *Int. J. Environ. Health Res.*, 13, 271–284.p.
- HUANG Y. K., LIN K. H., CHEN H. W., CHANG C. C., LIU C. W., YANG M. H., HSUEH Z. M. (2003): Arsenic species contents at aquaculture farm and in farmed mouthbreeder (*Oreochromis mossambicus*) in blackfoot disease hyperendemic areas. *Food Chem. Toxicol.*, 41, 1491-1500.p.
- IPOLYI I., (2003): Gyakorlati megoldások a speciációs analitika minőségének biztosítására. *Doktori disszertáció*, Budapesti Corvinus Egyetem, Alkalmazott Kémia Tanszék, 17-30. p.
- IRGOLIC K.J., GRSCHONIG H., HOWARD A. G. (1995): Arsenic. 168-184.p. In: TOWNSHEND A. (Szerk.): *Encyclopedia of Analytical Science*. London: Academic Press.
- JENKINS R. S., ALISDAIR W. R., EDMONDS J. S., GOESSLER W., MOLENAT N., KUEHNELT D., HARRINGTON F. C., SUTTON P. G. (2003): Bacterial degradation of arsenobetaine via dimethylarsinoylacetate. *Arch Microbiol*, 180, 142-150.p.
- JULIAN D., STATILE J.L., WOHLGEMUTH S.E., ARP A.J. (2002): Enzymatic hydrogen sulfide production in marine invertebrate tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and integrative physiology*, 133 (1) 105-115.
- KAISE t., FUKUI S. (1992) The chemical form and acute toxicity of arsenic compounds in marine organisms. *Appl. Organomet. Chem.*, 6, 155-160.p.
- KAISE T., OGIURA M., NOZAKI T., SAITOH K., SAKURAI T., MATSUBARA C., WATANABE C., HANAOKA K. (1997): Biomethylation of arsenic in an arsenic-rich freshwater environment. *Appl. Organomet. Chem.*, 11, 297-304.p.
- KAISE T., SAKURAI T., MATSUBARA C., TAKADAOIKAWA N., HANAOKA K. (1998): Biotransformation of arsenobetaine to trimethylarsine by marine microorganism in a gill of clam *Meretrix lissor*. *Chemosphere*, 37, 443-449.p.
- KALAC P., SCOBODA L. (2000): A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 69, 273-281.p.
- KHOKIATTIWONK S., GOESSLER W., PEDERSON S. N., COX R., FRANCESCONI K. A. (2001): Dimethylarsinoylacetate from microbial demethylation of arsenobetaine in seawater. *Appl Organomet Chem*, 15, 481-489.p.
- KILLELEA D. R., ALDSTADT J. H. (2002): Identification of dimethylchloroarsine near a former herbicide factory by headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere*, 48, 1003–1008.p.
- KIRK T. K. (2001): Recent Advances in Arsenic Carcinogenesis: Modes of Action, Animal Model Systems, and Methylated Arsenic Metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 172, 3, 249-261. p.

- KITCHIN K. T. (2001): Recent advances in arsenic carcinogenesis: Modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicology and Applied pharmacology*, 172, 249-261.p.
- KOCH I., REIMER K. J., BEACH A., CULLEN W. R., GOSDEN A., LAI V. W. M. (2001): Arsenic exposure and health effects. *IV. Elsevier Science LTD.*, 1, 115-123.p.
- KOCH I., WANG L., REIMER K. J., CULLEN W. R. (2000): Arsenic species in terrestrial fungi and lichens from Yellowknife, NWT, Canada. *Applied Organometallic Chemistry*, 14, 245-252.p.
- KOELLENSPERGER G., NURMI J., HANN S., STINGEDER G., FITZ W. J., WENZEL W. W. (2002): CE-ICP-SFMS and HPIC-ICP-SFMS for arsenic speciation in soil solution and soil water extracts. *J. Anal. At. Spectrom.*, 17, 1042–1047.p.
- KORTE N. E., FERNANDO Q. (1991): A review of arsenic (III) in groundwater. *Crit. Rev. Environ. Control*, 21, 1-40.p.
- KUEHNELT D. (2000): Determination of Arsenic Compounds in Samples from a Former Arsenic Roasting Facility in Austria. Doktori disszertáció.
- KUEHNELT D., GOESSLER W., IRGOLIC K. J. (1997): Arsenic compounds in terrestrial organisms II. Arsenocholine in the mushroom *Amanita muscaria*. *Applied Organometallic Chemistry*, 11, 459-470.p.
- KUEHNELT D., IRGOLIC K. J., GOESSLER W. (2001): Comparison of three methods for the extraction of arsenic compounds from the NRCC standard reference material DORM-2 and the brown alga *Hijiki fuziforme*. *Appl. Organomet. Chem.*, 15, 445–456.p.
- KURODA K., YOSHIDA K., YASUKAWA A., WANIBUCHI H., FUKUSHIMA S., ENDO G. (2001): Enteric bacteria may play a role in mammalian arsenic metabolism. *Applied Organometallic Chemistry*, 15 (6) 548-552.
- LAI V. W. M., CULLEN W. R., RAY S. (1999): Arsenic speciation in scallops. *Marine Chem*, 66, 81-89.p.
- LANGDON C. J., MEHARG A. A., FELDMANN J., BALGAR T., CHARNOCK J., FARQUHAR M., PIEARCE T. G., SEMPLE K. T., COTTER-HOWELLS J. (2002): Arsenic-speciation in arsenate-resistant and non-resistant populations of the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *J. Environ. Monit.*, 4, 603–608.p.
- LARSEN E. H., HANSEN M., GOESSLER W. (1998): Speciation and health risk considerations of arsenic in the edible mushroom *Laccaria amethystina* collected from contaminated and uncontaminated locations. *Applied Organometallic Chemistry*, 12, 285-291.p.
- LARSEN E. H., PRITZL G., HANSEN S. H. (1993a): Arsenic speciation in seafood samples with emphasis on minor constituents: An investigation using high-performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom*, 8, 1075-1084.p.
- LARSEN E. H., PRITZL G., HANSEN S. H. (1993b): Speciation of 8 arsenic compounds in human urine by high-performance liquid-chromatography with inductively-coupled plasma-mass spectrometric detection using antimonite for internal chromatographic standardization. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 8 (4) 557-563.p.
- LARSEN H. H., QUETEL C. R., MUNOZ R., FIALA-MEDIONI A., DONARD O. F. X. (1997): Arsenic speciation in shrimp and mussel from the Mid-Atlantic hydrothermal vents. *Marine Chem*, 57, 341-346.p.
- LE X. C., LU X., MA M., CULLEN W. R., APOSHIAN H. V., ZHENG B. (2000a): Speciation of key arsenic metabolic intermediates in human urine. *Anal. Chem.* 72, 5172-5177.p.
- LE X. C., MA M. S., LU X. F., CULLEN W. R., APOSHIAN H. V., ZHENG B. S. (2000b): Determination of monomethylarsonous acid, a key arsenic methylation intermediate, in human urine. *Environmental Health Perspectives*, 108 (11) 1015–1018. p.

- LI WX, CHEN TB, CHEN Y, ET AL., 2005, Role of trichome of *Pteris vittata* L. in arsenic hyperaccumulation, *Science in China Series C-life Sciences*, 48(2), 148-154.
- LOVLEY D. R., PHILLIPS E. J. P., LONERGAN D. J. (1991): Enzymatic versus nonenzymatic mechanisms for Fe(III) reduction in aquatic sediments. *J. Environ. Sci. Technol.*, 25, 1062-1067.p.
- LUMSDON D. G., FRASER R. A., RUSSEL J. D., LIVESEY N. T. (1984): New infrared band assignments for the arsenate ion absorbed on synthetic goethite (α -FeOOH). *J. Soil Sci.*, 35, 381-386.p.
- MACY J.M., NUNAN K., HAGEN K.D., DIXON D. R., HARBOUR P.J., VAHILL M., SLY L.I. (1996): *Chrysiogenes arsenates* gen. Nov., sp. Nov., a new arsenate-respiring bacterium isolated from gold mine wastewater. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 1153-1157.p.
- MADSON A. D., GOESSLER W., PEDERSEN S. N., FRANCESCONI K. A. (2000): Characterisation of an algal extract by HPLC-ICP-MS and LC-electrospray MS for use in arsenosugar speciation studies. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15, 657-662.p.
- MAGYAR KÖZLÖNY 2003/25., 9/2003. számú ESZCSM rendelethez
- MAHER W., GOESSLER W., KIRBY J., RABER G. (1999): Arsenic concentrations and speciation in the tissues and blood of sea mullet (*Mugil cephalus*) from Lake Macquarie, NSW, Australia. *Marine Chem.*, 68, 169-182.p.
- MANDAL B. K., SUZUKI K. T. (2002): Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58, 201–235.p.
- MCSHEEHY S., MESTER Z. (2003a): The speciation of natural tissues by electrospray-mass spectrometry. I: biosynthesised species, As and Se. *Trends Anal. Chem.*, 22, 210–224.p.
- MCSHEEHY S., SZPUNAR J., LOBINSKI R., HALDYS V., TORTAJADA J., EDMONDS J.S. (2002): Characterization of arsenic species in kidney of the clam *Tridacna derasa* by multidimensional liquid chromatography-ICPMS and electrospray time-of-flight tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74 (10) 2370-2378.p.
- MCSHEEHY S., SZPUNAR J., MORABITO R., QUEVAUVILLER P.(2003b): The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control. *Trends Anal. Chem.*, 22, 191–209.p.
- MENZEL D.B., HAMADEH H.K., LEE E., MEACHER D.M., SAID V., RASMUSSEN R.E., GREENE H., ROTH R.N. (1999): Arsenic binding proteins from human lymphoblastoid cells. *Toxicology letters*, 105 (2) 89-101.p.
- MERSH J.J., PIHAN C., (1993): Simultaneous assessment of environmental impact on condition and trace metal availability in Zebra mussels *Dreissena polymorpha* transplanted into Wiltz River, Luxemburg. *Comparison with the Aquatic moss Fontinalis antipyretica*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 25, 353-364.p.
- Mezőgazdasági és Vidékfejlesztési Minisztérium [1997-2003] Élelmiszermarketing Körkép. Harmadik kiadás. Második szám. Akadémiai kiadó.
- MILSTEIN L. S., ESSADER A., MURRELL C., PELLIZZARI E. D., FERNANDO R. A., RAYMER J. H., AKINBO O. (2003): Sample preparation, extraction efficiency, and determination of six arsenic species present in food composites. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4180–4184.p.
- MIRNSKY J. A., MARCUS Y. (1979): Ion-exchange and solvent extraction. Dekker, New York.
- MOK W. M., WAI C. M. (1994): Mobilization of As in contaminated river waters. 99-117.p. In: NRIAGU. J. O. (Szerk.): *Arsenic in the Environment, Part I. Cycling and characterisation*. New York: J. Wiley and Sons
- MONTPERRUS M., BOHARI Y., BUENO M., ASTRUC A., ASTRUC M. (2002): Comparison of extraction procedures for arsenic speciation in environmental solid reference materials by high-performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectroscopy. *Applied Organometallic Chemistry*, 16 (7) 347-354.p.
- MORITA M., SHIBATA Y. (1990): Chemical form of arsenic in marine macroalgae. *Appl. Organomet Chem*, 4, 181-190.p.

- NAIDU R., SMITH J., MCLAREN R. G., STEVENS D. P., SUMNER M. E., JACKSON P. E. (2000): Application of capillary electrophoresis to anion speciation in soil water extracts: II. Arsenic. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64, 122–128.p.
- NAKAZATO T., TAO H., TANIGUCHI T., ISSHIKI K. (2002): Determination of arsenite, arsenate, and monomethylarsonic acid in seawater by ion-exclusion chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry using reaction cell and hydride generation techniques. *Talanta* 58, 121.p.
- National Research Council [1977]: Arsenic. Washington DC: National Academy of Sciences, 16.p.
- NEWMAN C. (2005): Méreg tíz tételben. *National Geographic*, 3 (5) 57-59.p.
- NICKSON R.T., MCARTHUR J.M., RAVENSROFT P., BURGESS W. G., AHMED K.M. (2000): Mechanism of arsenic release to groundwater, Bangladesh and West Bengal. *Applied Geochemistry*, 15, 403-413.p.
- O'CONNOR T.P. (2002): National Distribution of Chemical Concentrations in Mussels and Oysters in the USA. *Marine Environmental Research*, 53, 117-143. p.
- OERTEL N. (1998): A nehézfémek kontrollja vándorkagylóval (*Dreissena polymorpha* Pallas) a magyarországi Duna-szakaszon. *Hidrológiai Közlöny*, 78, 5-6, 266-268.p.
- PIZARRO I., GOMEZ M., CAMARA C., PALAICOS M. A. (2003): Arsenic speciation in environmental and biological samples - Extraction and stability studies. *Anal. Chim. Acta*, 495, 85–98.p.
- QUEVAUVILLIER P. (1998): Method Performance, Studies for Speciation Analysis. s.l.: Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- RACZ L., OLDAL V. (2000): Investigation of uptake processes in a soil/mushroom system by AES and AAS. *Microchemical Journal*, 67(1-3) 115-118.p.
- RACZ L., PAPP L., OLDAL V., KOVACS Z. (1998): Determination of essential and toxic metals in cultivated champignons by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Microchemical Journal*, 59 (2) 181-186.p.
- RANDALL K., LEVER M., PEDDIE B. A., CHAMBERS S. T. (1995): Competitive accumulation of betaines by *Escherichia coli* K-12 and derivative strains lacking betaine porters. *Biochim Biophys Acta*, 1245, 116-120.p.
- ROPER J.M., CHERRY D. S., SIMMERS J. W., TATEM H. E. (1996): Bioaccumulation of toxicants in the Zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, at the times beach confined disposal facility, Buffalo, New York. *Environmental Pollution*, 94, 2, 117-129.p.
- ROSEN B. P. (2002): Biochemistry of arsenic detoxification. *Febs Letters*, 529 (1) 86-92.p.
- ROSENBERG E. (2003): The potential of organic (electrospray- and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis. *J. Chromatogr. A*, 1000, 841–889.p.
- SANCHEZ-RODAS D., GEISZINGER A., GOMEZ-ARIZA J. L., FRANCESCONI K. A. (2002): Determination of an arsenosugar in oyster extracts by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry and liquid chromatography-ultraviolet photo-oxidation-hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Analyst*, 127, 60–65.p.
- SCHAEFFER R., SOEROES C., IPOLYI I., FODOR P., THOMAIDIS N.S. (2005): 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 (1) 109-118.p.
- SCHILL G. (1974) In: MIRNSKY J. A., MARCUS Y. (Szerk.): *Ion-exchange and solvent extraction*, Dekker, New York, NY, 6, 1.p
- SCHMEISSER E., RAML R., FRANCESCONI K. A., KUEHNELT D., LINDBERG A., SÖRÖS C. GOESSLER W. (2004): Thio arsenosugars identified as natural constituents of mussels by liquid chromatography-mass spectroscopy. *Chem. Commun.*, 1824-1825. p.

- SCHMIDT A. C., REISSER W., MATTUSCH J., POPP P., WENNRICH R. (2000): Evaluation of extraction procedures for the ion chromatographic determination of arsenic species in plant materials. *J. Chromatogr., A*, 889, 83–91.p.
- SCHOEN A., BECK B., SHARMA R., DUBE E. (2004): Arsenic toxicity at low doses: epidemiological and mode of action considerations. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198 (3) 253-267.p.
- SCOTT M J., MORGAN J. J. (1995): Reactions at oxide surfaces. 1. Oxidation of As(III) by synthetic birnessite. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1898-1905.p.
- SEEGER R., ORTH H., SCHWEINSHAUT P. (1982): Strontiumvorkommen in Pilzen. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 174, 381-389.p.
- SHIBATA Y., MORITA M. (1989): Speciation of arsenic by reversed-phase high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass-spectrometry. *Anal. Sci.*, 5, 107–109.p.
- SHIOMI K. (1994): Arsenic in marine organisms: Chemical forms and toxicological aspects. Vol. 27., Chapter 12. In: *Arsenic in the Environment. Part II: Human Health and Ecosystem Effects*, NRIAGU J. (Szerk.) New York, USA, John Wiley and Sons Inc..
- SHIOMI K., KAKEHASHI Y., YAMANAKA H., KIKUCHI T. (1987): Identification of arsenobetaine and a tetramethylarsonium salt in the clam *Meretrix lusoria*. *Appl Organomet Chem*, 1, 177-183.p.
- SHUVAEVA O. V., KOSHCHEEVA O. S., BEISEL N. F. (2002): Arsenic speciation in water by high-performance liquid chromatography with electrothermal atomic absorption detection. *J. Anal. Chem.*, 57, 1037–1041.p.
- SILVER S., JI H., BROER S., DAY S., DOU D., ROSEN B. R. (1993): Orphan enzyme of patriarch of a now tribe: The arsenic resistance ATPase of bacterial plasmids. *Mol. Microbiol.*, 8, 637-642.p.
- SLEJKOVEC M., IRGOLIC K. J. (1996a): Uptake of arsenic by mushrooms from soil. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 8(3/4), 67-73.p.
- SLEJKOVEC Z., BAJC Z., DOGANOC D. Z. (2004): Arsenic speciation patterns in freshwater fish. *Talanta*, 62, 931-936.p.
- SLEJKOVEC Z., BYRNE A. R., GOESSLER W., KUEHNELT D., IRGOLIC K. J., POHLEVEN F. (1996c): Methylation of arsenic in *Pleurotus* sp. and *Agaricus placomyces*. *Acta Chimica Slovenica*, 41(3) 269-283.p.
- SLEJKOVEC Z., BYRNE A. R., SMODIS B., ROSSBACH M. (1996b): Preliminary studies on arsenic species in some environmental samples. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 354, 592-595.p.
- SLEJKOVEC Z., BYRNE A. R., STIJVE T., GOESSLER W., IRGOLIC K. J. (1997): Arsenic compounds in higher fungi. *Applied Organometallic Chemistry*, 11, 673-682.p.
- SMEDLEY, P.L., KINNIBURGH D.G. (2001): Source and behaviour of arsenic in natural waters. *United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water*
- SMITH A. H., LOPIPERO P. A., BATES M. N., STEINMAUS C. M. (2002): Public health - Arsenic epidemiology and drinking water standards. *Science*, 296, 2145–2146.p.
- SOEROES C., GOESSLER W., FRANCESCONI K.A., KIENZL N., SCHAEFFER R., FODOR P., KUEHNELT D. (2005b): Arsenic speciation in farmed Hungarian freshwater fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (23) 9238-9243.p.
- SOEROES C., GOESSLER W., FRANCESCONI K.A., SCHMEISSER E., RAML R., KIENZL N., KAHN M., FODOR P., KUEHNELT D. (2005c): Thio arsenosugars in freshwater mussels from the Danube in Hungary. *Journal of Environmental Monitoring*, 7 (7) 688-692.p.
- SOEROES CS., KIENZL N., IPOLYI I., DERNOVICS M., FODOR P., KUEHNELT D. (2005a): Arsenic uptake and arsenic compounds in cultivated *Agaricus bisporus*. *Food Control*, 16, 459-464.p.
- SÖRÖS CS., BODÓ E. T., FODOR P., MORABITO R. (2003): The potential of arsenic speciation in molluscs for environmental monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377, 25-31.p.

- STIJVE R., BOURQUI B. (1991): Arsenic in edible mushrooms. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 87, 307-310.p.
- STIJVE T., PITTET A., ANDREY D., LOPES M. A., GOESSLER W. (2003): Potential toxic constituents of *Agaricus brasiliensis* (A. Blazei ss. Heinem.), as compared to other cultivated and wild-growing edible mushrooms. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 99 (12) 475-481.p.
- STIJVE T., VELLINGA E. C., HERRMANN A. (1990): Arsenic accumulation in some higher fungi. *Persoonia*, 14, 161-166.p.
- STIPANUK M.H., BECK P.W. (1982): Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphydration in liver and kidney of the rat. *Biochemical Journal*, 206 (2) 267-277.p.
- SUI K. W., GARDNER G. J., BERMAN S. S. (1988): *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2, 69–71.p.
- SUN B. G., MACKA M., HADDAD P. R. (2001): Speciation of tin, lead, mercury, arsenic and selenium compounds by capillary electrophoresis. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 81, 161–205.p.
- SUN HW., LIU ZF., WU WJ., LI LQ., SHI HM. (2005): Simultaneous determination of arsenic and selenium in biological samples by HG-AFS. *Anal. And Bioanal. Chem.*, 382, 1060-1065. p.
- SUN X., DONER H. E. (1996): An investigation of arsenate and arsenate bonding structures on goethite by FTIR. *Soil Sci.*, 161, 865-872.p.
- SUZUKI K.T., MANDAL B.K., OGRA Y. (2002): Speciation of arsenic in body fluids. *Talanta*, 58 (1) 111-119.p.
- TEMPLETON D. M., ARIESE F., CORNELIS R., DANIELSSON L-G., MUNTAU H., VAN LEEUWEN H. P., ŁOBINSKI R. (2000): Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements, definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry*, 72 (8) 1453–1470. p.
- THOMAS D. J., STYBLO M., LIN S. (2001): The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 176, 127–144.p.
- THORNTON I. (1996): Sources and pathways of As in the geochemical environment: Health implications. 113, 153-161.p. In: APPLETON J. K., FUGE. R., MCCALL G.J.H. (Szerk.) *Environmental Geochemistry and Health*. Geol. Soc. Spec. Publ.
- TOYAMA M., YAMASHITA M., HIRAYAMA N., MUROOKA Y. (2002): Interactions of arsenic with human metallothionein-2. *Journal of biochemistry*, 132 (2) 217-221.p.
- TUKAI R., MAHER W. A., MCNAUGHT I. J., ELLWOOD M. J. (2002): Measurement of arsenic species in marine macroalgae by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 457, 173–185.p.
- TYLER G. (1982): Accumulation and exclusion of metals in *Collybia peronata* and *Amanita rubescens*. *Transactions of the British Mycological Society*, 79, 239-245.p.
- VAHTER M. (2002): Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, 181, 211–217.p.
- VALENZUELA O.L., BORJA-ABURTO V.H., GARCIA-VARGAS G.G., CRUZ-GONZALEZ M.B., GARCIA-MONTALVO E.A., CALDERON-ARANDA E.S., DEL RAZO L.M. (2005): Urinary trivalent methylated arsenic species in a population chronically exposed to inorganic arsenic. *Environ. Health Persp.*, 113 (3) 250-254.p.
- VARSÁNYI I., FODRE Z., BARTHA A. (1991): Arsenic in drinking water and mortality in the southern great plain, Hungary. *Environmental Geochemistry and Health*, 13 (1) 14-22.p.
- VELA N. P., HEITKEMPER D. T., STEWART K. R. (2001): Arsenic extraction and speciation in carrots using accelerated solvent extraction, liquid chromatography and plasma mass spectrometry. *Analyst*, 126, 1011–1017.p.
- VETTER J. (1989): Comparison of mineral elements in *agaricus* and *pleurotus* fruit bodies. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 189, 346.p.
- VETTER J. (1994): Data on arsenic and cadmium contents of some common mushrooms. *Toxicon*, 32, 11-15.p.

- VILANO M., RUBIO R. (2001): Determination of arsenic species in oyster tissue by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-atomic fluorescence detection. *Appl. Organomet. Chem.*, 15, 658–666.p.
- VILLA-LOJO M. C., ALONSO-RODRIGUEZ E., LOPEZ-MAHIA, MUNIATEGUI-LORENZO S., PRADA-RODRIGUEZ D. (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.p.
- WANGKARN S., PERGANTIS S. A. (2000): Speciation of As in the blackfoot disease endemic area. *J. Anal. At. Spectrom.*, 15, 627–633.p.
- WARENYCIA M.W., GOODWIN L.R., BENISHIN C.G., REIFFENSTEIN R.J., FRANCOM D.M., TAYLOR J.D., DIEKEN F.P. (1989): Acute hydrogen-sulfide poisoning – demonstration of selective uptake of sulfide by the brain-stem by measurement of brain sulfide levels. *Biochemical Pharmacology*, 38 (6) 973-981.p.
- WAYCHUNAS G. A., REA B. A., FULLER C. C., DAVIS J. A. (1993): Surface chemistry of ferrihydrite: Part 1. EXAFS studies of the geometry of co-precipitated and adsorbed arsenate. *Geochim, Cosmochim, Acta*, 57, 2251-2269.p.
- WILLIAMS P.N., PRICE A.H., RAAB A., HOSSAIN S.A., FELDMANN J., MEHARG A.A. (2005): Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. *Environmental Science and Technology*, 39 (15) 5531-5540.p.
- WILLIE S.N., BERMAN S.S., (1994): Analysis of Contaminants in Edible Aquatic Sources. In: KICENIUK J.W., RAY S. (Szerk.), VCH, New York, USA.
- WRIGHT S.H., WUNZ T. M., SILVE A.L. (1992): Betaine transport in the gill of a marine mussel, *Mytilus californianus*. *Am J Physiol (Regulatory Integrative Comp. Physiol 32)*, 163, 226-232.p.
- YEHL P. M., GURLEYUK H., TYSON J. F., UDEN P. C. (2001): Microwave-assisted extraction of monomethyl arsonic acid from soil and sediment standard reference materials. *Analyst*, 126, 1511–1518.p.
- YOSHIDA K., KURODA K., INOUE Y., CHEN H., DATE Y., WANIBUCHI H., FUKUSHIMA S. (2001): Metabolism of dimethylarsinic acid in rats: production of unidentified metabolites in vivo. *Applied Organometallic Chemistry*, 15 (6) 539-547.p.
- YOSHIDA T., YAMAUCHI H., SUN G. F. (2004): Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose-response relationships in review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198 (3) 243-252.p.
- ZHANG W., CAI Y., TU C., MA L. Q. (2002): Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. *The Science of the Total Environment*, 300 (21) 167-177.p.
- ZHENG J., HINTELMANN H. (2004): Hyphenation of high performance liquid chromatography with sector field inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of ultra-trace level anionic and cationic arsenic compounds in freshwater fish. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 19, 191-195.p.
- ZHU J., CHEN Z., LALLEMAND-BREITENBACH V., DE THE H. (2002): How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 705–713.p.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni a sok-sok bátorítást és türelmet mindazoknak, akik doktori munkám során segítségemre voltak a négy év alatt.

Elsősorban témavezetőmnek, dr. Fodor Péternek, akinek szervezőmunkája és szakmai támogatása nélkül a munka nem készült volna el.

Családomnak, édesapámnak, édesanyámnak, testvéremnek, nagymamámnak, nagypapámnak, néjémnek, apósomnak, anyósomnak, sógornómnek, Kisandrisnak, akik a négy év alatt érdeklődéssel és türelemmel hallgatták szakmai beszámolóimat, támogattak és bíztattak tanulmányaim alatt.

Férjemnek, Marczika Andrásnak, aki türelemmel viselte a sokszor estéig nyúló méréseimet, külföldi távolmaradásaimat, segítséget nyújtott számos mintavételben és kitartásra biztatott kudarcaim alkalmával.

A Karl-Franzens Egyetem (Graz) Kémiai Tanszékének minden dolgozójának, kiemelten Kevin Francesconi, Doris Kuehnelt és Walter Goessler professzoroknak, akik önzetlenül sok-sok szakmai tapasztalatot adtak át számomra.

Munkatársaimnak, Abrankó Lászlónak, Ipolyi Ildikónak, Dernovics Mihálynak, Szatura Zsuzsának, Gergely Valériának, Kápolna Emesének, Üveges Mártának, akikkel a hasznos konzultációk alkalmával egymás tevékenységét kölcsönösen támogattuk, valamint nem utolsósorban vidám, kellemes tanszéki légkört biztosítottak a szakmai munkához.

Kiemelten munkatársamnak Schäffer Richárdnak, akivel a négy év alatt nagyon hatékonyan és kiválóan együttműködve tudtam dolgozni.

Csányi Bélának (VITUKI), Váradi Lászlónak (SZIE), Gyöngyösiné dr. Papp Zsuzsának (HAKI) és Radicsné Ráczkevi Juditnak (HAKI), akik a mintavételben voltak segítségemre.

Az Alkalmazott Kémia Tanszék minden munkatársának.