

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STANOVENÍ CHEMICKÝCH FOREM RTUTI KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ S DETEKČÍ ATOMOVOU FLUORESCENČNÍ SPEKTROMETRIÍ TECHNIKOU GENERACE STUDENÝCH PAR

PAVLÍNA HOUSEROVÁ^a, DAVID MATĚJÍČEK^a, VLASTIMIL KUBÁŇ^a, JANA PAVLÍČKOVÁ^a a JOSEF KOMÁREK^b

^a Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno,

^b Katedra analytické chemie, Masarykova Univerzita v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno
kuban@mendelu.cz

Došlo 10.8.05, přepracováno 21.3.06, přijato 22.8.06.

Klíčová slova: rtuť, methylrtuť, chemické formy rtuti, extrakce, separace, stanovení, kapalinová chromatografie, atomová fluorescenční spektrometrie

Úvod

Speciační analýza je definována jako stanovení jednotlivých fyzikálně chemických forem prvku, přičemž součet jejich koncentrací tvoří celkovou koncentraci prvku ve vzorku. Pro rozlišení jednotlivých forem prvku se využívají rozdíly v chemických i fyzikálních vlastnostech těchto forem.

Dříve se ke stanovení chemických forem rtuti používalo selektivní jednostupňové extrakce, selektivní redukce chemických forem rtuti roztokem NaBH_4 o různé koncentraci¹, nebo dvoustupňové redukce roztoky SnCl_2 a NaBH_4 (cit.²) ve spojení s atomovou absorpční (CV-AAS) nebo atomovou fluorescenční spektrometrií (CV-AFS).

V současné době se prvková speciační analýza provádí převážně kombinovanými (tandemovými) technikami, které spojují separační metody (plynovou chromatografií – GC, vysoce účinnou kapalinovou chromatografií – HPLC a kapilární zónovou elektroforézou – CZE) se selektivní detekcí prvků, v některých případech i isotopů. Tyto techniky tak umožňují selektivně a většinou i velmi citlivě stanovit všechny přítomné fyzikálně chemické formy prvku (specie)³. Nejčastěji se k rozdělení chemických forem rtuti používá plynové nebo kapalinové chromatografie,

přičemž prozatím nedoceněny zůstávají možnosti separace elektromigračními technikami (kapilární zónovou elektroforézou – CZE). Podrobný přehled vlastností, výskytu a biotransformací jednotlivých forem rtuti ve vodném ekosystému, jakož i přehled metod jejich stanovení je uveden v přehledné práci⁴.

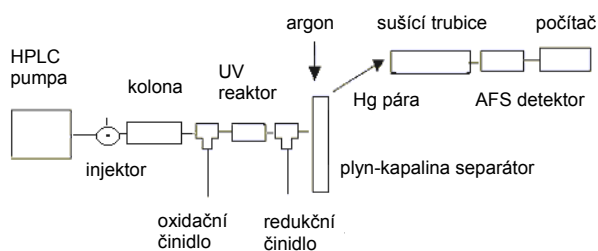
V této práci byly optimalizovány a validovány metody stanovení methylrtuti (methylhydrargyrium-chloridu – MeHgCl), ethylrtuti (ethylhydrargyrium-chloridu – EtHgCl) a fenylrtuti (fenylhydrargyrium-chloridu – PhHgCl) vedle anorganických forem rtuti (Hg^{2+}) kapalinovou chromatografií s detekcí atomovou fluorescenční spektrometrií technikou generace studených par (HPLC/CV-AFS). Výsledky byly porovnány s výsledky stanovení methylhydrargyrium-chloridu a anorganických forem rtuti (Hg^{2+}) plynovou chromatografií s detektorem se zachytem elektronů (GC/ECD) i s obsahy celkové rtuti (T-Hg) a MeHgCl v certifikovaných referenčních materiálech (CRM) i ve vzorcích ryb.

Experimentální část

Přístroje

Pro stanovení chemických forem rtuti byl použit kapalinový chromatograf LC-200 (tzv. bioverze, Perkin Elmer, Norwalk, USA) vybavený vysokotlakou pumpou Series 200 LC, autosamplerem Series 200 a atomovým fluorescenčním detektorem PSA Millenium Merlin (PS Analytical Ltd., Orpington, UK). Chromatografický systém byl kontrolován chromatografickým softwarem TurboChrom přes 600 Series a 900 Series propojení (PE Nelson, Norwalk, USA). Isokratická eluce chemických forem rtuti byla prováděna na chromatografické koloně s reverzní fází Hypersil BDS C18 (2×125 mm, velikost částic 3 μm , Hewlett Packard, Palo Alto, USA) při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,15 ml min^{-1} . Mobilní fáze obsahovala acetátový pufr (pH 5), 0,05 % 2-sulfanylanethanol a 7 % methanol s jeho skokovou změnou na 100 % MeOH v 15. minutě separace. Před začátkem a na konci měření byl chromatografický systém promyt methanolem po dobu 10 min. Automatickým dávkovačem bylo do toku mobilní fáze dávkováno 100 μl vzorku. Automatický dávkovač byl před každým dalším dávkováním vzorku automaticky promyt směsí H_2O a methanolu (1:1 v/v).

Eluent z chromatografické kolony přecházel po smísení s oxidačním činidlem (0,2 mol l^{-1} KBr + 0,04 mol l^{-1} KBrO_3 v 5% HCl) přes UV reaktor (teflonová kapilární trubička 0,5 mm $\times$ 10 m, výkon UV lampy 12 W, vlnová délka 253,6 nm), který zajišťoval převedení všech chemických forem rtuti fotooxidací na Hg^{2+} . Přebytkový Br_2 byl následně odstraňován vodným roztokem hydroxylamin-



Obr. 1. Schématické uspořádání HPLC/CV-AFS systému pro stanovení chemických forem rtuti

hydrochloridu (0,004%). Rtuťnaté ionty byly dále redukovány 2% roztokem SnCl_2 v 10% HCl na elementární rtuť. Z roztoku byla elementární rtuť uvolněna proudem argonu ($0,25 \text{ l min}^{-1}$) a oddělena v separátoru fází g/l. Směs byla vysušena v membránové jednotce PermaPure® a detegována CV-AFS v křemenné cele při vlnové délce 253,6 nm. Výsledná data byla zpracována chromatografickým softwarem Clarity (verze 2.1, Data Apex, Praha, ČR). Schématické uspořádání HPLC/CV-AFS systému pro stanovení chemických forem rtuti je znázorněno na obr. 1.

Pro stanovení celkového obsahu rtuti (T-Hg) byl použit jednoúčelový atomový absorpční spektrofotometr AMA 254 s automatickým dávkovačem tuhých vzorků ASS 254. Celé zařízení bylo řízeno WinAMA softwarem

(vše Altec s.r.o., Praha). Homogenizované tuhé vzorky (20–100 mg, $\pm 0,1 \text{ mg}$) byly navažovány do předčištěných vypálených niklových lodiček, vysušeny při 120°C (90 s) a spáleny při 550°C (180 s) v proudě kyslíku (200 ml min^{-1}). Páry rtuti byly po fokusaci v amalgamátoru uvolněny tepelným pulzem a transportovány do měřících cel přístroje AMA 254 (poměr 15:1). Absorpce Hg byla měřena při 253,6 nm (doba měření 60 s).

Použité chemikálie

Ethylrtuť (ethylhydrargyrium-chlorid – EtHgCl , $\text{C}_2\text{H}_5\text{HgCl}$, Supelco, Německo), methylrtuť (methylhydrargyrium-chlorid – MeHgCl , CH_3HgCl) a fenylrtuť (fenylhydrargyrium-chlorid – PhHgCl – $\text{C}_6\text{H}_5\text{HgCl}$) a 2-sulfanylethanol (vše Sigma-Aldrich Chem. Comp., USA), octová kyselina, octan amonný, SnCl_2 , KBr , KBrO_3 , NaCl , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, HCl , HNO_3 , L-cystein, tetrabutylamonium-chlorid, tetraethylamonium-bromid, thiomocovina, kyselina sulfosalicylová (vše Pliva-Lachema, Brno, ČR) byly čistoty p.a. Methanol (čistoty pro HPLC) byl od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Pro validaci byly použity standardní referenční materiál DORM-2 (dogfish, Institut pro mezinárodní standardy, Kanada) s deklarovanými obsahy celkové rtuti (T-Hg) $4,64 \pm 0,26 \text{ mg kg}^{-1}$, MeHgCl (jako Hg) $= 4,47 \pm 0,32 \text{ mg kg}^{-1}$ a standardní referenční materiál CRM 580 (sediment, dodavatel 2-Theta ASE, Český Těšín, ČR) s deklarovanými obsahy celkové rtuti (T-Hg) $132 \pm 3 \text{ mg kg}^{-1}$ a MeHgCl

Tabulka I

Optimalizované experimentální podmínky HPLC, CV-AFS, CV-AAS a mikrovlnné extrakce

HPLC	
Kolona	Hypersil BDS C18, $2 \times 125 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$ (Hewlett Packard, Palo Alto, USA)
Mobilní fáze	7% (v/v) CH_3OH , 0,05% (v/v) 2-sulfanylethanol v acetátovém pufru pH 5, 100% MeOH od 15. minuty separace
Průtoková rychlost	$0,15 \text{ ml min}^{-1}$
Injektovaný objem	$100 \mu\text{l}$
Atomová fluorescenční spektrometrie s generací studených par (CV-AFS)	
Oxidační činidlo	$0,2 \text{ mol l}^{-1} \text{ KBr} + 0,04 \text{ mol l}^{-1} \text{ KBrO}_3$ v 5% HCl + 0,004% hydroxylamin-hydrochlorid, průtoková rychlost $2,5 \text{ ml min}^{-1}$
Redukční činidlo	2% SnCl_2 v 10% HCl , průtoková rychlost $2,5 \text{ ml min}^{-1}$
Mikrovlnná extrakce	
Doba extrakce	10 min
Teplota	55°C
Výkon	400 W
Extrakční činidlo	10 ml roztoku $6 \text{ mol l}^{-1} \text{ HCl} + 0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaCl}$
Atomová absorpční spektrometrie s generací studených par (AMA 254)	
Sušení	90 s při 120°C
Rozklad	180 s při 550°C
Vlnová délka	253,6 nm

(jako CH_3Hg^+) = $75,5 \pm 3,7 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Pro kalibraci byl použit základní standard o koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g l}^{-1}$ Hg v 2% HNO_3 (Český metrologický institut, Praha, ČR). Kalibrační roztoky pro stanovení celkové rtuti (T-Hg) byly připraveny v 0,1% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a 0,6% HNO_3 . Standardní roztok Hg^{2+} ($c = 1 \text{ mg l}^{-1}$) pro speciální analýzu byl připraven v 2% HCl. Standardní roztoky MeHgCl , PhHgCl a EtHgCl ($c = 1 \text{ mg l}^{-1}$) byly připraveny v methanolu. Všechny pracovní roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků deionizovanou vodou (Milli-Q RG, Millipore, Bedford, USA).

Pracovní postupy

Zpracování vzorků

Odebrané vzorky ryb z lokality Skalka u Chebu⁴ byly zmrazeny na -18°C a následně lyofilizovány při teplotě -52°C po dobu 48 h v lyofilizátoru Christ Alfa (B. Braun Biotech International, Švýcarsko). Homogenizace vzorků probíhala po dobu 30 s při 10 000 otáčkách/min v mlýnku Grindomix GM 200 (Retch GmbH & Co. KG, Německo).

Extrakce

Pro extrakci chemických forem rtuti z biologických materiálů byla používána ultrazvuková lázeň K5 (Kraintex, SR) nebo desetimístný vysokotlaký mikrovlnný extraktor Ethos SEL (Milestone, Itálie). Každá extrakční sada obsahovala 1 referenční materiál, 1 slepý pokus a 8 vzorků. Navážka vzorku (200–1000 mg, $\pm 0,1 \text{ mg}$) byla zvolena podle celkového obsahu rtuti ve vzorku souběžně stanoveného na přístroji AMA 254. Byla optimalizována doba extrakce, teplota a objem extrakčního činidla. Teplota byla kontrolována termočlánkem umístěným v první reakční nádobě. Po extrakci byly vzorky zfiltrány přes filtrační papír (No. 389, průměr 12,5 cm). Supernatant byl ředěn acetátovým pufrem na objem 25 nebo 50 ml podle obsahu rtuti ve vzorku. Optimalizované experimentální podmínky jsou shrnuty v tabulce I.

Zpracování výsledků

Kalibrační grafy a naměřené chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí chromatografického softwaru Clarity (verze 2.1, Data Apex, Praha, ČR). Rozlišení separovaných chemických forem rtuti (R_S) a kapacitní faktory (k) byly vypočítány na základě vztahů $R_S = 2(t_{R2} - t_{R1})/(w_1 + w_2)$ a $k = (t_R - t_0)/t_0$, kde t_0 je mrtvý retenční čas v min, t_R je retenční čas v min a w je šířka píku při základně v minutách pro obě komponenty. Dále byla data zpracována pomocí programu Microsoft Excel.

Správnost výsledků, tj. statistická významnost rozdílu průměru od skutečné hodnoty, byla testována za použití směrodatné odchylky průměru Studentovým testem t (cit.⁵). Shodnost výsledků získaných dvěma různými analytickými metodami, tj. statistická významnost rozdílu středních hodnot ($\mu_x - \mu_y$), byla rovněž testována Studentovým testem t . Test shody středních hodnot byl prováděn s testovacím kritériem T_1 i T_2 . Byla testována hypotéza H_0

($\mu_x = \mu_y$) proti alternativní hypotéze H_A ($\mu_x \neq \mu_y$). Při platnosti hypotézy H_0 má tato statistika Studentovo rozdělení s $v = n_1 + n_2 - 2$ stupni volnosti. Platí-li, že hodnota testovacího kritéria $T_{1(2)} > t_{1-\alpha/2}(v)$, je hypotéza H_0 o shodě středních hodnot na hladině významnosti μ zamítnuta. Testovací kritérium T_1 není robustní vůči heteroskedasticitě, tj. případu, kdy data jsou ve výběrech měřena s různou přesností. V této situaci je správnější využít testovacího kritéria T_2 , které je vůči heteroskedasticitě robustnější. V případě stejných rozsahů obou výběrů $n_1 = n_2 \geq 8$, lze použít testovací kritérium T_1 , i když hodnoty rozptylů nejsou shodné⁵.

$$T_1 = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{\sqrt{(n_1 - 1)s_x^2 + (n_2 - 1)s_y^2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} \quad (1)$$

$$T_2 = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{\sqrt{\frac{s_x^2}{n_1} + \frac{s_y^2}{n_2}}}$$

Mez detekce (LOD) je definována jako nejmenší koncentrace nebo množství analytu ve vzorku, které vyvolají signál rovný trojnásobku směrodatné odchylky signálu pozadí (slepého pokusu, tzv. 3.S/N kritérium).

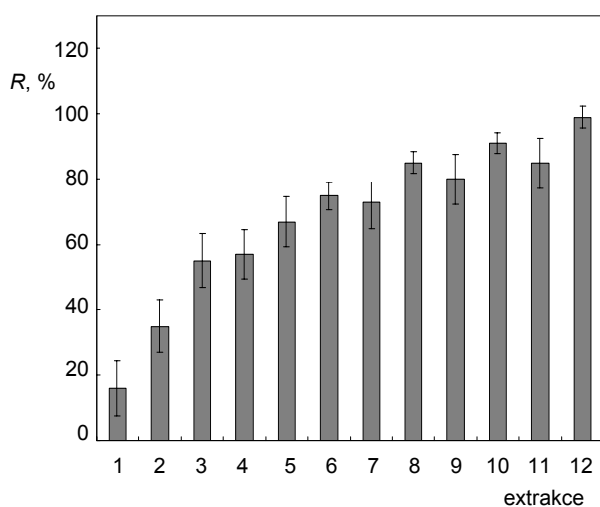
Výsledky a diskuse

Izolace chemických forem rtuti z biologických materiálů

Optimalizace extrakčního postupu se skládala z volby vhodného extrakčního činidla a podmínek extrakce (teplota, doba extrakce, množství extrakčního činidla). Nejvhodnější extrakční činidlo bylo vybráno na základě extrakčních výtěžků, reprodukovatelnosti extrakce a minimální vzájemné transformace jednotlivých chemických forem rtuti. Extrakční výtěžky byly vypočítány jako procentuální rozdíl mezi celkovým obsahem rtuti v tuhém vzorku a ve vzorku po extrakci. Měření bylo prováděno na přístroji AMA 254.

Ultrazvuková i mikrovlnná extrakce chemických forem rtuti byla prováděna v přítomnosti řady extrakčních činidel (kyselina thiooctová – TAA, octová, citronová, chlorovodíková, L-cystein, 2-sulfanylethanol, HCl + NaCl atd.). Extrakční účinnosti jednotlivých extrakčních činidel byly testovány standardním referenčním materiálem DORM-2. Vliv jednotlivých extrakčních činidel na extrakční výtěžky je znázorněn v obr. 2.

Nejvyšší extrakční výtěžky byly získány při použití směsných extrakčních činidel na bázi kyseliny chlorovodíkové – 6 mol l^{-1} HCl + 1 mol l^{-1} NaCl nebo 5,8% HCl + 5% thiooctová kyselina. Přítomnost kyseliny chlorovodíkové v extrakčním činidle výrazně zlepšuje extrakční výtěžky chemických forem rtuti. Zředěná kyselina chlorovodíková přítomná v extrakčním činidle umožňuje rychlé a dokonalé rozbití vazeb chemických forem rtuti s proteiny



Obr. 2. Vliv jednotlivých extrakčních činidel na extrakční výtěžky R; 1 – 0,05% cystein + 0,05% 2-sulfanylethanol – ultrazvuk, 2 – 5% kyselina citronová – ultrazvuk, 3 – 15% kyselina octová – ultrazvuk, 4 – 5% kyselina thiooctová – ultrazvuk, 5 – 15% HCl – ultrazvuk, 6 – 15% HCl – mikrovlny, 7 – 15% HCl + 1,5% cystein – ultrazvuk, 8 – 15% HCl + 1,5% cystein – mikrovlny, 9 – 15% kyselina thiooctová + 5,8% HCl – ultrazvuk, 10 – 5% kyselina thiooctová + 5,8% HCl – mikrovlny, 11 – 6M HCl + 1M NaCl – ultrazvuk, 12 – 6M HCl + 1M NaCl – mikrovlny

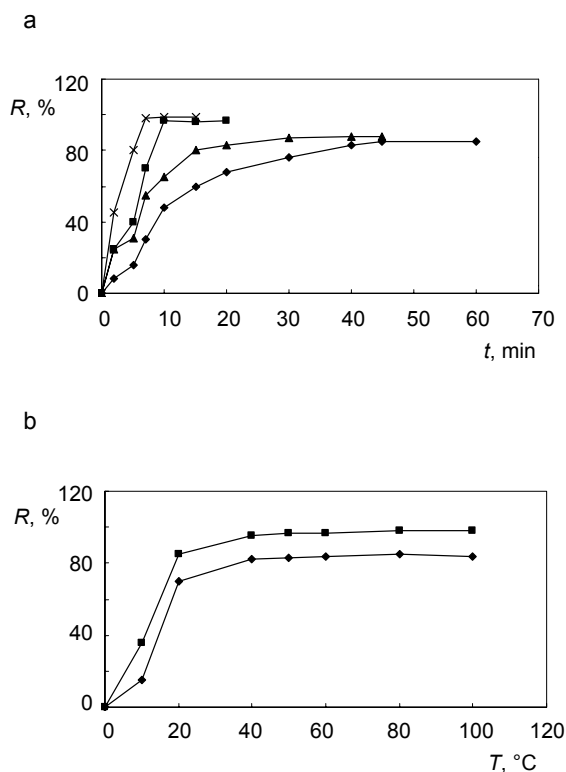
a zároveň při nízkých extrakčních teplotách nezpůsobuje žádné transformace chemických forem rtuti. Kyselina thiooctová negativně ovlivňuje analytický signál atomové fluorescenčního (AFS) detektoru zdvojením píku⁶. Jako nejvhodnější extrakční činidlo byla zvolena směs 6 mol l⁻¹ HCl a 0,1 mol l⁻¹ NaCl. Směs obsahující 6 mol l⁻¹ HCl a 1 mol l⁻¹ NaCl sice poskytovala asi o 2 % vyšší extrakční výtěžky, ale pro dávkování do chromatografického systému byl preferován menší obsah chloridů.

Stabilita chemických forem rtuti v tomto extrakčním činidle byla ověřena analýzou referenčních materiálů DORM-2 a CRM 580. Při ultrazvukové i mikrovlnné extrakci referenčních materiálů nedocházelo k žádným transformacím chemických forem rtuti.

Při ultrazvukové i mikrovlnné extrakci byl optimalizován extrakční čas, teplota a množství extrakčního činidla. Na základě výsledků (obr. 3a) byl stanoven optimální extrakční čas pro mikrovlnnou extrakci biologického materiálu na 10 min a pro extrakci v ultrazvukové lázni na 45 min. Při extrakci sedimentů byl optimální extrakční čas zkrácen při mikrovlnné extrakci na 7 min a při extrakci v ultrazvukové lázni na 30 min. Zkrácení extrakčního času u sedimentů je způsobeno slabšími vazbami chemických forem rtuti v sedimentech. Extrakční teplota v rozmezí 40 až 100 °C neměla významný vliv na extrakční výtěžky chemických forem rtuti (obr. 3b). Stejný efekt byl zaznamenán i Vázquezem⁷.

Vzhledem ke konstrukci vysokotlakého mikrovlnného extraktoru Ethos SEL nebylo možné extrakci provádět s méně než 10 ml extrakčního činidla. Větší objem extrakčního činidla neovlivňoval extrakční výtěžky rtuti, proto bylo používáno toto minimální množství i v dalších experimentech. Relativní směrodatná odchylka (RSD) mikrovlnné extrakce byla 3,3 %, RSD extrakce v ultrazvuku byla 7,5 %. Extrakční výtěžky mikrovlnné extrakce byly nejméně o 10 % vyšší než výtěžky extrakce prováděné v ultrazvukové lázni.

Mezi hlavní výhody mikrovlnné extrakce extrakčním činidlem na bázi kyseliny chlorovodíkové (6 mol l⁻¹ HCl + 0,1 mol l⁻¹ NaCl) patří krátký extrakční čas, možnost simultánní extrakce až 10 vzorků, extrakce bez použití organického rozpouštědla, stabilita extraktu v tmavě hnědých skleněných lahvích v lednici nejméně 30 dnů a především vyšší přesnost a správnost stanovení v porovnání s extrakcí v ultrazvukové lázni.



Obr. 3. Vliv doby extrakce (a) ($T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$), ♦ extrakce v ultrazvuku – biologický materiál, ■ mikrovlnná extrakce – biologický materiál, ▲ extrakce v ultrazvuku – sediment, × mikrovlnná extrakce; a extrakční teploty (b) ($t_{\text{mikrovl}} = 10\text{ min}$, $t_{\text{ultrazv}} = 45\text{ min}$) na extrakční výtěžek R rtuti při mikrovlnné extrakci i extrakci v ultrazvukové lázni, ♦ extrakce v ultrazvuku, ■ mikrovlnná extrakce (6 mol l⁻¹ HCl + 0,1 mol l⁻¹ NaCl (10 ml), DORM-2, CRM 580)

Stabilita vzorků a extraktů

Odebrané vzorky ryb byly ihned po odběru zmrazeny ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$). Vzorky byly uchovávány zatavené v polyethylenové folii a hermeticky uzavřené v plastické přepravce. Během sledované doby (6 měsíců) nedocházelo u testovaných biologických materiálů (svalovina, játra, žábry, ledviny, kůže, střevo) ke ztrátě rtuti ani k transformaci jejich jednotlivých chemických forem.

Transformace chemických forem rtuti (methylace Hg^{2+}) byla pozorována ve vzorcích sedimentů. Dlouhodobým skladováním vzorků sedimentů docházelo k mírnému vzrůstu obsahu MeHgCl , přičemž celkový obsah rtuti zůstal ve vzorku zachován. Stabilita odebíraných sedimentů byla prodlužována lyofilizací vzorku a následným uchováváním při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (obr. 4a). Stabilita referenčního materiálu je zajišťována ozářením sedimentu γ -zářením.

Stabilita extraktů byla sledována v rozmezí 2 měsíců. Přefiltrovaný extrakt ($6\text{ mol l}^{-1}\text{ HCl} + 0,1\text{ mol l}^{-1}\text{ NaCl}$) referenčního materiálu DORM-2 i CRM 580 zředěný na koncentraci $46,4\text{ }\mu\text{g l}^{-1}\text{ Hg}$ byl uchováván ve skleněných

vialkách z hnědého skla v ledničce. Extrakty referenčních materiálů DORM-2 i CRM 580 byly stabilní po dobu 30 dnů. Během této doby nebyly pozorovány žádné kvantitativní ani transformační změny stanovovaných chemických forem rtuti. Stabilita chemických forem rtuti byla prodlužována extrakčním činidlem ($\text{HCl} + \text{NaCl}$), které zajišťovalo vznik komplexů HgCl_4^{2-} a RHgCl_2^- . Dostatečná kyselost extraktu a jeho vhodné skladování snižovaly riziko adsorpce nebo degradace chemických forem rtuti na minimum. Po 30 dnech se postupně snižovala koncentrace jak celkové rtuti, tak i MeHgCl (obr. 4b). Byla také sledována stabilita difenylrtuti (Ph_2Hg). Ph_2Hg se v kyselém prostředí ihned rozkládala na PhHgCl . Pro stanovení R_2Hg by bylo zapotřebí provádět alkalickou hydrolyzu vzorku. Vzhledem k tomu, že sloučeniny R_2Hg se ve studovaných maticích i většině biologických materiálů nevyskytují, nebyla tato varianta dále ověřována.

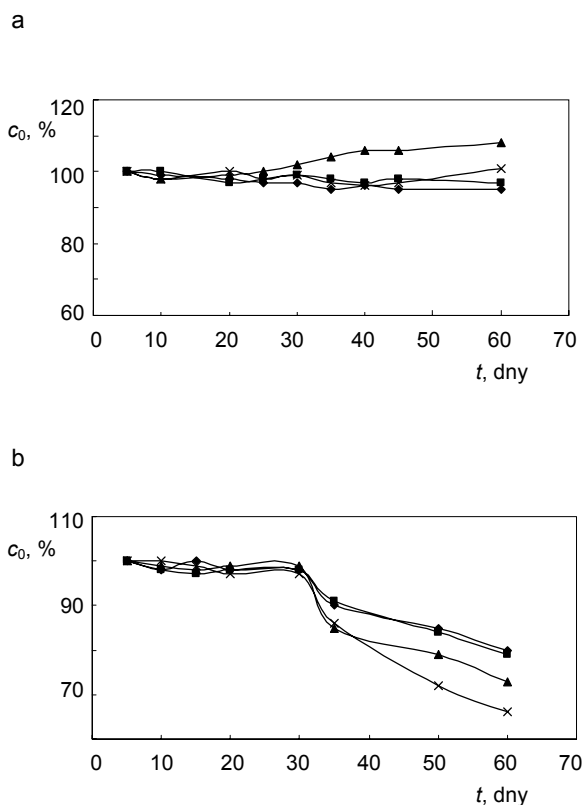
Separace chemických forem rtuti HPLC

Chromatografická separace chemických forem rtuti (MeHgCl , Hg^{2+} , EtHgCl , PhHgCl) byla prováděna na chromatografické koloně Hypersil BDS C18 s reverzní fází. Při optimalizaci separačních podmínek bylo sledováno složení mobilní fáze (vliv různých modifikátorů, pH), průtoková rychlost mobilní fáze a teplota separace. Detekce separovaných chemických forem rtuti byla prováděna atomovou fluorescenční spektrometrií metodou generování studených par rtuti (CV-AFS). Optimalizace experimentálních podmínek detekční metody je uvedena v dřívější práci⁶.

Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a modifikátorů (L-cystein, 2-sulfanylethanol, thiomocovina, kyselina sulfosalicylová, diethyldithiokarbamat sodný – DDTc) v acetátovém pufru (pH 5). Modifikátory vytvářejí stabilní komplexy se sloučeninami rtuti a pomáhají tak překonat významné rozdíly v chemických i fyzikálních vlastnostech jednotlivých chemických forem rtuti a tím umožňují stanovit diametrálně odlišné sloučeniny v jednom separačním stupni. Vliv jednotlivých modifikátorů na chromatografickou separaci Hg^{2+} a MeHgCl je znázorněn v tabulce II. Dále byla také testována separace chemických forem rtuti v přítomnosti tetrabutylamoniumchloridu nebo tetraethylamonium-bromidu v kombinaci s NaCl.

V přítomnosti L-cysteinu a thiomocoviny se nezadržovala v daném chromatografickém systému Hg^{2+} ani MeHgCl . Velmi silná retence chemických forem rtuti byla zaznamenána, pokud mobilní fáze obsahovala jako modifikátor diethyldithiokarbamat sodný nebo kyselinu sulfosalicylovou. Separace chemických forem rtuti v přítomnosti tetrabutylamoniumchloridu nebo tetraethylamoniumbromidu v kombinaci s NaCl byla výrazně omezoována nízkou citlivostí stanovení (pětkrát nižší než v přítomnosti modifikátorů obsahujících síru).

Pro chromatografickou separaci chemických forem rtuti byl jako nejvhodnější modifikátor zvolen 2-sulfanylethanol. Vzárovně koncentrace 2-sulfanylethanolu

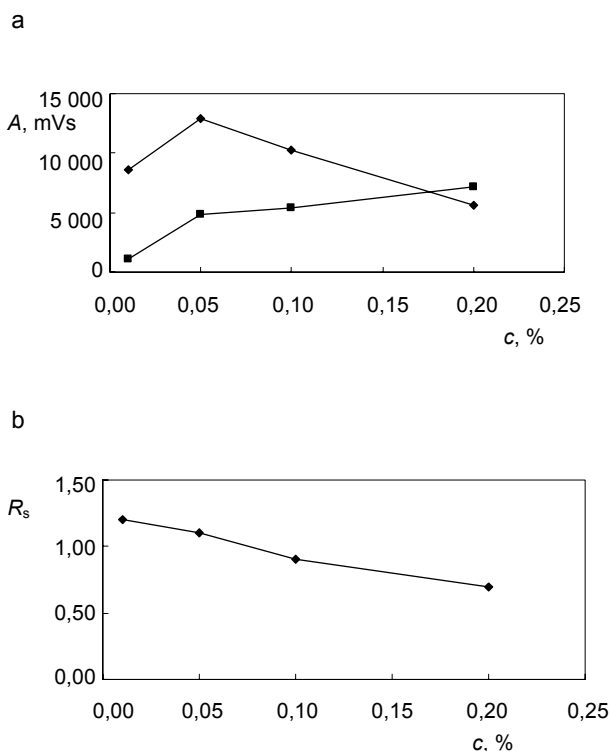


Obr. 4. Stabilita sedimentů (a) (celkový obsah (T-Hg) = $89\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$, $\text{MeHgCl} = 10\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$); $\blacklozenge$ T-Hg bez lyofilizace, $\blacksquare$ T-Hg s lyofilizací, $\blacktriangle$ MeHgCl bez lyofilizace, $\times$ MeHgCl s lyofilizací; a extraktů (b), $\blacklozenge$ DORM-2 (T-Hg), $\blacksquare$ DORM-2 (MeHgCl), $\blacktriangle$ CRM 580 (T-Hg), $\times$ CRM 580 (MeHgCl)

Tabulka II
Vliv modifikátorů na chromatografickou separaci Hg^{2+} a MeHgCl

Modifikátor	Retenční časy t_R [min]	Rozlišení R_s	Mobilní fáze
L-Cystein	MeHgCl 6,1 Hg^{2+} 5,7	0,0	7% MeOH + 0,05% L-cystein v acetátovém pufru
2-Sulfanylethanol	MeHgCl 13,6 Hg^{2+} 17,0	1,1	7% MeOH + 0,05% 2-sulfanylethanol v acetátovém pufru
Thiomočovina	MeHgCl 7,0 Hg^{2+} 7,6	0,0	7% MeOH + 0,05% thiomočovina v acetátovém pufru
Diethyldithiokarbamat sodný	MeHgCl 7,3 Hg^{2+} 15,0	0,8	80% MeOH + 0,05% diethyldithiokarbamat sodný v acetátovém pufru
Sulfosalicylová kyselina	MeHgCl 7,3 Hg^{2+} 24,0	1,1	80% MeOH + 0,05% sulfosalicylová kyselina v acetátovém pufru

ovlivňovala citlivost stanovení MeHgCl i Hg^{2+} , ale neměla vliv na stanovení EtHgCl ani PhHgCl . Citlivost stanovení MeHgCl vzrostla čtyřikrát a Hg^{2+} jeden a půlkrát

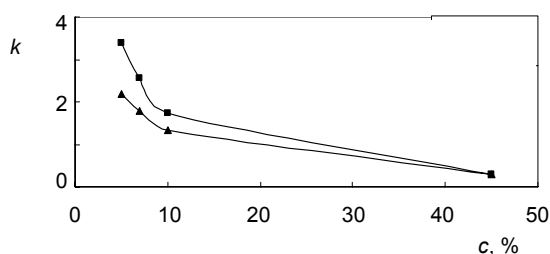


Obr. 5. Závislost analytického signálu (plochy píku) na koncentraci 2-sulfanylethanolu (a) a vliv koncentrace 2-sulfanylethanolu [%] na rozlišení MeHgCl a Hg^{2+} (b), ♦ anorg. Hg, ■ MeHgCl ($c = 10 \mu\text{g l}^{-1}$ (MeHgCl , Hg^{2+}), průtok $0,15 \text{ ml min}^{-1}$, m.f. 7% methanol + 2-sulfanylethanol v acetátovém pufru)

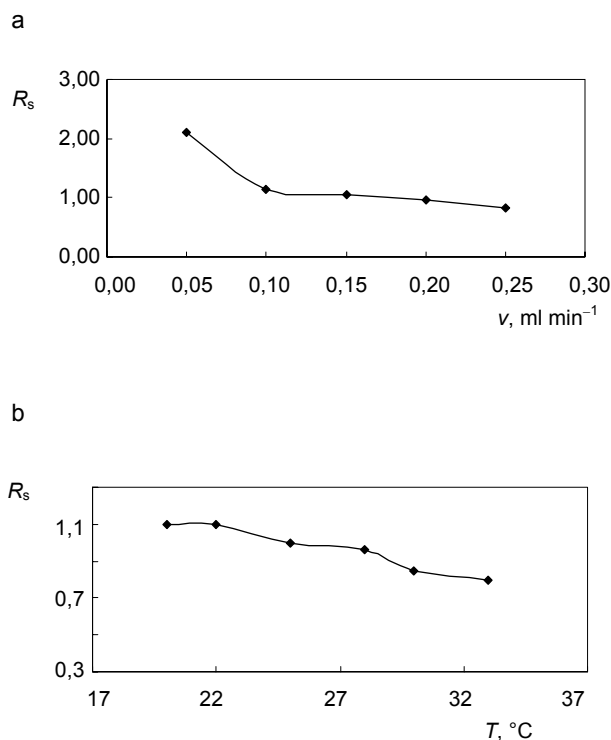
v prostředí 0,05% 2-sulfanylethanolu v porovnání s 0,01% 2-sulfanylethanolem (obr. 5a). Vzrůstající koncentrace 2-sulfanylethanolu způsobovala také pokles rozlišení (R_s) MeHgCl a Hg^{2+} (obr. 5b). Pro chromatografickou separaci byla zvolena mobilní fáze obsahující 0,05% 2-sulfanylethanol.

Koncentrace methanolu v mobilní fázi byla měněna v rozmezí 5–45 %. Nejlepší účinnosti separace MeHgCl a Hg^{2+} bylo dosaženo, pokud mobilní fáze obsahovala 5 až 7 % MeOH (obr. 6). Vzhledem k silně nepolárnímu charakteru mají EtHgCl a PhHgCl v daném chromatografickém systému velmi dlouhé retenční časy (delší než 60 min). Stanovení EtHgCl a PhHgCl v rozumném retenčním čase je umožněno skokovým vzrůstem koncentrace methanolu v mobilní fázi na 100 % od 15. minuty separace. Acidita mobilní fáze (pH nastaveno kyselinou octovou a octanem amonným) neměla v rozmezí pH od 2,8 do 5,9 vliv na účinnost separace chemických forem rtuti.

Změna průtokové rychlosti mobilní fáze ovlivňovala rozlišení (R_s) MeHgCl a Hg^{2+} . S rostoucí průtokovou rychlostí klesalo rozlišení těchto dvou chemických forem rtuti; při průtokové rychlosti $0,25 \text{ ml min}^{-1}$ již bylo nižší než 1,0. Rozlišení dvojic Hg^{2+} – EtHgCl a EtHgCl – PhHgCl



Obr. 6. Závislost kapacitního faktoru MeHgCl a Hg^{2+} ($30 \mu\text{g l}^{-1}$) na obsahu methanolu [%] v mobilní fázi (methanol + 0,05 % 2-sulfanylethanol v acetátovém pufru, průtok $0,15 \text{ ml min}^{-1}$)



Obr. 7. Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze (a) a její teploty (b) na rozlišení MeHgCl a Hg^{2+} ($30 \mu g l^{-1} Hg$, 7 % methanol + 0,05 % 2-sulfanylethanol v acetátovém pufru)

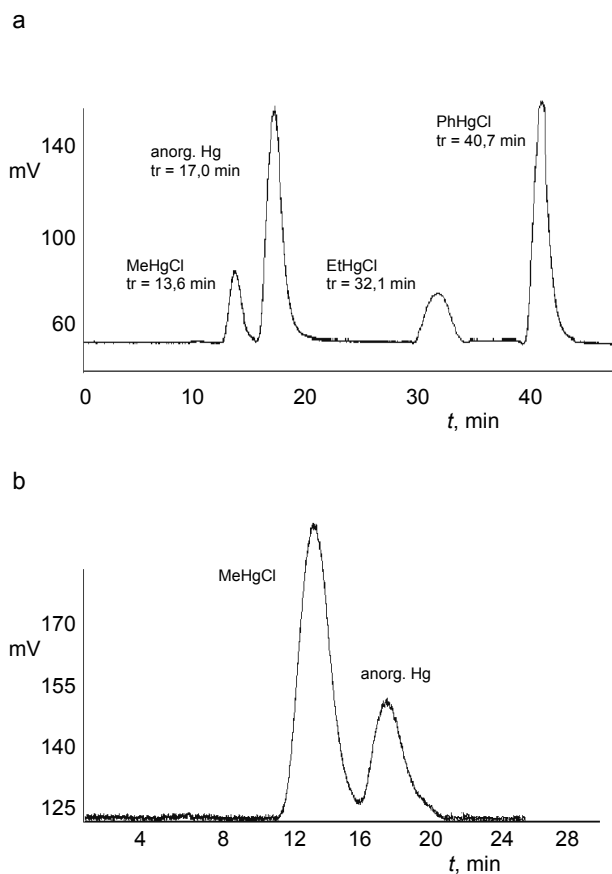
nebylo změnou průtokové rychlosti mobilní fáze významněji ovlivňováno. Pro vlastní chromatografickou separaci byla zvolena průtoková rychlost $0,15 \text{ ml min}^{-1}$ (obr. 7a) Vzrůstající teplota separace ovlivňovala rozlišení (R_s) MeHgCl a Hg^{2+} . S rostoucí teplotou docházelo k nevýraznému poklesu rozlišení těchto dvou chemických forem rtuti (obr. 7b).

HPLC/CV-AFS systém byl pravidelně kalibrován standardními roztoky obsahujícími 1, 5, 10, 15, 30 a $60 \mu g l^{-1}$ jednotlivých chemických forem rtuti. Kalibrační roztoky byly připravovány denně v prostředí $1,2 \text{ mol l}^{-1} HCl$, $0,02 \text{ mol l}^{-1} NaCl$ a acetátového pufru (pH 5). Kalibrační křivky byly ve sledovaném koncentračním rozsahu pro všechny stanovené chemické formy rtuti lineární ($r > 0,9998$). Vzorové chromatogramy standardů všech čtyř separovaných chemických forem rtuti a referenčního materiálu DORM-2 jsou uvedeny na obr. 8a,b. Retenční časy separovaných chemických forem rtuti byly 13,6 min pro MeHgCl, 17,0 min pro Hg^{2+} , 32,1 min pro EtHgCl a 40,7 min pro PhHgCl. Mrtvý retenční čas byl 5 min.

Správnost stanovení MeHgCl byla kontrolována analýzou standardního referenčního materiálu svaloviny máčky skvrnitě DORM-2 s obsahem MeHgCl (jako Hg) = $4,47 \pm 0,32 \text{ mg kg}^{-1}$ a analýzou standardního referenčního materiálu sedimentu CRM 580 s obsahem MeHgCl (jako

CH_3Hg^+) = $75,5 \pm 3,7 \mu g kg^{-1}$. V referenčním materiálu DORM-2 bylo stanoveno $4,38 \pm 0,16 \text{ mg kg}^{-1}$ MeHgCl (jako Hg) a v referenčním materiálu CRM 580 bylo stanoveno $75,1 \pm 1,9 \mu g kg^{-1}$ MeHgCl (jako CH_3Hg^+). Na základě testu správnosti s použitím vysoce spolehlivého referenčního materiálu bylo zjištěno, že stanovená hodnota je shodná s hodnotou certifikovanou a metoda tedy poskytuje správné výsledky (DORM-2: $t = 1,39$; $t_{krit} = 2,26$, CRM 580: $t = 0,49$; $t_{krit} = 2,26$). Správnost stanovení ostatních chemických forem rtuti nemohla být určena z důvodu nedostupnosti referenčních materiálů.

Meze detekce (při navázce $1000 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ a desetinasobném ředění, 3.S/N kritérium) a RSD uvedené v závorkách (při $5 \mu g l^{-1}$, $n = 10$) pro jednotlivé chemické formy rtuti dosahovaly $0,20 \mu g kg^{-1}$ (3,0 %) pro MeHgCl, $0,07 \mu g kg^{-1}$ (5,3 %) pro Hg^{2+} , $0,06 \mu g kg^{-1}$ (3,4 %) pro PhHgCl a $0,12 \mu g kg^{-1}$ (4,4 %) pro EtHgCl.



Obr. 8. Chromatogram standardů – MeHgCl, Hg^{2+} , EtHgCl, PhHgCl (a) a referenčního materiálu DORM-2 (b) ($30 \mu g l^{-1}$ v prostředí $1,2 \text{ mol l}^{-1} HCl$, $0,02 \text{ mol l}^{-1} NaCl$ a acetátového pufru) při stanovení HPLC-CV-AFS

Porovnání HPLC-CV-AFS a GC-ECD při stanovení MeHgCl

K porovnání HPLC-CV-AFS s GC-ECD (cit.⁸) byly vybrány vzorky rybí svaloviny (tabulka III). Stanovení chemických forem rtuti HPLC/CV-AFS bylo prováděno při optimalizovaných parametrech stanovení zaznamenaných v tabulce I. Obsah celkové rtuti (T-Hg) byl stanoven jako součet všech chemických forem rtuti a ověřen analýzou na AMA 254. Každý vzorek byl měřen čtyřikrát.

Test shody středních hodnot byl prováděn s testovacím kritériem T_1 i T_2 . Na základě testování hypotézy o rozdílu mezi středními hodnotami dvou souborů dat bylo zjištěno, že obě testované metody poskytují shodné výsledky při stanovení celkové rtuti i MeHgCl.

Přestože obě metody poskytovaly shodné výsledky, jako výhodnější se jevílo stanovení chemických forem rtuti HPLC/CV-AFS, která poskytovala větší přesnost stanovení (GC-ECD: 10 %, HPLC/CV-AFS: 6 %), lepší mez detekce (GC-ECD: 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, HPLC/CV-AFS: 0,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$) a mnohem větší selektivitu stanovení chemických forem rtuti.

Analýza reálných vzorků

Navržená a optimalizovaná metoda stanovení byla použita pro analýzu jednotlivých forem rtuti (MeHgCl, Hg^{2+} , EtHgCl, PhHgCl) ve svalovině ryb odlovených v lokalitě Skalka u Chebu. Obsah celkové rtuti (T-Hg) byl stanoven jako součet všech chemických forem rtuti a ověřen analýzou na AMA 254. Každý vzorek byl měřen čtyřikrát. V analyzovaných vzorcích rybí svaloviny se obsahy celkové rtuti (T-Hg) pohybovaly v rozmezí 2,5–9,7 mg kg^{-1} v sušině a procentuální obsahy MeHgCl mezi 90–99 % (tabulka III).

Tabulka III

Srovnání koncentrací celkové rtuti (T-Hg) a methylhydrargyrium-chloridu (MeHgCl) ve vybraných druzích ryb (mg kg^{-1} v sušině, v závorkách jsou uvedeny RSD pro $n=5-8$) stanovených HPLC/CV-AFS a GC-ECD technikami

Vzorek	Koncentrace ^a [mg kg^{-1}]					
	HPLC/CV-AFS		GC-ECD		Rozdíly	
	T-Hg	MeHgCl	T-Hg	MeHgCl	T-Hg	MeHgCl
Cejn velký (<i>Abramis brama</i>)	2,55 (2,0)	2,49 (4,5)	2,53	2,47	0,02	0,02
Bolen dravý (<i>Aspius aspius</i>) ^b	9,65 (1,6)	9,55 (3,8)	9,68	9,52	–0,03	0,03
Bolen dravý (<i>Aspius aspius</i>) ^b	9,56 (1,6)	9,50 (4,0)	9,51	10,09	0,05	–0,59
Bolen dravý (<i>Aspius aspius</i>) ^b	9,62 (1,6)	8,70 (4,2)	9,70	8,82	–0,08	–0,12
Sumec velký (<i>Silurus glanis</i>)	4,68 (1,8)	4,58 (4,6)	4,61	4,94	0,07	–0,36

^a Testy shody středních hodnot („testy shodnosti“) HPLC/CV-AFS vs. GC-ECD pro celkovou rtuť – T-Hg ($T_1 - T_2 = 0,003$, $t_{\text{krit}} = 2,31$) a MeHgCl ($T_1 - T_2 = 0,11$, $t_{\text{krit}} = 2,31$) – střední hodnoty se shodují; ^b vzorky odebrány ve třech lokalitách

Závěr

Byla vypracována metoda pro vysoce citlivé, selektivní, správné a přesné stanovení jednotlivých chemických forem (specií) rtuti (anorganické rtuti – Hg^{2+} , methylhydrargyrium-chloridu (MeHgCl), ethylhydrargyrium-chloridu (EtHgCl) a fenyhydrargyrium-chloridu – (PhHgCl)) vysoce účinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s atomovou fluorescenční spektrometrií (HPLC/CV-AFS). Pro separaci chemických forem rtuti byla používána reverzní chromatografická stacionární fáze Hypersil BDS C18 a isokratická eluce mobilní fází obsahující 7 % methanolu a 0,05 % 2-sulfanylethanolu v acátovém pufru (pH 5) při průtokové rychlosti 0,15 ml min^{-1} . Extrakce chemických forem rtuti byla prováděna extrakčním činidlem obsahujícím 6 mol l^{-1} HCl + 0,1 mol l^{-1} NaCl v mikrovlnném extraktoru (10 ml extrakčního činidla, 10 min, 55 °C, 400 W). Kalibrační křivky vykazovaly vysokou linearitu ($r > 0,9998$) v koncentračním rozmezí 1–60 $\mu\text{g l}^{-1}$. Meze detekce (3 S/N, při navážce 1000 $\text{mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ a desetinásobném ředění) a RSD hodnoty uvedené v závorkách (při 5 $\mu\text{g l}^{-1}$, $n = 10$) byly 0,20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (3,0 %) pro MeHgCl, 0,07 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (5,3 %) pro Hg^{2+} , 0,06 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (3,4 %) pro PhHgCl a 0,12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (4,4 %) pro EtHgCl. Stabilita odebíraných vzorků byla prodloužena na 2 měsíce lyofilizací vzorku a následným uchováním při –18 °C. Extrakty vzorků byly stabilní po dobu 30 dnů.

Oproti metodě navržené Ramalhozem⁹, umožňuje námi navržená metoda stanovit ve vzorku současně také sloučeniny EtHgCl a PhHgCl, snižuje retenční časy MeHgCl a Hg^{2+} a velmi zjednodušuje a urychluje extrakční postup.

Tato práce byla financována z prostředků Grantové agentury ČR, projekt č. 525/03/1367 a 525/06/P143.

LITERATURA

1. Segade S. R., Tyson J. F.: Spectrochim. Acta, Part B 58, 797 (2003).
2. Ubillús F., Alegria A., Barberá R., Farré R., Lagarda M. J.: Food Chem. 71, 529 (2000).
3. Quevauviller P., Filippelli M., Horvat M.: Trends Anal. Chem. 19, 157 (2000).
4. Houserová P., Janák K., Kubáň P., Pavlíčková J., Kubáň V.: Chem. Listy 100, 862 (2006).
5. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. East Publishing, Praha 1998.
6. Houserová P., Hedbávný J., Matějček D., Kráčmar S., Šitko J., Kubáň V.: Vet. Med. Czech 50, 61 (2005).
7. Vázquez M. J., Abuín M., Carro A. M., Lorenzo R. A., Cela R.: Chemosphere 39, 1211 (1999).
8. Maršálek P., Svobodová Z., Randák T., Švehla J.: Acta Vet. Brno 74, 427 (2005).
9. Ramalhosa E., Río Segade S., Pereira E., Vale C., Duarte A.: Anal. Chim. Acta 448, 135 (2001).

P. Houserová^a, D. Matějček^a, V. Kubáň^a, J. Pavlíčková^a, and J. Komárek^b (^a Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno, ^b Department of Analytical Chemistry, Masaryk University, Brno, Czech Republic): **Determination of Chemical Forms of Mercury Using High Performance Liquid Chromatography with Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectrometric Detection (HPLC/CV-AFS)**

Sonication and microwave-assisted extractions with thioacetic acid, citric acid, cysteine, 2-sulfanylethanol, aqueous HCl, and aqueous HCl – NaCl were tested for isolation of mercury species. A mixture of 6M HCl and 0.1M NaCl was selected as the most suitable extraction agent. The extraction efficiency was about 10 % higher and RSDs were below 3.3 % when microwave-assisted extraction was used instead of sonication. The HPLC/CV-AFS method was optimized and used for separation and determination of inorganic mercury and methyl-, ethyl- and phenylmercury chloride. Isocratic elution with a mixture containing 0.05 % of 2-sulfanylethanol, acetate buffer (pH 5) and 7 % of methanol, with methanol content increasing up to 100 % MeOH, was used for separation of mercury species on a reverse phase Hypersil BDS C18 column. The limits of detection of the HPLC/CV-AFS system were estimated (in $\mu\text{g kg}^{-1}$): 0.20 (MeHgCl), 0.07 (Hg^{2+}), 0.06 (PhHgCl) and 0.12 (EtHgCl). The concentrations (2.5–9.7 mg kg^{-1} in dry matter) of total mercury and methylmercury chloride in selected fish obtained by HPLC/CV-AFS were in good agreement (but more accurate) with GC-ECD. The RSDs 3.1–8.2 % and 4.1–9.0 % of the analytical procedures for the determination of total mercury (cold vapour AAS) and methylmercury chloride (HPLC/CV-AFS) were determined, respectively.