

ŠPECIÁCIA A STANOVENIE ORTUTI METÓDAMI VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE

RADOSLAV HALKO a MILAN HUTTA

Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina CH–2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: halko@fns.uniba.sk, hutta@fns.uniba.sk

Došlo dne 14.VI.1999

Kľúčové slová: HPLC, ortuť, špeciácia

Obsah

1. Úvod
2. Stanovenie ortuti a jej zlúčenín metódami HPLC
 - 2.1. HPLC na reverzných fázach
 - 2.2. Chromatografická separácia iónových párov
 - 2.3. Ionexová chromatografia
 - 2.4. Micelárna kvapalinová chromatografia
3. Záver

1. Úvod

Reálne ohrozenie veľkých skupín populácie pri stále širšom používaní ťažkých kovov v priemysle a v poľnohospodárstve obrátilo pozornosť na štúdium výskytu ťažkých kovov v životnom prostredí. Medzi tieto kovy patrí aj ortuť. Do životného prostredia môže ortuť vstupovať vo forme pár kovo-vej ortuti, po transformácii prchavých organických zlúčenín ortuti alebo dobre rozpustných anorganických zlúčenín ortuti. Tvorba alkyl-zlúčenín z elementárnej ortuti a anorganických zlúčenín ortuti vo vodách morí a jazier je základným článkom celého reťazca premien ortuti v prírode.

V minulosti environmentalisti a toxikológovia často nerozlišovali rozdielne chemické formy prvkov v látkach, hoci majú rozdielne environmentálne správanie sa. Tiež je veľmi rozdielny ich metabolizmus, účinky na živé organizmy a toxicita. Vzhľadom na uvedené skutočnosti je v súčasnosti nevyhnutné a stále aktuálne poznať okrem celkového obsahu ortuti vo vzorke aj jednotlivé formy látok v ktorých sa ortuť nachádza. Preto sa do analytickej praxe zaviedol pojem špeciácia. Špeciácia nie je presne definovaná a autori si ju vysvetľujú rôzne. Ure^{1,2} definuje špeciáciu ako (a) proces identifikácie a kvantifikácie rozdielnych, definovaných špecií, foriem a fáz prítomných v látke; resp. (b) popísanie množstva a druhov prítomných látok – špecií, foriem alebo fáz. Špecie, formy a fázy sú definované (i) funkčne, (ii) operačne, alebo (iii) ako jednotlivé chemické indivíduá. Florence³ špeciáciu analyzuje ako stanovenie koncentrácie jednotlivých fyzikálno-chemických foriem prvku, ktorých súčet tvorí celkovú koncentráciu prvku vo vzorke. Z analytickeho hľadiska sú

environmentálne zaujímavé zlúčeniny ortuti a elementárna ortuť prevažne definované nasledovne⁴: Hg^0 ; Hg_2^{2+} ; Hg^{2+} ; CH_3-Hg-X ; $CH_3-Hg-CH_3$ a iné.

Na špeciáciu týchto látok sa používa viacero analytických metód. Jednou z týchto metód je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC). Pre nízke koncentračné úrovne obsahu ortuti vo vzorkách životného prostredia ($\mu g.l^{-1}$) je potrebná jej vhodná izolácia pred separáciou a spojenie chromatografickej metódy s citlivými detekčnými systémami.

2. Stanovenie ortuti a jej zlúčenín metódou HPLC

Podľa spôsobu separácie môžeme HPLC metódy rozdeliť do týchto skupín:

- HPLC na reverzných fázach,
- chromatografická separácia iónových párov,
- ionexová chromatografia,
- micelárna kvapalinová chromatografia.

Krátke charakteristiky týchto metód sú uvedené v tabuľke I.

Pre stanovenie ortuti a jej zlúčenín v životnom prostredí je obvyčajne potrebná jej izolácia. Ortuť a jej organické formy sa silne viažu s tio-, amino- a karboxy-skupinami. Tieto komplexotvorné skupiny sa často nachádzajú v prírodných matriciach (sediment, biologické tkanivá, krv, moč a pod.). Na rozbitie väzieb, ktorými sa ortuť viaže v matriciach, boli úspešne vyskúšané halogénovodíkové kyseliny. Jeden z prvých štandardných postupov na izoláciu CH_3Hg^+ z prírodných matric publikoval v roku 1969 vo svojich prácach Westö^{5,6}. S rôznymi obmenami^{4,7-14} sa tento postup úspešne používa už 30 rokov na stanovenie CH_3Hg^+ (aj iných organických zlúčenín ortuti) v životnom prostredí. Spoločnou črtou všetkých postupov odvodených od postupu Westö je využívanie halogénovodíkových kyselín HX (HCl, HBr, HI), extrakcia CH_3HgX kovalentnej zlúčeniny do nepolárneho rozpúšťadla (benzén, toulén a iné) a reextrakcia častice CH_3Hg^+ do vodných roztokov anorganických a organických síru obsahujúcich zlúčenín. Hlavné modifikácie postupu podľa Westö v kombinácii s HPLC analýzou sa sústreďujú na:

- vynechanie kroku reextrakcie do benzénu,
- nahrádzanie klasickej extrakcie kvapalina–kvapalina inými alternatívami extrakcie
- variácie v zložení roztoku halogénovodíkových kyselín,
- variácie v zložení vodnej reextrakčnej fázy.

2.1. HPLC na reverzných fázach

Stanovenie zlúčenín ortuti kvapalinovou chromatografiou s normálnym usporiadaním fáz¹⁵, bolo postupne vytlačené populárnejšou vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou na reverzných fázach (RP HPLC). Ako mobilné fázy sa bežne používajú zmesi polárnych hydroorganických rozpúšťadiel s vodou (metanol–voda resp. acetonitril–voda)^{16,70}. Problémy pri separácii iónových a nízkomolekulových nepolárnych zlúčenín (napr. CH_3HgCl), ktoré slabo interagujú so stacionárnou

Tabuľka I
Špeciácia ortuti HPLC metódami

Stacionárna fáza	Mobilná fáza	Stanovované formy	Matrica a úprava vzorky	Detekcia a medza stanovenia	Lit.
<i>HPLC na reverzných fázach</i>					
RP Altex Spherisorb ODS (250×4,6 mm, 5 μm)	CH ₃ OH-H ₂ O (40:60), 0,01 % 2-sulfanyletanol, 0,06 mol.l ⁻¹ octan amónny (pH 5,5)	C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺	morské ryby, extrakcia	DPV 40 pg	19
RP C18 LiChrosorb ODS (250×4 mm, 5 μm)	CH ₃ OH-H ₂ O (60:40), 0,01 % 2-sulfanyletanol, pH 5,5 (octan amónny)	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺	–	amperometrická (Ag-AgCl, elektróda) 0,8–1,9 μg.l ⁻¹	21
RP Zorbax ODS (250×4,6 mm, 5 μm)	CH ₃ OH-0,06 mol.l ⁻¹ octan amónny (3:2), 0,01 % 2-sulfanyletanol (pH 5,7)	C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺	ryby, extrakcia	AAS resp. DVP 0,6 ng	8 9
RP C8 Lichrosorb (10 μm)	CH ₃ OH-H ₂ O (6:94), 25 mg.l ⁻¹ 2-sulfanyletanol	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺ , n-C ₃ H ₇ Hg ⁺	–	GF AAS (monitorovanie UV 254 nm)	18
RP C18 Waters Resolve (150×3,9 mm, 5 μm)	gradient A = 0,05 % 2-sulfanyletanol, 0,06 mol.l ⁻¹ octan amónny (pH 5,7), B = A + 75 % ACN, od B = 20 % do B = 100 %	C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , Hg ²⁺ , (CH ₃) ₂ Hg	–	ICP-AES 32–62 μg.l ⁻¹	25
RP-6 Prepacked (250×4,6 mm, 5 mm)	CH ₃ OH-H ₂ O (60:40), 0,01 % 2-sulfanyletanol	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺	–	MIP 75 ng	20
RP C18 Waters PicoTag	3 % ACN, 0,05 % 2-sulfanyletanol, 0,06 mol.l ⁻¹ octan amónny (pH 5,3–6,8)	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , thimerosal	ryby, čistiaci roztok kontaktných šošoviek, voda	ICP-MS 0,6–1,2 ng.ml ⁻¹	12
RP C18 Vydac 201 TP (250×4,6 mm, 10 μm)	3 % CH ₃ OH, 1,5 % ACN, 0,05 % 2-sulfanyletanol, 0,06 mol.l ⁻¹ octan amónny (pH 6,8)	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺	ryby, voda, čistiaci roztok kontaktných šošoviek	ICP-MS 70–160 pg	13
RP C18 Spherisorb ODS 2 (150×3,2 mm, 5 μm)	1 % ACN, 0,005 % 2-sulfanyletanol, 0,06 mol.l ⁻¹ octan amónny	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺	morská voda off-line prekoncentrácia (ditiokarbamátom)	ICP-MS 16–17 ng.l ⁻¹	27
RP C18 Shim-pack CLC-ODS (150×6 mm)	CH ₃ OH-octan amónny (40:60), 0,02 % 2-sulfanyletanol (pH 5)	C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺	prirodná voda, biologické vzorky	AFS 5–7 ng	23
RP C18 Chromsper (200×3 mm, 3 μm)	gradient A = 30 % CH ₃ OH, 0,05 mol.l ⁻¹ octan amónny (pH 5), 0,1 mmol.l ⁻¹ 2-sulfanyletanol, B = 50 % CH ₃ OH, 0,1 mmol.l ⁻¹ 2-sulfanyletanol, 0,02 mmol.l ⁻¹ octan amónny (pH 5), od A = 100 % 5 min., lineárne zmena na A = 50 % a B = 50 % v rozsahu 1 min.	CH ₃ Hg ⁺ , CH ₃ OC ₂ H ₄ Hg ⁺ , COOHCH ₂ H ₄ Hg ⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺ , C ₂ H ₅ OC ₂ H ₄ Hg ⁺ , OHCH ₂ NO ₂ C ₆ H ₂ Hg ⁺ , CH ₃ C ₆ H ₄ Hg ⁺ , Hg ²⁺ , mersalylic acid	pôda a sedimenty	UV 230 nm 7–95,1 mg.l ⁻¹ AFS	22 10 11 24
RP C18 μBondapak (300×6,4 mm resp. 300×3,9 mm, 10 μm)	65–85 % CH ₃ OH-H ₂ O resp. 55–85 % ACN-H ₂ O, 0,1 mmol.l ⁻¹ EDTA	Hg ²⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺	–	UV 258 nm –	45
	CH ₃ OH-H ₂ O (78:22), 0,1 mmol.l ⁻¹ EDTA	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺	–	UV 254 nm 8,8–10,8 ng	35
RP C18 LiChrospher (150×3 mm, 5 μm)	0,5 mmol.l ⁻¹ 2-sulfanyletanol, 20 % CH ₃ OH, octan amónny (pH 5,5)	Hg ²⁺ , CH ₃ Hg ⁺	sediment, extrakcia	UV 230 nm –	7

Tabuľka I – pokračovanie

Stacionárna fáza	Mobilná fáza	Stanovované formy	Matrica a úprava vzorky	Detekcia a medza stanovenia	Lit.
PLRP-S polystyrén-DVB (150×4,6 mm, 5 µm)	CH ₃ OH-ACN-H ₂ O (59:39:0,5), 50 µmol.l ⁻¹ NaDDC	Hg ²⁺ , CH ₃ Hg ⁺	–	UV 254 nm 3–20 ng	14
RP C18 Spherisorb (Tracer) (150×4,6 mm, 5 µm)	CH ₃ OH-H ₂ O (75:25), 0,05 mol.l ⁻¹ KNO ₃ resp. 0,02 mol.l ⁻¹ KNO ₃	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺	prírodná voda	amperometrická resp. coulometrická 0,16–2,8 ng	34
RP C18 Nova-pak (150×3,9 mm, 4 µm) resp. RP C18 Spherisorb ODS-2 (150×4,6 mm, 3 µm)	CH ₃ OH-H ₂ O (82:12), 50–100 mmol.l ⁻¹ EDTA, 20 mmol.l ⁻¹ DDC resp. CH ₃ OH- -ACN-H ₂ O (71:8:21), 100 mmol.l ⁻¹ EDTA	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺	–	UV 254 nm 0,15–0,5 ng	37
RP C18 LiChrosper 100 (250×4 mm, 5 µm)	ACN:H ₂ O (58:42), 0,5 mmol.l ⁻¹ APDC, pH 5,5 (H ₃ COOH, NaOH)	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺	voda a odpadová voda on-line pre- koncentrácia (LichroCART 100 RP-100) ryby a huby, extrakcia (tiomočovinou)	CV AAS 0,15–5 ng.l ⁻¹	39 38
RP C18 Hypersil-ODS (80×4,6 mm, 3 µm)	ACN-H ₂ O (65:35), 0,5 mmol.l ⁻¹ NaPDC, pH 5–6,5 (octan amónny)	Hg ²⁺ , CH ₃ Hg ⁺	vlasý	CV AAS (HPLC-UV- -PCO-CVAAS) 4 ng.kg ⁻¹	40
RP C18 Chromosphere- -ODS (30×4 mm, 5 µm)		Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺	–	CV AAS 80 pg	41
RP C18 Hypersil-ODS (80×4,6 mm, 3 µm)	ACN-H ₂ O (65:35), 0,5 mmol.l ⁻¹ NaPDC, pH 5–6,5 (octan amónny)	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ OC ₂ H ₄ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ OC ₂ H ₄ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺	prírodná voda on-line prekoncentrácia (RP C18 Hypersil ODS)	CV AAS 5 ng.l ⁻¹	42
RP C18 Hypersil-ODS (60×4,6 mm, 3 µm)		CH ₃ Hg ⁺	sedimenty a rybie tkanivo, destilácia	CV AAS 40 pg	43
RP C18 Hypersil-ODS (80×4,6 mm, 3 µm)		Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺ mersalylic acid	sedimenty a biologické tkanivá, destilácia	ICP-MS (HPLC- -HPF/HHPN- -ICP-MS) 10–20 pg	44
RP C18 Spherisorb ODS-2 (150×4,6 mm, 3 µm)	THF-CH ₃ OH (2:1), 50 mmol.l ⁻¹ EDTA, 0,05 mol.l ⁻¹ octánový pufor (pH 4)	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺	odpadová voda, kečup, ľudský moč	UV-VIS 475 nm 0,3–0,4 ng	47
RP C18 µBondapak (300×3,9 mm, 10 µm) a RP C18 Nucleosil (150×4,6 mm, 5 µm)	CH ₃ OH-0,05 mol.l ⁻¹ NaCl (70:30) resp. CH ₃ OH-ACN-5 mmol.l ⁻¹ KH ₂ PO ₄ (1/4/5)	C ₆ H ₅ HgCl, (C ₆ H ₅) ₂ Hg, CH ₃ HgCl	–	UV 254 nm –	48
RP C18 Brownlee Labs. (200×4,6 mm, 5 µm)	CH ₃ OH-octan amónny (80:20), 0,1 mol.l ⁻¹ MBT (pH 6,2)	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺	voda, čistiaci roztok kontaktných šošoviek	UV 285 nm 0,3–0,5 ng	49
RP C18 Hypersil ODS 100-5 (250×4 mm, 5 µm)	CH ₃ OH-octan amónny (40:60), 2,2 mmol.l ⁻¹ metyl tioglykolát (pH 5,8)	C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺	vodná vzorka	UV 235 nm 630–650 ng.l ⁻¹ 19–25 ng	50 51
RP C18 Bishoff ODS-II (125×4,6 mm, 5 µm)	40 mmol.l ⁻¹ cysteín, 0,1 mol.l ⁻¹ kyselina octová (pH 2,9)	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺	pečeň delfína	CV AAS 200 ng.g ⁻¹	52

Tabuľka I – pokračovanie

Stacionárna fáza	Mobilná fáza	Stanovované formy	Matrica a úprava vzorky	Detekcia a medza stanovenia	Lit.
RP C18 Separon SGX (150×3 mm, 5 µm)	40 % ACN, 0,4 mmol.l ⁻¹ CDTA, pH 2 (H ₂ SO ₄)	Hg ²⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺	–	UV-VIS 500 nm (pok. derivatizácia, ditizón, CTMAB 1–5,1 ng	55
	20 % ACN, 0,2 mmol.l ⁻¹ CDTA, pH 2 (H ₂ SO ₄)	Hg ²⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺	–	TMA (off-line spojenie s HPLC) 0,3 ng	56
Mikrokolóna STR-ODS-H (125×0,51 mm, 5 µm)			odpadová voda	0,1 ng	53
ODS LS-40 (Toyosoda) (300×16 µm)	ACN-H ₂ O-(CH ₃) ₂ SO (dimetyl sulfoxid) (70:30:1) resp. 0,2 mol.l ⁻¹ cysteín, 0,02 mol.l ⁻¹ kyselina octová (pH 2,2)	CH ₃ HgSH, C ₂ H ₅ HgSH, CH ₃ (CH ₂) ₂ HgSH, CH ₃ (CH ₂) ₃ HgSH, resp. Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺	–	CV AAS 20 ng	54
RP C18 Lichrospher (250×4 mm, 5 µm)	ACN-0,1 mol.l ⁻¹ Kbr (gradient 35:65–100:0)	HgCl ₂ , (C ₆ H ₅) ₂ Hg, C ₆ H ₅ HgOAc, CH ₃ HgCl	kondenzovaný plyn	CV AAS 10 ng.ml ⁻¹	71
<i>Chromatografická separácia iónových párov</i>					
RP C18 IBM (250×4 mm, 5 µm)	CH ₃ OH-H ₂ O (60:40), 0,15 mol.l ⁻¹ NaCl, 0,01 mol.l ⁻¹ TBAB	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ CH ₂ Hg ⁺	riečna voda	UV 254 nm resp. DCP-AES 0,2–8 ng resp. 175–255 ng	58
RP C18 Chemcosorb ODS (100×3 mm, 5 µm)	0,1 mol.l ⁻¹ HClO ₄ ⁻ , 1 mmol.l ⁻¹ KCl, 1 % CH ₃ CN	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺	čistiace roztoky kontaktných šošoviek	PAD 1,2–1,8 mg.l ⁻¹	59
RP C18 Spherisorb ODS-2 (150×4,6 mm, 5 µm)	0,5 % L-cysteín (pH 5)	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺	morská voda 0,03–0,11 ng.ml ⁻¹	ICP-MS	61
RP C18 PEEK (50×1,6 mm)	ACN-H ₂ O (20:80), 5 mmol.l ⁻¹ amónium pentánsulfonát (pH 3,4)	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺	moč	ICP-MS 7 pg	60
<i>Ionexová chromatografia</i>					
Separon Six (silikagél) CGC (150×3 mm, 5 mm)	0,1 mmol.l ⁻¹ NaBr, 5 % CH ₃ OH, pH 2 (H ₂ SO ₄)	Hg ²⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺	–	UV-VIS, pokolónová (pok.) derivatizácia ditizón a CTMAHS 1,1–6,2 ng	64
HPIC-CS-5 (Dionex)	1 mmol.l ⁻¹ kyselina octová, 1 mmol.l ⁻¹ NaClO ₄ , 5 mmol.l ⁻¹ cysteín, pH 4,4 (NaOH)	Hg ²⁺ , C ₂ H ₅ Hg ⁺ , CH ₃ Hg ⁺	odpadová voda on-line prekoncentrácia (LiChroCART RP C18 a HPIC CG-5 Dionex)	CV AAS 2–10 ng	63
<i>Micelárna kvapalinová chromatografia</i>					
RP C18 Spherisorb ODS 2 (250×4,6 mm, 10 µm) modifikovaná 1 mmol.l ⁻¹ DDAB (tvorba vezikúl)	5 % ACN, 0,2 mmol.l ⁻¹ DDAB, 0,005 % 2-sulfanyletanol, 10 mmol.l ⁻¹ octan amónny (pH 5)	Hg ²⁺ , CH ₃ Hg ⁺	morská voda, ľudská moč, odpadová a morská voda, ľudská moč prekoncentrácia (Sep-Pack RP C18, 2-sulfanyletanol)	CV AAS 0,1–0,2 mg.l ⁻¹ MIP-AES 0,15–0,35 ng.ml ⁻¹	66 67
RP C18 Separon CGC (30×3 mm, 5 mm)	0,05 mol.l ⁻¹ CTMABr, 1 mM-DCTA 4 % 2-propanol, pH 2 (H ₂ SO ₄)	Hg ²⁺ , CH ₃ Hg ⁺ , C ₆ H ₅ Hg ⁺	–	UV-VIS 500 nm (pok. derivatizácia ditizónom) 1–3 ng	68

fázou, boli riešené tým, že rôzne chemické zlúčeniny ortuti boli separované ako stabilné neutrálne komplexy („charge-neutralization reversed-phase chromatography“)¹⁷.

Ako jedno z prvých komplexotvorných činidiel bol použitý 2-sulfanyletanol¹⁸, ktorý bol pridaný do mobilnej fázy, kde reagoval za vzniku neutrálnych komplexov s organickými zlúčeninami ortuti počas elúcie¹⁹. Ako detekčnú metódu použili elektrochemickú detekciu – diferenčne pulznú voltampometriu (DPV) resp. atómovú absorpčnú spektrometriu^{8,9} (AAS), detektor s mikrovlnne indukovanou plazmou²⁰ (MIP), amperometrickú detekciu²¹, fotometrickú detekciu v ultrafialovej oblasti (UV) pri 230 nm (cit.^{7,22}). Nízke medze stanovenia (5–7 ng) analytov v reálnych vzorkách životného prostredia, ako prírodná voda, biologické vzorky²³ a sedimenty^{10,11,24} boli dosiahnuté použitím atómového fluorescenčného spektrometrického detektora (AFS) alebo spojením RP HPLC s atómovou absorpčnou spektrometriou s atomizáciou v grafitovej kvyete¹⁸ (GF AAS) a atómovou emisnou spektrometriou s indukčne viazanou plazmou²⁵ (ICP-AES).

V spojení RP HPLC s hmotnostnou spektrometriou s indukčne viazanou plazmou (ICP-MS) vyšší obsah organických zlúčenín v mobilnej fáze spôsobuje problémy, ako klesanie citlivosti detektora²⁶ a preto pri izokratickej elúcii sa v mobilnej fáze používa najviac 5 až 30%-ný obsah organického modifikátora^{12,13}. V práci²⁷ použili na zníženie medze stanovenia analytov ICP-MS detekciu v kombinácii s off-line prekoncentráciou zlúčenín ortuti s ditiokarbamátom na Dionex predkolóne. Medza stanovenia pre CH₃HgCl bola 16 ng.l⁻¹ a pre HgCl₂ 17 ng.l⁻¹, čo predstavovalo približne 50 násobný prekoncentračný faktor.

Ditiokarbamáty sú často používanými komplexotvornými činidlami, ktoré vytvárajú stabilné neutrálne komplexy s iónmi kovov, naviazanými na ich tiolovú skupinu. Tvorba komplexov dovoľuje separovať, pri vhodných separačných podmienkach, od seba niektoré kationy kovov^{28–31} ako Co(II), Ni(II), Cu(II), Co(II a III), Cd(II), Cr(III), Pb(II), Bi(III), Tl(III), Pt(II), Fe(III), Pa(II) a Hg(II). Štúdie stanovenia zlúčenín ortuti ukazujú, že tvorba ditiokarbamátových komplexov je väčšinou uskutočnená mimo kolóny, tieto sú extrahované do chloroformu a rozpustené v metanole resp. acetonitrile a následne separované RP HPLC metódou. Ligand s nízkou koncentráciou musí byť tiež prítomný v mobilnej fáze, aby sa zabránilo disociácii komplexu^{32,33}. Mobilná fáza bola vhodne zvolená podľa typu detekčnej metódy. Pre UV detekciu a elektrochemickú detekciu to bola zmes metanol–voda^{34–37} a pre atómovú absorpčnú spektrometriu studených pár (CV AAS) a ICP-MS zmes acetonitril–voda^{38–44,71}. Tvorba ditiokarbamátových komplexov s organickými zlúčeninami ortuti (používanými vo farmaceutickom priemysle ako baktericídne látky) bola využitá aj v prácach Parkina^{36,45,46}. Separácie ditiokarbamátových komplexov boli robené na oktadecylsilikagelových analytických kolónach (RP C18) s elučným poradím podľa klesajúcej polarizácie CH₃Hg⁺, C₂H₅Hg⁺, C₆H₅Hg⁺ ... atď. a ako posledný eluoval komplex Hg²⁺ (cit.^{34,38,39}). Spojenie HPLC s pokolónovou fotochemickou (UV) oxidáciou a CV AAS (UV-PCO-CVAAS) (cit.^{40–43,69}) resp. s rozprašovaním za vysokého tlaku a ICP-MS (HPF/HPNP-ICP-MS) (cit.⁴⁴) ako vysoko citlivými detekčnými metódami, využil Falter⁷⁹ a kol. na stanovenie zlúčenín ortuti v rôznych vzorkách (vlasý, prírodná voda, sedimenty a biologické tkanivá). Najnižšiu medzu stanovenia 0,05 ng.l⁻¹

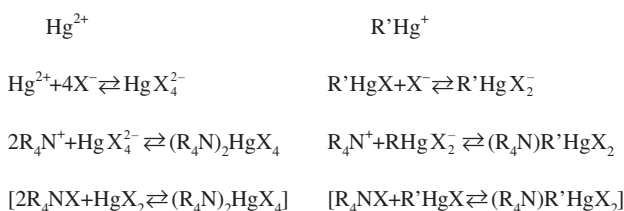
autori dosiahli ak použili on-line prekoncentráciu na RP C18 Hypersil ODS kolóne.

Z ďalších komplexotvorných činidiel vytvárajúcich komplexy so zlúčeninami ortuti a ich stanovení RP HPLC metódou, boli použité: komplexy ditizónu⁴⁷, 6-sulfanylpurinu⁴⁸, 2-sulfanylbentiazolu⁴⁹, metyl sulfanylglykolátu^{50,51}, cysteínu^{52,54} a CDTA (cit.^{55,56}).

2.2. Chromatografická separácia iónových párov

Chromatografická separácia iónových párov na reverzných fázach, môže tiež riešiť problémy separácie iónových látok. Separácia kationov je dosiahnutá ich komplexáciou s vhodným ligandom pridaným do mobilnej fázy a iónovým párovaním negatívne nabitého komplexu s ión-párovacím činidlom alebo výmenou ich kationu s protiíonom ión-párovacieho činidla³².

Rovnováhy uplatňujúce sa pri separácii Hg(II) halogenidov a halogénkomplexov v prítomnosti protiiónu (tetra-n-butylnámium halogenidu):



Zvyšovanie pH hodnoty mobilnej fázy znižuje retenčné faktory komplexov kovov. To naznačuje, že elektrostatický efekt medzi stacionárnou a mobilnou fázou má dôležitý vplyv na retenciu komplexov kovov⁵⁷. Ho a Uden⁵⁸, sa zaoberali vplyvom koncentrácie konkurenčného aniónu Cl⁻, koncentrácie organického modifikátora (metanol) a koncentrácie ión-párovacieho činidla tetrabutylamónium bromidu (TBABr) v mobilnej fáze na stanovenie ortuti a jej zlúčenín. Typické pre chromatografickú separáciu iónových párov bolo zvyšovanie retenčných faktorov analytov so zvyšovaním koncentrácie ión-párovacieho činidla TBABr. Prídavok organického modifikátora do mobilnej fázy, tiež zlepšuje tvar pík a zvyšuje účinnosť, čo bolo využité v práci⁵⁹ prídavkom 1 % acetonitrilu do mobilnej fázy. V práci⁶⁰ autori úspešne stanovili zlúčeniny ortuti ako štandardného prídavku do vzorky moča ICP-MS detekciou. Autori v práci⁶¹ využili pre separáciu 0,5 % roztok cysteínu (pH 5,0) ako ión-párovacieho činidla. Vynechanie organického rozpúšťadla v mobilnej fáze malo pozitívny vplyv na ICP-MS detekciu.

2.3. Ionexová chromatografia

V ionexovej chromatografii našla uplatnenie pri špeciácii ortuti⁶³ hlavne anexová chromatografia cysteínových komplexov, pravdepodobne kvôli vysokým hodnotám distribučných konštánt Hg (II) na katexoch pri obvyklých zloženiach mobilných fáz, čo si vyžiadalo používanie agresívnych mobilných fáz⁶². Porovnaním rôznych typov stacionárnych fáz na simultánne stanovenie zlúčenín ortuti s pokolónovou derivatizáciou ditizónom v micelárnom prostredí a následnou UV-VIS detekciou, sa zaoberali autori v práci⁶⁴. Z testovaných sorbentov

Separon SIX, Separon SGX-NH₂ a Separon HEMA-S, bol najvhodnejší na separáciu Hg²⁺, CH₃Hg⁺ a C₆H₅Hg⁺ Separon SIX.

2.4. Micelárna kvapalinová chromatografia

Hlavný rozdiel micelárnej kvapalinovej chromatografie (MLC) a klasickej RP HPLC je daný homogenitou hydroorganického roztoku a mikroheterogenitou micelárných roztokov nad kritickou micelárnou koncentráciou, ako aj z toho vyplývajúcim uplatnením sekundárnej rovnováhy v micelárných mobilných fázach⁶⁵.

Vlastnosti micelárných systémov boli využité v prácach^{66,67} kde autori modifikovali povrch stacionárnej fázy pred separáciou roztokom didodecyldimetylamónium bromidu (DDAB). Prídavok DDAB do mobilnej fázy (acetonitril, 2-sulfanyletanol) s 0,2 mmol.l⁻¹ koncentráciou spôsoboval tvorbu vezikúl, ktorých prítomnosť umožňovala pri separácii realizovať nielen hydrofóbne interakcie, ale tiež elektrostatické interakcie s ionizovanými analytmi. Použitie surfaktantu tiež zlepšilo detekciu ortuti CV AAS a CV-MIP-AES.

Interakcie medzi analytom, stacionárnou a micelárnou fázou charakteristické pre MLC boli využité v práci⁶⁸ pri špeciácii ortuti ako bromokomplexov na krátkej RP C18 kolóne (30×3 mm). Ako micelárna mobilná fáza bol použitý kationický surfaktant cetyltrimetylamónium bromid (CTMABr) s prídavkom kyseliny 1,2-cyklohexándiaminotetraoctovej (CDTA), 2-propanolu a pH upraveným na hodnotu 2,0 kyselinou sírovou (H₂SO₄). Elučné poradie bolo CH₃Hg⁺, C₆H₅Hg⁺ a Hg²⁺. Komplex [HgBr₄]²⁻ sa separoval iónovýmenným, zatiaľ čo CH₃HgBr a C₆H₅HgBr hydrofóbnym mechanizmom. Na detekciu bol využitý systém s pokolónovou derivatizáciou ditizónom a následnou spektrofotometrickou detekciou komplexov ditizónu pri 500 nm.

3. Záver

Na špeciáciu ortuti HPLC metódami sa zlúčeniny ortuti najčastejšie komplexujú pred alebo počas separácie 2-sulfanyletanolom resp. ditiokarbamátmi ako komplexotvornými činidlami. Uplatnenie tiež našli sekundárne rovnováhy pri separácii zlúčenín ortuti iónovým párovaním a MLC, pridaním vhodného ión – párovacieho činidla resp. surfaktantu. Najčastejšie používanými detekčnými technikami sú techniky molekulyvej spektrometrie a atómovej spektrometrie. Výrazný posuv je vidieť v uplatňovaní ICP-MS a elektrochemických metód.

Hlavnými problémami spojenými s uplatňovaním HPLC špeciácie pri analýze komplexných vzoriek (environmentálne, biologické) ovplyvňujúcimi jednak separačný proces a tiež detekčné parametre sú:

- relatívne vysoké požadované koncentrácie ortuti v chemikáliach používaných pre prípravu mobilných fáz, ako aj roztokov pre izoláciu ortuti a organoortuťnatých zlúčenín z komplexných matric⁷²,
- špeciácia ortuti viazanej v labilných komplexoch,
- nekontrolovaná sorpcia v zložitých analytických zariadeniach (HPLC – ICP-MS),
- izolácia analytov bez porušenia rovnováh vo vzorke alebo s akceptovateľným porušením.

Problematika analýzy ťažkých kovov v komplexných mat-

riciach (napr.^{73,74}), ako aj operačne definovanej špeciácie, využitím mnohokrokových extrakčných postupov (napr.⁷⁵) a jej kombinácie s identifikáciou a kvantifikáciou individuálnych špecií rôznymi kombinovanými technikami, je stále aktuálnou a prítlačivou pre rôzne orientované skupiny analytických chemikov⁷⁶⁻⁷⁸.

Zoznam použitých skratiek a symbolov

CTMAHS	cetyltrimetylamóniumhydrogensulfát
DC	ditiokarbamátový komplex
DCP	plazma budená jednosmerným prúdom
DDC	dietylénditiokarbamátový komplex
EDTA	kyselina etyléndiaminotetraoctová
MBT	sulfanylbentiazol
MIP-AES	atómová emisná spektrometria s mikrovlnne indukovanou plazmou
PAD	pulzná amperometrická detekcia
PDC	pyrolidinditiokarbamátový komplex
TMA	jednouúčelový prístroj na stanovenie ortuti

Názvy organických zlúčenín ortuti prebratých z anglicky písaných literárnych zdrojov nie sú ešte jasne definované. V slovenskej názvoslovnej praxi organokovových zlúčenín sa odporúča používať namiesto ortuť-hydrargyrium⁷⁹, napr. methylmercury = metylhydragyrium. Vzhľadom na ojedielnosť používania spomenutého názvoslovie v analytickej chémii a tiež vyhnutiu sa zaužívaného názvoslovie (metylortuť, fenylortuť a pod.), boli v nasledujúcej práci používané sumárne alebo pôvodné názvy prebraté z literatúry.

Táto práca vznikla za finančnej podpory VEGA MŠ a SAV v rámci projektov č. 1/4198/97, č. 1/6222/99 a USA – Slovak Science and Technology Program Award No: 007–95.

LITERATÚRA

1. Ure A. M., v knihe: *Heavy Metals in Soils* (Alloway B. J., ed.), str. 40. Blackie, Glasgow 1990.
2. Ure A. M., Davidson C. M., v knihe: *Chemical Speciation in the Environment* (Ure A. M., Davidson C. M., ed.), str. 1. Blackie, London 1990.
3. Florence T. M.: *Talanta* 29, 354 (1982).
4. Wilken R. D., Hintelmann H., v knihe: *Metal Speciation in the Environment* (Broekaert J. A. C., Gucer S., Adams F., ed.), str. 23. Springer-Verlag, Berlin 1990.
5. Westöö G.: *Acta Chem. Scand.* 20, 2131 (1966).
6. Westöö G.: *Acta Chem. Scand.* 21, 1790 (1967).
7. Wilken R.-D., Hintelmann H.: *Water Air Soil Pollut.* 56, 427 (1991).
8. Holak W.: *Analyst* 107, 1457 (1982).
9. Holak W.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72, 926 (1989).
10. Hempel M., Chau Y. K., Dutka B. J., McInnis R., Kwan K. K., Liu D.: *Analyst* 120, 721 (1995).
11. Hempel M., Wilken R.-D., Miess R., Hertwich J., Beyer K.: *Water Air Soil Pollut.* 80, 1089 (1995).
12. Bushee D. S.: *Analyst* 113, 1167 (1988).
13. Huang Ch.-W., Jiang S.-J.: *J. Anal. At. Spectrom.* 8, 681 (1993).
14. Langseth W.: *J. Chromatogr.* 438, 414 (1988).
15. Funasaka W., Hanai T., Fujimura K.: *J. Chromatogr. Sci.* 12, 517 (1974).

16. Churáček J., Jandera P.: *Úvod do vysokoúčinné kapalino-vé chromatografie*. SNTL, Praha 1984.
17. MacCreham W. A., Durst R. A., Bellama J. M.: *Anal. Lett.* 10, 1175 (1977).
18. Brinckman F. E., Blair W. R., Jewett K. L., Iverson W. P.: *J. Chromatogr. Sci.* 15, 493 (1977).
19. MacCreham W. A., Durst R. A.: *Anal. Chem.* 50, 2108 (1978).
20. Kollotzek D., Oechsle D., Kaiser G., Tschöpel P., Tölg G.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 318, 485 (1984).
21. Evans O., McKee G. D.: *Analyst* 112, 983 (1987).
22. Hempel M., Hintelmann H., Wilken R.-D.: *Analyst* 117, 669 (1992).
23. Yoshino M., Tanaka H., Okamoto K.: *Bunseki Kagaku* 44, 691 (1995).
24. Hintelmann H., Hempel M., Wilken R.-D.: *Environ. Sci. Technol.* 29, 1845 (1995).
25. Krull I. S., Bushee D. S., Schleicher R. G., Smith Jr. S. B.: *Analyst* 111, 345 (1986).
26. Boom A. W., Browner R. F.: *Anal. Chem.* 54, 1402 (1982).
27. Bloxham M. J., Gachanja A., Hill S. J., Worsfold P. J.: *J. Anal. At. Spectrom.* 11, 145 (1996).
28. Steenkamp P. A., Coetzee P. P.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 346, 1017 (1993).
29. King J. N., Fritz J. S.: *Anal. Chem.* 59, 703 (1987).
30. Svoboda L., Prokeš P.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 57, 1843 (1992).
31. Gill M. C., Shih Y. T., Carr P. W.: *Talanta* 36, 293 (1989).
32. Sarzanini C., Mentasti E.: *J. Chromatogr. A* 789, 301 (1997).
33. Dilli S., Haddad P. R., Htoon A. K.: *J. Chromatogr.* 500, 313 (1990).
34. Pilar da Silva M., Procopio J. R., Hernández L.: *J. Chromatogr. A* 761, 139 (1997).
35. Inoue S., Hoshi S., Mathubara M.: *Talanta* 32, 44 (1985).
36. Parkin J. E.: *J. Chromatogr.* 407, 389 (1987).
37. Langseth W.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 325, 267 (1986).
38. Aceto M., Foglizzo A. M., Mentasti E., Sacchero G., Sarzanini C.: *J. Environ. Anal. Chem.* 60, 1 (1995).
39. Sarzanini C., Sacchero G., Aceto M., Abollino O., Mentasti E.: *J. Chromatogr.* 626, 151 (1992).
40. Falter R., Schöler H. F.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 354, 492 (1996).
41. Falter R., Schöler H. F.: *J. Chromatogr. A* 675, 253 (1994).
42. Falter R., Schöler H. F.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 353, 34 (1995).
43. Eiden R., Falter R., Augustin-Castro B., Schöler H. F.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 357, 439 (1997).
44. Falter R., Ilgen.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 358, 401 (1997).
45. Parkin J. E.: *J. Chromatogr.* 472, 401 (1989).
46. Parkin J. E.: *J. Chromatogr.* 542, 137 (1991).
47. Langseth W.: *Anal. Chim. Acta* 185, 249 (1986).
48. Touabet A., Guermouche M. H.: *J. Chim. Phys.* 88, 487 (1991).
49. Wang Y.-Ch., Whang Ch.-W.: *J. Chromatogr.* 628, 133 (1993).
50. Cammann K., Robecke M., Bettmer J.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 350, 30 (1994).
51. Bettmer J., Cammann K., Robecke M.: *J. Chromatogr. A* 654, 177 (1993).
52. Palmisano F., Zamboni P. G., Cardellicchio N.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 346, 648 (1993).
53. Munaf E., Haraguchi H., Ishii D., Takeuchi T., Goto M.: *Anal. Chim. Acta* 235, 399 (1990).
54. Fujita M., Takabatake E.: *Anal. Chem.* 55, 454 (1983).
55. Hutta M., Rippa S., Kandrác J., Chalanyová M.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 208, 417 (1996).
56. Hutta M., Moskářová M., Žemberyová M., Foltin M.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 208, 403 (1996).
57. Padarauskas A., Schwedt G.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 351, 708 (1995).
58. Ho Y.-S., Uden P. C.: *J. Chromatogr. A* 688, 107 (1994).
59. Hsi T.-S., Tsai J.-S.: *J. Chin. Chem. Soc.* 41, 315 (1994).
60. Shum S. C. K., Pang H., Houk R. S.: *Anal. Chem.* 64, 2444 (1992).
61. Wan Ch.-Ch., Chen Ch.-S., Jiang S.-J.: *J. Anal. At. Spectrom.* 12, 683 (1997).
62. Strelow F. W. E.: *Talanta* 38, 923 (1991).
63. Sarzanini C., Sacchero G., Aceto M., Abollino O., Mentasti E.: *Anal. Chim. Acta* 284, 661 (1994).
64. Foltin M., Megová S., Procháčková T., Štekláč M.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 208, 295 (1996).
65. Armstrong D. W., Terrill R. Q.: *Anal. Chem.* 53, 1662 (1981).
66. Aizpún B., Fernández M. L., Blanco E., Sanz-Medel A.: *J. Anal. At. Spectrom.* 9, 1279 (1994).
67. Costa-Fernández J. M., Lunzer F., Pereiro-García R., Sanz-Medel A., Bordel-Gracia.: *J. Anal. At. Spectrom.* 10, 1019 (1995).
68. Hutta M., Megová S., Halko R.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 228, 159 (1998).
69. Falter R., Schöler H. F.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 348, 253 (1994).
70. Fabbri D., Trombini C.: *Chromatographia* 39, 246 (1994).
71. Schickling C., Broekaert J. A. C.: *Appl. Organomet. Chem.* 9, 29 (1995).
72. Procháčková T., Góra R., Kandrác J., Hutta M.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 229, 61 (1998).
73. Koplík R., Čurdová E., Mestek O.: *Chem. Listy* 91, 38 (1997).
74. Procháčková T., Foltin M.: *Chem. Listy* 89, 770 (1995).
75. Závadská M., Žemberyová M.: *Chem. Listy* 93, 91 (1999).
76. Puk R., Weber J. H.: *Appl. Organomet. Chem.* 8, 293 (1994).
77. Baeyens W.: *Trends Anal. Chem.* 11, 245 (1992).
78. Horvat M., v kniže: *Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mobs Bolonces* (Baeyens W., ed.), str. 1. Kluwer Academic Publishers, Netherlands 1996.
79. Heger J., Devínsky F.: *Názvoslovie organických zlúčenín*. Univerzita Komenského, Bratislava 1997.

R. Halko and M. Hutta (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Speciation and Determination of Mercurials by High-Performance Liquid Chromatography Methods**

Applications of HPLC to speciation and determination of mercury compounds in biological, clinical and environmental matrices are reviewed. Almost all modes of HPLC (reverse-phase, ion-pair, ion exchange, micellar) used so far for separation of mercury compounds of interest (Hg^{2+} , CH_3Hg^+ , $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$, $n\text{-C}_3\text{H}_7\text{Hg}^+$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$, etc.) are discussed. Merits of various detection techniques used for mercury and/or organomercurials determination in combination with HPLC and brief description of isolation techniques are presented.