

PŘÍPRAVA VZORKŮ BIOLOGICKÉHO PŮVODU PRO SPECIAČNÍ ANALÝZU RTUTI POMOCÍ PLYNOVÉ A KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE

KATEŘINA MALIŠOVÁ a OTO MESTEK

*Ústav analytické chemie, Fakulta chemicko-inženýrská,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická
5, 166 28 Praha 6
MalisovK@vscht.cz*

Došlo 20.12.11, přijato 19.3.12.

Klíčová slova: rtuť, methylrtuť, extrakce, plynová chromatografie, derivatizace, kapalinová chromatografie

Obsah

1. Úvod
2. Obecný postup speciální analýzy rtuti a využívané analytické techniky
3. Odběr a uchování vzorků pro speciální analýzu rtuti
4. Způsoby extrakce
5. Úpravy vzorku pro plynovou chromatografii – derivatizace specií
6. Závěr

1. Úvod

Rtuť se v přírodě může vyskytovat jako elementární kovová nebo ve formě rtuťnatých a rtuťných anorganických sloučenin a organokovových sloučenin. Do životního prostředí je rtuť uvolňována zejména zpracováním a spalováním fosilních paliv, z chemických procesů a jejich produktů, zubních výplní (nejčastěji při kremaci) a z rukodělné těžby zlata¹. V roce 2005 bylo při celkové spotřebě rtuti 3798 t emitováno do atmosféry 1930 t rtuti. Nejnovější studie z roku 2010 odhaduje, že v případě zachování současného trendu, dojde v letech 2005–2020 k navýšení emisí o 25 % (cit¹).

Pro vyhodnocení ekologického a toxického účinku nestačí obecně stanovení celkové koncentrace polutantu. Esencialita a toxicita jsou ovlivněny nejen koncentrační úrovní prvku, ale také formou jeho vazby, tedy obsahem jednotlivých specií^{2,3}. Navíc v závislosti na chemických, fyzikálních a biologických podmínkách prostředí mohou být jednotlivé specie navzájem konvertovány. To platí i o rtuti, jejíž relativně méně nebezpečné anorganické formy (AnorgHg) mohou být přeměněny na mnohonásobně toxičtější a nebezpečnější methylované formy (MethylHg) s výraznými neurotoxickými účinky⁴. Z těchto forem převládá (mono-) methylrtuť, silný neurotoxin způsobující vážná poškození mozku, který se snadno akumuluje

zejména ve vodních organismech^{5–7}. Je známo, že lidský organismus přijímá největší množství rtuti právě s mořskými rybami a koryši a také čokoládou⁸. Biodostupnost rtuti však závisí nejen na druhu a způsobu úpravy potravin, ale i na jejím celkovém obsahu. Bylo např. zjištěno, že celková biodostupnost rtuti obsažené v rybách je pro lidský organismus poměrně malá, a to 9–17 % celkového obsahu, přičemž klesá s rostoucím celkovým obsahem⁹.

2. Obecný postup speciální analýzy rtuti a využívané analytické techniky

Speciální analýza rtuti, provedená libovolnou metodou, zahrnuje několik společných kroků. Odebrané vzorky jsou zakonzervovány, homogenizovány a uskladněny. Následně jsou přítomné specie rtuti ze vzorku izolovány a poté je provedena jejich separace a detekce.

V případě speciální analýzy rtuti se k separaci používá zejména plynová chromatografie (GC) a kapalinová chromatografie (LC)^{10,11}. Používání GC pro speciální analýzu rtuti se datuje již od 60. let minulého století¹². Vlastní separaci předchází derivatizace, nejčastěji alkylací pomocí Grignardových činidel nebo tetraalkylboritanu¹³. Oproti GC přináší LC řadu výhod: postačuje jednodušší příprava vzorku, spojení s prvkově selektivním detektorem je jednodušší a separace probíhá při laboratorní teplotě a nehrozí tak vzájemná konverze specií. Při separacích specií rtuti se téměř výhradně používá kapalinová chromatografie na obrácené fázi se stacionární fází C-18 nebo C-8 a s různými mobilními fázemi obsahujícími organický modifikátor (methanol, acetonitril) a látky stabilizující specie rtuti tvorbou merkaptidů nebo komplexů se rtuť (2-merkapt ethanol, L-cystein, pyrrolidindithiokarbamat či dithizon) nebo iontově párové činidlo (bromid tetrabutylamonium), případně pufr^{14,15}. Aplikace jiných chromatografických technik je výjimečná, popsáno bylo např. použití iontově výměnné chromatografie¹⁶. Obě separační metody bývají doplněny prvkově či izotopově citlivou detekcí, a to převážně atomovou fluorescenční spektrometrií (AFS)^{17,18}, atomovou absorpční spektrometrií (AAS)¹⁹ či hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)^{20–22}. Pro snížení detekčních limitů lze před detekční metodu předřadit generování studených par. Jednotlivé specie rtuti jsou redukovány na elementární rtuť nejčastěji pomocí tetrahydridboritanu sodného nebo ve dvou krocích pomocí chloridu cínatého^{23,24} či hydrazinu²⁵ a tetrahydridboritanu sodného²⁶. V případě GC lze použít i nespecifické detektory, v tom případě je ale nutné specie rtuti během přípravy vzorku velice pečlivě izolovat od ostatních látek.

3. Odběr a uchovávání vzorků pro speciální analýzu rtuti

Důležitými kroky, které předcházejí samotné speciální analýze, jsou odběr a skladování vzorku. Ty by měly být prováděny tak, aby nedošlo ke znehodnocení vzorku, ke ztrátám jednotlivých specií rtuti či naopak ke kontaminaci vzorku, případně ke změně poměru obsahů jednotlivých specií.

Během skladování kapalných vzorků může docházet k úbytku obsahu rtuti jak adsorpcí a chemisorpcí na stěnách nádoby, tak i na povrchu tuhých částic v matrici. K dalším ztrátám může dojít transformací specií: může dojít k degradaci MethylHg na dvojmocnou anorganickou rtuť, k methylaci AnorgHg dochází méně často a jen výjimečně dochází k transformaci mezi atomární rtuť a AnorgHg^{27,28}.

Rozsah ztrát AnorgHg a MethylHg ve vodných roztocích závisí na koncentraci přítomných specií, na povaze rozpuštěných látek a také na přítomnosti bakterií a mikroorganismů. Při studiu vlivu sterilizace na stabilitu roztoků obsahujících rtuťnaté ionty o koncentraci 20 µg l⁻¹ bylo zjištěno, že během skladování dochází ve vzorcích nesterilizované mořské vody s obsahem bakterií k významným úbytkům, po čtyřech dnech byl pozorován úbytek 30 %, zatím co ve sterilizovaných vzorcích došlo ke ztrátám okolo 15 % (cit.²⁹). Při hledání vhodného materiálu skladovacích nádob bylo zjištěno, že k největším ztrátám celkového obsahu rtuti, degradaci MethylHg a ke konverzi mezi jednotlivými speciemi dochází v běžně používaných polyethylenových (PE) nádobkách^{30–32}. Ke ztrátám obsahu AnorgHg dochází adsorpcí na stěnách nádobek, které mohou obsahovat nečistoty, jako jsou karboxylové skupiny či uhlíkové radikály s amidovými, thiolovými, sulfidovými či fenolickými skupinami. Adsorpcí na stěnách nádobek může být ztraceno až 90 % přítomné AnorgHg^{33,34}. Další ztráty mohou být způsobeny volatilizací. Vysoký oxidačně redukční potenciál páru Hg²⁺/Hg⁺ umožňuje redukci dvojmocné anorganické rtuti na jednocmocnou anorganickou rtuť již slabými redukčními činidly³⁵ a z jednocmocné rtuti může následně disproportionací spontánně vznikat elementární rtuť, která se odpařuje z roztoku^{35,36}. Ztráty rtuti mohou být také způsobeny tvorbou nedetegovatelných specií, jako jsou vysoce stabilní komplexy či stabilní amalgámy, které jsou tvořeny po redukci dvojmocné rtuti na rtuť elementární²⁸.

Absorpci na stěnách nádobek lze zabránit nízkým pH, vysokou iontovou silou roztoku a přidávkou komplexotvorných činidel. Pro stabilizaci roztoku obsahujícího AnorgHg se používají buď silné minerální kyseliny (dusičná, sírová, chlorovodíková), látky působící jako oxidační činidla v kyselém prostředí (dichroman draselný, manganistan draselný, zlatité ionty) či peroxid vodíku. V roli komplexotvorných činidel se používají halogenidy, L-cystein a huminové kyseliny^{27,28}.

Ze studie²⁸ vyplývá, že na rozdíl od PE jsou vhodné materiály pro uchovávání vzorků borosilikátové sklo

a polytetrafluorethylen (PTFE, teflon). Jak AnorgHg, tak MethylHg jsou v těchto nádobkách stabilní po dobu několika měsíců. Pro vzorkování a uchovávání pitné a říční vody pro speciální analýzu rtuti jsou doporučovány nádoby z polyethylentereftalátu (PET), který vykazuje obdobné vlastnosti jako PTFE či borosilikátové sklo. Nízká pořizovací cena PET nádobek dovozuje jejich jednorázové použití, díky kterému odpadá problém s jejich čištěním, další jejich velkou výhodou je poměrně vysoká mechanická odolnost.

Na stabilitu specií rtuti během skladování může mít vliv i teplota. Na obsah MethylHg během skladování vodných roztoků teplota vliv neměla, nebyly sledovány úbytky obsahu methylrtuti ani při zahřívání roztoků na 80 °C (cit.^{28,37}). Během skladování vzorků měkkýšů, korýšů a krve docházelo však v případě opětovného rozmrazení a zamrazení k úbytkům obsahu MethylHg³⁸. Pro dosažení stability specií rtuti ve vzorcích biologických materiálů je nutné vzorky skladovat v temnu, avšak na stabilitu specií ve vodných roztocích nemá světlo vliv. Rozklad MethylHg světlem na AnorgHg ve vzorku může být zapříčiněn působením UV záření, přičemž míra rozkladu závisí na intenzitě UV záření. Rozklad MethylHg světlem lze potlačit přidávkou kyseliny dusičné či hydroxidu sodného²⁸. Během skladování vzorků zemin³⁷ k degradaci organických forem rtuti na AnorgHg nedošlo, ale během skladování extraktů byla pozorována přeměna organické rtuti na AnorgHg. Důležitou roli v této přeměně hraje kromě slunečního svitu i přítomnost L-cysteinu, degradace je intenzivnější za přítomnosti obou faktorů.

4. Způsoby izolace specií rtuti

Nevhodnou volbou extrakčního postupu může být vzorek znehodnocen. V praxi se pro izolaci specií rtuti ze vzorků biologických materiálů (rostlinné a tělní tkáň, potraviny rostlinného a živočišného původu), na které je tento článek převážně zaměřen, nejčastěji používá extrakce do roztoku vhodného činidla. Jedná se o roztoky jak kyseliny, tak zásad, přítomny mohou být i látky podporující převod specií rtuti tvorbou stabilních sloučenin nebo jiná pomocná činidla. Přehled konkrétních aplikací spolu s charakteristikou následné separace a detekce specií je podán v tabulce I. Práci zabývající se speciální analýzou rtuti v nejrůznějších typech vzorků existuje v odborné literatuře enormní počet, jen za rok 2011 přibylo 38 článků zabývajících se speciální analýzou rtuti v rybách. Výběr prací pro tento přehled byl omezen na časopisy analytického zaměření, ze kterých mohly být získány podrobnější údaje o způsobu provedení analýzy a důležitých charakteristikách stanovení. Jiné způsoby izolace specií rtuti než extrakce do kapaliny nejsou příliš vhodné. V případě použití destilace s vodní párou byl pozorován významný nárůst obsahu MethylHg^{14,39}. Míra nárůstu souvisí s matricí vzorku, největší nárůst obsahu MethylHg byl pozorován v případě izolace ze sedimentů, v menší míře byl pozorován při izolaci rtuti z řas, vlasů či tělních tkání. Podobná

Tabulka I
Přehled provedení speciální analýzy rtuti

Extrakční činidlo a postup	Vzorky	Způsob separace	Detekce	Mez detekce, koncentrační rozsah	Lit.
Hydrolýza NaOH (6 mol/l), neutralizace HCl (3 mol/l), přidavek směsi KBr/CuSO ₄ , extrakce specií toluenem, přečištění Na ₂ S ₂ O ₃ .	svalovina mořských ryb	GC, kolona SE-54, nosný plyn N ₂	ICP-MS	MeHg(I): 0,5 pg EtHg(I): 1,0 pg) Lin. rozsah: 1–1000 pg	55
Hydrolýza 25% TMAH v mikrovlnném poli, neutralizace CH ₃ COOH, adice Cu ²⁺ iontů, pufrace octanovým pufrém, derivatizace tetrapropylboritanem draselným, extrakce <i>n</i> -heptanem.	ryby	GC, kolona CP-SIL 8 CB lowbleed (5% fenylyl – 95% dimethylpolysiloxan), nosný plyn He	MS	MeHg: 40 ng/g	58
Hydrolýza 25% TMAH v mikrovlnném poli, neutralizace CH ₃ COOH, pufrace octanovým pufrém, derivatizace tetraethylboritanem sodným, extrakce hexanem.	svalovina ryb	GC, kolona DB-5, nosný plyn He	Pyro-AFS	MeHg: 2 pg AnorgHg: 1 pg	65
Extrakce 25% TMAH či 10% methanolickým roztokem KOH, neutralizace CH ₃ COOH, pufrace octanovým pufrém, derivatizace tetraethylboritanem sodným a extrakce hexanem.	rybí játra	GC, kolona OV-1701, nosný plyn He	MIP-AFS	MeHg: 3 pg	56
Mikrovlnná extrakce roztokem TMAH, neutralizace CH ₃ COOH, pufrace octanovým pufrém, derivatizace tetraethylboritanem sodným a extrakce hexanem.	ryby	GC, dále nespecifikováno	AES	MeHg: 3,0 pg/g EthylHg: 12,5 pg/g	66
Hydrolýza ethanolickým roztokem KOH při 100 °C, neutralizace HCl a extrakce tuků do <i>n</i> -hexanu. K vodné fázi přidavek EDTA a roztoku dithizonu v toluenu. Zpětná extrakce komplexu do roztoku Na ₂ S ve směsi NaOH a etanolu. Neutralizace HCl a přidavek Walpoleho pufru a dithizonu v toluenu. Promytí org. vrstvy NaOH, okyselení a oddělení toluenové vrstvy pro analýzu.	mořské a sladkovodní ryby	GC, náplňová kolona, s Hg-20A na Uniport HP AW-DMCS, nosný plyn N ₂	EC-MS	neuveдено	62
Hydrolýza roztokem KOH, pufrace roztokem octanu amonného a derivatizace tetrafenylboritanem sodným. Extrakce fenylderivátů na pevnou fázi.	vzorky mořské bioty	SPME-GC, dále nespecifikováno		MethylHg: 0,02 ng AnorgHg: 0,05 ng	57
Hydrolýza KOH při 67 °C, neutralizace HCl a přidavek roztoku NH ₄ Cl, hexanu a difenylrtuti v hexanu a derivatizace tetraethylboritanem sodným.	potravinový mořského původu	GC, kolona 100% polydimethylsiloxan, nosný plyn He	AFS	MethylHg: 20 ng/g	60
Odstranění tuků (aceton a toluen), spikování monopropylrtuti, natrávení pankreatinem a HCl přes noc při 37 °C. Okyselení HCl, úprava pH na 4,1–5 (octanový pufr, NaOH) a derivatizace tetrafenylboritanem sodným. Zakoncentrování SPME.	drůbeží svalovina, vejce, rýže, obilniny	GC, kolona DB-5MS, nosný plyn 1% Xe v He	ICP-MS	MethylHg: 0,3 ug/kg EthylHg: 0,3 ug/kg	46

Pokračování tabulky I

Extrakční činidlo a postup	Vzorky	Způsob separace	Detekce	Mez detekce, koncentrační rozsah	Lit.
Extrakce methylrtuti za tepla roztokem TMAH, reextrakce dichlormethanem a HCl. Zpětná extrakce do deionizované vody odpařením rozpouštědla při 50 °C pod atmosférou N ₂ .	vzorky vlasů	GC, náplňová kolona 10% OV3 na chromosorbu W-AW DMSC	AFS	MethylHg: 0,04 ng/g	63
Extrakce methylrtuti H ₂ SO ₄ a roztokem KBr a CuSO ₄ . Re-extrakce do dichlormethanu a zpětná extrakce do deionizované vody pod N ₂ atmosférou odpařením rozpouštědla při 50 °C.	vzorky vlasů	GC, náplňová kolona 10% OV3 na chromosorbu W-AW DMSC	AFS	neuveдено	63
Rozklad zředěnou HCl při teplotě 100 °C, extrakce specií do toluenu s podporou ultrazvuku, k supernatantu po odstředění přidávek L-cysteinu.	ryby a vlasy	RP HPLC, kolona HyPurity C18, MF: roztok CYS, methanol × roztok PSH, methanol × GSH methanol	CVGAFS	AnorgHg: 16 pg MethylHg: 18 pg EthylHg: 18 pg FenylHg: 20 pg	45
Mikrovlnná extrakce při 65 °C roztokem EDTA a 2-ME v methanolu.	ryby	RP HPLC, kolona C18, MF: 0,2% 2-ME, pentasulfonát sodný v methanolu, pH 2,8	ICP-MS	AnorgHg: 0,2 ug/l MethylHg: 0,2 ug/l EthylHg: 0,3 ug/l	49
Extrakce roztokem HCl s 2-ME a KCl.	ryby a hovězí játra	RP HPLC, kolona C18, MF: 5% methanol, 0,1% 2-ME a 0,06 mol/l octan amonný	ICP-MS	AnorgHg: 0,2 ug/l MethylHg: 0,2 ug/l	48
Extrakce roztokem HCl s 2-ME a L-cysteinem.	ryby, mušle, chobotnice	RP HPLC, kolona C8 MF: 0,05% 2-ME, 0,4% L-cystein a 0,06 mol/l octan amonný	ICP-MS	AnorgHg: 0,25 ng/g MethylHg: 0,1 ng/g EthylHg: 0,2 ng/g	50
Hydrolyza KOH v methanolu, okyselení HCl, přidávek roztoku KBr a CuSO ₄ a dichlormethanu. Po odstředění přidávek roztoku Na ₂ S ₂ O ₃ do organické fáze a extrakce do vodné fáze.	ryby, mušle, měkkýši	RP HPLC, MF: 50% methanol, 10 mmol/l bromid tetrabutyl amonný, 0,1 mol/l NaCl	CV-AFS	AnorgHg: 0,3 ng MethylHg: 0,2 ng EthylHg: 0,17 ng FenylHg: 0,14 ng	61
Hydrolyza přes noc roztokem KOH v methanolu, extrakce dichlormethanem a HCl. Po odstředění přidávek roztoku Na ₂ S ₂ O ₃ do organické fáze a nástřík vodné fáze na kolonu.	mořské ryby, škeble	RP HPLC, MF: 3% acetonitril, 240 mmol/l octan amonný, 0,01 % 2-ME	AFS	AnorgHg: 0,085 ug/l MethylHg: 0,033 ug/l EthylHg: 0,029 ug/l FenylHg: 0,038 ug/l	59
Extrakce HCl s podporou ultrazvuku, neutralizace supernatantu NaOH, pufrace octanovým pufrém na pH 4,3. Prekoncentrace na mikrokolonkách (tabákový filtr modifikovaný Cu ²⁺ ionty v dithiokarbamátu pyridin amonném), eluce rtuti na HPLC kolonu methanolem.	potravin mořského původu	RP HPLC, MF: methanol:acetonitril:voda (45:33:22), 0,01% dithiokarbamát pyroliidium amonný	UV	AnorgHg, MethylHg, EthylHg a FenylHg: 10-25 ng/g	46
Extrakce v mikrovlnném poli roztokem obsahujícím HCl, citronovou kys. a methanol, přidávek NaOH pro supernatant o pH 3 a přidání 2-merkaptioethanolu.	zoobenthos	RP HPLC, kolona C18, MF voda:methanol (65:35)	CV-AFS	MethylHg: 4,3 ug/l EthylHg: 1,4 ug/l AnorgHg: 0,8 ug/l FenylHg: 0,8 ug/l	47
Extrakce roztokem HCl, 2-ME a L-cysteinu v ultrazvukové lázni.	krv	RP HPLC, kolona C18, MF: 0,05% 2-ME, 0,4% L-cystein a 0,06 mol/l octan amonný a 5% methanol	ICP-MS	AnorgHg: 0,25 ug/l MethylHg: 0,1 ug/l	53

Pokračování tabulky I

Extrakční činidlo a postup	Vzorky	Způsob separace	Detekce	Mez detekce, koncentrační rozsah	Lit.
Extrakce HCl (3 mol/l) s podporou mikrovlnného pole při 100 °C. Úprava pH. Přídavek tetrafenylboritanu sodného k supernatantu a následná SPME.	biologické materiály, ryby	GC, kapilární kolona, tloušťka filmu 0,25 μm	AES	AnorgHg: 0,86 ng/ml MethylHg: 0,12 ng/ml	64
Extrakce 2-ME v methanolu s podporou mikrovlnného pole při 60 °C, naředění supernatantu mobilní fází.	ryby, mouky	RP HPLC, kolona C8, MF: 0,5% 2-ME v 5% methanolu, pH 4,7	CV-ICP-MS	AnorgHg: 0,004 ng/ml MethylHg: 0,003 ng/ml EthylHg: 0,006 ng/ml	67
Extrakce roztokem octové kyseliny (17 mol/l), tetrafenylboritanu sodného a toluenu s podporou mikrovlnného pole při 100 °C.	rybí tkáň	GC, kapilární kolona, tloušťka filmu 0,25 μm	AED	neuveдено	78

konverze AnorgHg na MethylHg byla pozorována i během extrakce nadkritickou tekutinou³⁹, např. oxidem uhličitým modifikovaným methanolem⁴⁰.

První práce zabývající se extrakcí rtuti pro speciální analýzu pocházejí z 60. let minulého století. V té době nebyly k dispozici prvkově selektivní způsoby detekce, proto bylo nutno pečlivě provést extrakci. První metodika speciální analýzy byla popsána v roce 1966 Gunnelem Westööm, který se jako jeden z prvních zabýval odlišením anorganicky a organicky vázané rtuti v mořských rybách. Jelikož je tato metodika základem řady jiných postupů, bude popsána detailněji. Vzorek tkáň se homogenizuje a naředí vodou, specíe rtuti se ze vzorku uvolní koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a následně jsou do benzenu extrahovány organické sloučeniny rtuti, AnorgHg zůstává ve vodném roztoku. Z organického roztoku se sloučeniny rtuti reextrahují do vodného roztoku sulfidu amonného a oddělí se tak od ostatních nepolárních látek. Organické specíe jsou po okyselení vodné fáze znovu extrahovány do benzenu a po vysušení je možné extrakt analyzovat metodou GC s ECD detekcí^{12,41}. Klasický Westöömův postup pro specifickou extrakci MethylHg ze vzorků biologických materiálů shledal během let řadu inovací. Toxický benzen je často nahrazován méně toxickým toluenem nebo dichlormethanem a k převodu do vodné fáze je často používán cystein nebo thiosíran sodný^{41,42}.

V případě použití prvkově selektivní detekce (AFS, ICP-MS) lze postup extrakce velmi zjednodušit. Základním postupem je extrakce roztokem kyseliny chlorovodíkové⁴³, který může být modifikován přídavkem dalších látek. K maskování spoluextrahovaných iontů Fe³⁺ lze např. přidat citronovou kyselinu⁴⁴. Častěji se ale přidávají látky stabilizující specíe rtuti. Mezi ně patří zejména 2-merkapt ethanol (2-ME), který bývá často současně i složkou mobilní fáze v LC. V takovém případě nemusí být před nástřikem do chromatografické kolony upravováno pH extraktu a je také snižován paměťový efekt celého systému^{45,46}. Při extrakci pomocí 2-ME dochází ke vzniku stabilních sloučenin jednotlivých specií rtuti s 2-ME vznikem

merkaptidů obsahujících vazbu Hg–S (cit.⁴⁷): v případě AnorgHg se jedná o sloučeninu (HOCH₂CH₂S)₂Hg, v případě MethylHg o sloučeninu CH₃HgSCH₂CH₂OH apod. Anorganicky i organicky vázaná rtuť tak může být kvantitativně extrahována z různých biologických materiálů živočišného původu v koncentračních rozsazích jednotky až setiny mg kg⁻¹ jednotlivých specií rtuti.

Další často používanou stabilizující látkou je L-cystein, tvořící se speciemi rtuti analogické merkaptidy: s AnorgHg Cys-S-Hg-S-Cys a s MethylHg Cys-S-Hg-CH₃ (cit.⁴⁷⁻⁴⁹). Obě tyto látky lze používat i v kombinaci, např. extrakčním činidlem obsahujícím kyselinu chlorovodíkovou, 2-ME a L-cystein se podařilo kvantitativně extrahovat AnorgHg a MethylHg ze vzorků krve obsahujících tyto specíe v jednotkách až desítkách μg l⁻¹ (cit.⁵⁰). Kromě extrakce do kapalného roztoku lze vznik stabilních sloučenin specií rtuti s L-cysteinem využít i k izolaci těchto specií např. v mikrodifuzní cele obsahující papírový filtr impregnovaný cysteinem. Zachycená MethylHg je z filtru extrahována do toluenu⁵¹.

Pro specifickou extrakci alkylovaných forem rtuti z biologických matric živočišného původu s obsahem těchto specií v jednotkách až stovkách μg kg⁻¹ lze použít alkalickou hydrolyzu roztokem hydroxidu draselného⁵², účinnost hydrolyzy může být zvýšena použitím magnetické míchačky⁵³ či ultrazvuku⁵⁴. Získaný alkalický hydrolyzát je ovšem nutné před dalším zpracováním, zejména derivatizací pro GC, neutralizovat kyselinou chlorovodíkovou. Přídavek kyseliny chlorovodíkové také rozruší organické sloučeniny rtuti obsahující sulfidické vazby a tím dojde k jejich převodu na chloridy. Pro zamezení vzniku pěny a uvolňování tepla je ke vzorku přidáván bromid draselný v roztoku síranu měďnatého. Tato směs také pomáhá uvolnit organosloučeniny rtuti a zároveň zabraňuje konverzi mezi speciemi během transformace organosloučenin rtuti na jejich chloridy. Zvyšuje také účinnost derivatizace v případě aplikace GC (cit.⁵⁵). Byly však popsány i varianty postupu bez přídavku těchto látek⁵⁶. Uvolněné chloridy organosloučenin rtuti jsou následně extrahovány do toluenu

nu, odkud jsou jednotlivé specie rtuti reextrahovány do roztoku thiosíranu sodného. Popsaný extrakční postup lze modifikovat náhradou toluenu dichlormethanem^{57,58} či roztokem dithionu v toluenu⁵⁹. Alternativou k vodnému roztoku hydroxidu je použití methanolického roztoku hydroxidu draselného nebo roztok hydroxidu tetramethylamonného (TMAH)⁶⁰.

Kromě extrakce probíhající třepáním vzorku s extrakčním činidlem za běžných laboratorních podmínek lze extrakce provádět i v uzavřených systémech umístěných ve vysokotlakém mikrovlnném mineralizátoru při mírně zvýšené teplotě (50–100 °C). Tento postup lze aplikovat i v případě extrakci roztoky kyseliny chlorovodíkové^{44,61} nebo TMAH^{55,62,63}, jeho předností je však to, že lze použít i mírnější extrakční činidla kompatibilní se složením mobilní fáze aplikované v následné separaci specií rtuti. Těmi může být např. roztok EDTA a 2-ME v methanolu⁴⁶ nebo pouze roztok 2-ME v methanolu⁶⁴.

5. Úpravy vzorku pro plynovou chromatografii – derivatizace specií

V případě, kdy pro separaci vyextrahovaných specií rtuti je použita GC, musí být veškeré specie převedeny na těkavé termicky stabilní deriváty. Během derivatizace nesmí dojít ke změně či porušení původních vazeb v analyzovaných chemických formách rtuti, jejich vzájemné konverzi a musí být zachována jejich separovatelnost.

Základním způsobem derivatizace specií rtuti je jejich alkylace Grignardovými činidly v nevodném prostředí. Nejběžněji je používán butylmagnesium chlorid^{65–68}, který AnorgHg převede na dibutylrtuť, MethylHg na methylbutyl rtuť apod. Další variantou derivatizace, jejíž využití v současné době převládá, je alkylace specií rtuti tetraalkylboritany. Výhodou této metody je, že reakce probíhá ve vodném, mírně kyselém prostředí. Běžně je prováděná derivatizace tetraethylboritanem sodným^{53,57,62,69,70}, při které vznikají ethylderiváty specií (diethylrtuť z původní AnorgHg, methylethylrtuť z původní MethylHg apod.), dále tetrapropylboritanem sodným^{55,71–73}, která vede ke vzniku propylderivátů, či tetrafenylboritanem sodným, u níž vznikají fenylderiváty specií^{43,54,70}. Nevýhodou derivatizace pomocí tetraethylboritanu sodného je nemožnost případného stanovení ethylrtuti, která se stává neodlišitelnou od AnorgHg. Jestliže má být stanoven i obsah ethylrtuti, je potřeba provést derivatizaci s tetrapropylboritanem sodným či tetrafenylboritanem sodným. Při derivatizaci tetraalkylboritany sodnými se nejprve upraví pH extraktu na hodnotu 4–6, následně se přidá roztok tetraalkylboritanu sodného a po promíchání jsou derivatizované specie extrahovány do organického rozpouštědla, nejčastěji *n*-heptanu⁵⁵, hexanu^{53,57,62,71} nebo jsou zakoncentrovány na SPME vláknu^{43,54}. Kromě těchto dvou základních přístupů lze využít i jiné způsoby alkylace, např. pomocí tetraethylboromagnesiumbromidu (BrMgEt₄B)⁷⁴. Zajímavou aplikací je i simultánní extrakce a derivatizace v uzavřeném systému mikrovlnného mineralizátoru pomoci

ci směsi zředěné octové kyseliny, tetrafenylboritanu sodného a toluenu⁷⁵.

6. Závěr

Optimální postup přípravy biologických vzorků pro speciální analýzu rtuti plynovou či kapalinovou chromatografií by měl být následující: vzorky by měly být odebírány do borosilikátového skla či do vzorkovnic z PET či teflonu. Po odběru by měl být biologický materiál zakonzervován vhodným konzervačním činidlem (kyselina chlorovodíková, L-cystein) případně lyofilizován či zamražen. Extrakce přítomných specií rtuti by měla být prováděna s ohledem na zvolenou separační metodu. V praxi se osvědčila extrakce zředěnou kyselinou chlorovodíkovou, okyseleným roztokem ethanolu, kyselinou octovou či acétátovým pufrem. Pro zlepšení extrakční účinnosti a stabilizaci specií rtuti extrakci lze přidávat látky, jako jsou L-cystein či 2-ME. Pro extrakci lze rovněž úspěšně aplikovat alkalickou hydrolyzu 35% roztokem hydroxidu draselného či ethanolickým roztokem hydroxidu draselného či tetraethylamonia. Pokud je separační technikou plynová chromatografie, musí být vyextrahované specie derivatizovány vhodným derivatizačním činidlem, např. Grignardovými činidly či tetraalkylboritany. Pro detekci lze použít jak prvkově selektivní metody detekce, jako jsou AAS, AFS, ICP-MS, tak prvkově neselektivní metody.

Tato práce vznikla za podpory badatelského grantu IGA AI_FCHI_2011_006.

LITERATURA

1. Pacyna E. G., Pacyna J. M., Sundseth K., Munthe J., Kindbom K., Wilson S., Steenhuisen F., Maxson P.: *Atmos. Environ.* **44**, 2487 (2010).
2. Feldman J., Salaun P., Lombi E.: *Environ. Chem.* **6**, 275 (2009).
3. Harrington C. F., Clought R., Hansen H. R., Hill S. J., Pergantis S. A., Tyson J. F.: *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, 999 (2009).
4. Choi A., Cordier S., Weihe P., Grandjean P.: *Crit. Rev. Toxicol.* **38**, 877 (2008).
5. Ullrich S. M., Tanton T. W., Abdrashitova S. A.: *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **31**, 241 (2001).
6. Merritt K. A., Amirbahman A.: *Earth. - Sci. Rew.* **96**, 54, (2009).
7. Munthe J., Lyvén B., Parkman H., Lee Y. H., Iverfeldt A., Haraldsson C., Verta M., Porvari P.: *Water, Air, Soil Pollut.: Focus* **1**, 385 (2001).
8. Millour S., Noël L., Kadar A., Chekri R., Vastel Ch., Sirov V., Leblanc J. C., Guérin T.: *Food Chem.* **126**, 1787 (2011).
9. Moreda-Pineiro J., Moreda-Pineiro A., Romarís-Hortas V., Moscoso-Pérez C., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Bermejo-Barrera P., Prada-Rodríguez D.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **30**, 324 (2011).

10. Tseng C. M., Amouroux D., Brindle I. D., Donard O. F. X.: *J. Environ. Monit.* 2, 603 (2000).
11. Carro A. M., Mejuto M. C.: *J. Chromatogr., A* 882, 283 (2000).
12. Westöö G.: *Acta Chem. Scand.* 20, 2131 (1966).
13. Díez S., Byaona J. M.: *Talanta* 77, 21 (2008).
14. Harrington Chris F.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 19, 213 (2000).
15. Boszke L.: *Chem. Anal. (Warsaw)* 50, 489 (2005).
16. Popp M., Hann S., Koellensperger G.: *Anal. Chim. Acta* 668, 114 (2010).
17. Gómez-Ariza J. L., Lorenzo F., García-Barrera T.: *J. Chromatogr., A* 1056, 139 (2004).
18. Margetinová J., Houserová-Pelcová P., Kuban V.: *Anal. Chim. Acta* 615, 115 (2008).
19. Qvarnström J., Tu Q., Frech W., Lüdke C.: *Analyst* 125, 1193 (2000).
20. Castillo A., Roing-Navarro A. F., Pozo O. J.: *Anal. Chim. Acta* 577, 18 (2006).
21. Martínez Blanco R., Tagle Villanueva M., Sánchez-Uría J. E., Sanz-Medel A.: *Anal. Chim. Acta* 419, 137 (2000).
22. Batista B. L., Rodrigues J. L., de Souza S. S., Souza V. C. O., Barbosa F.: *Food Chem.* 126, 2000 (2011).
23. de Wuilloud J. C. A., Wuilloud R. G., Silva M. F., Olsina R. A., Martínez L. D.: *Spectrochim. Acta, Part B* 57, 365 (2002).
24. Segade S. R., Tyson J. F.: *J. Anal. At. Spectrom.* 18, 268 (2003).
25. Segade S. R., Tyson J. F.: *Spectrochim. Acta, Part B* 58, 797 (2003).
26. Lingane J. J., Kline R. S.: *Anal. Chim. Acta* 15, 410 (1956).
27. Houserová P., Janák K., Kubáň P., Pavlíčková J., Kubáň V.: *Chem. Listy* 100, 862 (2006).
28. Yu L. P., Yan X. P.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 22, 254 (2003).
29. Baier R. W., Wojnowich L., Petrie L.: *Anal. Chem.* 47, 2464 (1975).
30. Rosain R. M., Wai C. M.: *Anal. Chim. Acta* 65, 279 (1973).
31. Lansens P., Meuleman C., Leermakers M., Baeyens W.: *Anal. Chim. Acta* 234, 417 (1990).
32. Feldman C.: *Anal. Chem.* 46, 99 (1974).
33. Carr R. A., Wilkniss P. E.: *Environ. Sci. Technol.* 7, 62 (1973).
34. Lo J. M., Wai C. M.: *Anal. Chem.* 47, 1869 (1975).
35. Toribara T. Y., Shields C. P., Koval L.: *Talanta* 17, 1025 (1970).
36. Baltisberger R. J., Hildebrand D. A., Griebel D., Ballantine T. A.: *Anal. Chim. Acta* 111, 111 (1979).
37. Devai I., Delaune R. D., Patrick W. H., Gambrell R. P.: *Org. Geochem.* 32, 755 (2001).
38. Horvat M., Byrne A. R.: *Analyst* 117, 665 (1992).
39. Falter R., Hintelmann H., Quevauviller P.: *Chemosphere* 39, 1039 (1999).
40. Wai C. M., Lin Y., Brauer R., Wang S., Beckert W. F.: *Talanta* 40, 1325 (1993).
41. Westöö G.: *Acta Chem. Scand.* 21, 1790 (1967).
42. Bramanti E., Lomonte C., Onor M., Zamboni R., D'Ulivo A., Raspi G.: *Talanta* 66, 762 (2005).
43. Dong L. M., Yan X. P., Li Y., Jiang Y., Wang S. W., Jiang D. Q.: *J. Chromatogr., A* 1036, 119 (2004).
44. Margetinová J., Houserová Pelcová P., Kubáň V.: *Anal. Chim. Acta* 615, 115 (2008).
45. Meng W., Weiyue F., Junwen S., Fang Z., Bing W., Motao Z., Bai L., Yuliang Z., Zhifang Ch.: *Talanta* 71, 2034 (2007).
46. Chang L. F., Jiang S. J., Sahayam A. C.: *J. Chromatogr., A* 1176, 143 (2007).
47. Kollotzek D., Oechsle D., Kaiser G., Tschöpel P., Tölg G.: *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 318, 485 (1984).
48. Bridge C. C., Joshee L., Zalups R. K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 251, 50 (2010).
49. Krupp E. M., Milne B. F., Mestrot A., Meharg A. A., Feldmann J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 1753 (2008).
50. Rodrigues J. L., de Souza S. S., De Oliveria Souza V. C., Barbarosa F. Jr.: *Talanta* 80, 1158 (2010).
51. Miklavčič A., Stibilj V., Heath E., Polak T., Trarnik J. S., Klavž J., Mazej D., Horvat M.: *Food Chem.* 124, 711 (2011).
52. Yan L., Shu-Juan L., Dong-Qing J., Yan, Xiu-Ping Y.: *Chin. J. Anal. Chem.* 36, 793 (2008).
53. Sanz Landaluze J., de Diego A., Raposo J. C., Madariaga J. M.: *Anal. Chim. Acta* 508, 107 (2004).
54. Mishra S., Tripathi R. M., Bhalke S., Shukla V. K., Puranik V. D.: *Anal. Chim. Acta* 551, 192 (2005).
55. Syr-Song Ch., Shinu-Shou Ch., Deng-Fwu H.: *J. Chromatogr., A* 1024, 209 (2004).
56. Yin Y., Liu J., He B., Shi J., Jiang G.: *J. Chromatogr., A* 1181, 77 (2008).
57. Gómez-Ariza J. L., Lorenzo F., García-Barrera T.: *Chemosphere* 61, 1401 (2005).
58. Liang L. N., Jiang G. B., Liu J. F., Hu J. T.: *Anal. Chim. Acta* 447, 131 (2003).
59. Voegborlo R. B., Matsuyama A., Asimado A. A., Akagi H.: *Food Chem.* 124, 1244 (2011).
60. Gao Y., De Galan S., De Brauwere A., Baeyens W., Leermakers M.: *Talanta* 82, 1919 (2010).
61. Rodil R., Carro A. M., Lorenzo R. A., Abuin M., Cela R.: *J. Chromatogr., A* 963, 313, 2002.
62. Nevado B. J. J., Martín-Doimeadios R. C. R., Bernardo G. F. J., Moreno M. J.: *J. Chromatogr., A* 1093, 21 (2005).
63. Gerbersmann C., Heisterkamp M., Adams C. F., Broekaert J. A. C.: *Anal. Chim. Acta* 350, 273 (1997).
64. Lin L. Y., Chang L. F., Jiang S. J.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 6868 (2008).
65. Fernández R. G., Bayón M. M., Alonso I. G., Sanz-Medel A.: *J. Mass Spectrom.* 35, 639 (2000).
66. Qvarnström, Lambertsson L., Havarinasab S., Hultman P., Frech W.: *Anal. Chem.* 75, 4120 (2003).
67. Velado O. G. N., Pereiro R., Sanz-Medel A.: *J. Anal. At. Spectrom.* 15, 49 (2000).
68. Erteborg H., Snell J., Qian J., French W.: *Chemosphere* 39, 1137 (1999).

69. Nevado B. J. J., Martín-Doimeadios R. C. R., Krupp E. M., Bernardo F. J. G., Farinas N. R., Moreno M. J., Wallace D., Roperio M. J. P.: *J. Chromatogr., A* 1218, 4545 (2011).
70. Kuballa T., Leonhardt E., Schoeberl K., Lachenmeier D. W.: *Eur. Food Res. Technol.* 228, 425 (2009).
71. Ito R., Kawaguchi M., Sakui N., Honda H., Okanouchi N., Saito K.: *J. Chromatogr., A* 1209, 267 (2008).
72. Gibičar D., Logar M., Horvat N., Marn-Pernat A., Ponikvar R., Horvat M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 329 (2007).
73. Huang J. H.: *Anal. Chim. Acta* 532, 113 (2005).
74. Nsengimana H., Cukrowska E. M., Dinsmore A., Tessier E., Amouroux D.: *J. Sep. Sci.* 32, 2426 (2009).
75. Abuin M., Carro, A. M., Lorenzo R. A.: *J. Chromatogr., A* 889, 185 (2000).

K. Mališová and O. Mestek (*Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*):
Preparation of Biological Samples for Speciation Analysis of Mercury by Gas and Liquid Chromatography

Mercury is one of the most dangerous environmental pollutants. Its toxicity depends on the mercury species present. Sample storage, methods of extraction of Hg species and their derivatization for GC are described and discussed.