

STANOVENÍ CH₃Hg SKUPIN V RYBÍM MASE METODOU HPLC S UV DETEKČÍ

JIŘÍ ŠPIČKA, LUBOMÍR SVOBODA
a DAGMAR JANOUŠKOVÁ

Katedra chemie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
e-mail: spicka@zf.jcu.cz

Došlo 31.5.02, přepracováno 10.12.02, přijato 29.5.03.

Klíčová slova: methylrtuť, extrakce tuhou fází, HPLC, ryby

Úvod

Vysoká toxicita organických sloučenin rtuti, vyskytujících se v přírodních materiálech včetně některých potravin, vedla ke značnému zájmu o jejich stanovení. Nejvýznamnější organické sloučeniny rtuti, s kterými se setkává toxikolog, jsou methylhydrargyrioderiváty obsahující skupinu CH₃Hg.

Pro stanovení CH₃Hg skupiny v biologickém materiálu byla v průběhu let vypracována celá řada analytických postupů. Nejčastěji využívané metody obvykle zahrnují tři stupně. Prvním je uvolnění CH₃Hg skupiny z vazby na proteiny, následuje přečištění a často i zakoncentrování analytu. Posledním stupněm je obvykle chromatografická analýza s vhodnou detekcí.

Pro uvolnění CH₃Hg skupin z vazby na biologické materiály, kde jsou vázány zejména na thiolové skupiny proteinů, se doporučuje extrakce koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Vzniká tak methylhydrargyriumchlorid CH₃HgCl (cit.¹). Pro některé materiály (rybí tkáň, vlasy) je někdy využívána alkalická hydrolyza, při níž se štěpí tuky a bílkoviny. Usnadní se tak uvolnění CH₃Hg skupiny²⁻⁴.

Pro oddělení, zakoncentrování a přečištění analytu stále převažují metody využívající extrakci z kapaliny do kapaliny. Při klasickém postupu je methylhydrargyriumchlorid nejprve extrahován z vodné fáze do organického nepolárního rozpouštědla, nejčastěji toluenu nebo chloroformu. Následuje další přečištění reextrakcí do vodného roztoku thiosíranu sodného. Při tomto postupu ovšem dochází ke značným ztrátám analytu. Jsou uváděny i více než 60% úbytky^{2,5-7}.

Perspektivnější se jeví využití techniky extrakce tuhou fází (SPE). Methylhydrargyriumchlorid je reakcí s vhodným činidlem převeden na nepolární sloučeninu, kterou lze na SPE kolonkách s fází C18 dobře zachytit. Běžně se používá APDC (amonná sůl pyrrolidin-1-yl-dithiokarbamátu)^{5,8}.

Pro vlastní stanovení CH₃Hg skupiny je dosud využívána technika plynové chromatografie, ale v posledních letech je preferována metoda HPLC s obrácenou fází⁸. Izolované methylhydrargyriosloučeniny musí být pro tuto techniku převedeny na nepolární látky. Užívá se dithiokarbamát nebo dithizon^{5,9}. V této souvislosti je výhodné využití techniky SPE pro

přečištění a zakoncentrování analytu, protože takto získané vzorky lze přímo použít pro HPLC. Vzhledem k malým koncentracím CH₃Hg skupiny v přírodních vzorcích jsou v HPLC používány detektory s vysokou citlivostí. V současnosti je běžná AAS detekce (selektivní detektory na bázi studených par rtuti)^{5,10}. Objevuje se i využití MS detektorů, např. v kombinaci ICP-MS (cit.¹¹). Běžný UV/VIS detektor není bohužel pro popisované postupy příliš citlivý⁸.

V některých biologických materiálech, např. v rybím mase, lze ovšem očekávat poměrně vysoké koncentrace methylrtuťnatých sloučenin. Pokusili jsme se proto vyvinout postup, který by umožňoval stanovení CH₃Hg skupiny v uvedených materiálech s využitím běžného přístroje HPLC s UV/VIS detekcí.

Experimentální část

Použité přístroje a chemikálie

Měření byla prováděna na přístroji HPLC SpectraSYSTEM fy TSP (čerpadlo P2000 s UV/VIS detektorem UV3000HR). Použitá kolona byla typu C18 Res Elut-ENV 150×4,60 mm 4,5 μm fy Varian. Analyt byl izolován metodou SPE na zařízení VISIPREP fy Supelco s využitím kolonek LiChrolut RP18 – 500 mg fy Merck.

Pro přípravu mobilní fáze a izolaci extrakcí tuhou fází (SPE) byly použity acetonitril LiChrosolv (gradient grade), voda LiChrosolv, methanol p.a. a APDC (amonná sůl pyrrolidin-1-yl-dithiokarbamátu) fy Merck. Jako standard byl použit CH₃HgCl fy Johnson Matthey. Ostatní použité chemikálie byly běžné čistoty p.a.

H P L C a n a l ý z a

Podmínky HPLC analýzy jsou uvedeny v tabulce I.

Použitá koncentrace APDC v mobilní fázi představuje kompromis mezi uspokojivou opakovatelností analýzy a základem absorbancí mobilní fáze. Minimální použitelná koncentrace byla 3.10⁻⁵ mol.l⁻¹. Při nižších hodnotách již vymizel pík analytu. Základní absorbance použité mobilní fáze proti směsi acetonitril/voda (optická dráha 10 mm) byla 600 mAU při 249 nm.

Tabulka I
HPLC podmínky

Parametr	Hodnota
Použitá kolona	C18 Res Elut-ENV 150×4,60 mm 4,5 μm fy Varian
Složení mobilní fáze	acetonitril/voda 47/53 (v/v), APDC 5.10 ⁻⁵ mol.l ⁻¹
Průtok mobilní fáze	1,5 ml.min ⁻¹
Detekce	249 nm ^a
Objem nástřiku	20 μl

^a Lze pracovat i při 254 nm bez zásadního snížení odezvy detektoru

Izolace analytu

Vzhledem k nižší citlivosti při použití UV detekce bylo použito relativně větší množství vzorku. 10 g čerstvé rybí svaloviny bylo nejprve rozrušeno zahříváním při 60 °C se 40 ml hydroxidu sodného ($c = 3 \text{ mol.l}^{-1}$) po dobu 30 min. Analyt byl následně uvolněn z matrice po přidání 50 ml kyseliny chlorovodíkové ($c = 3 \text{ mol.l}^{-1}$) (pH směsi menší než 1) půlhodinovou extrakcí v ultrazvukové lázni. Proteiny ve směsi byly vysráženy upravením pH směsi na 3,5 roztokem NaOH a odfiltrovány. Oddělení proteinu je kritickou fází celého postupu, je proto nutné předem zjistit nejvhodnější pH pro určitou matici.

Analyt byl v dalším postupu izolován ze směsi metodou SPE. Parametry SPE jsou uvedeny v tabulce II. K filtrátu bylo přidáno 0,1 ml roztoku APDC ($c = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$). Získaný extrakt byl odpařen do sucha při 60 °C proudem dusíku a rozpuštěn v 0,2 ml mobilní fáze. Takto získaný vzorek byl přímo nastříkán do kapalinového chromatografu.

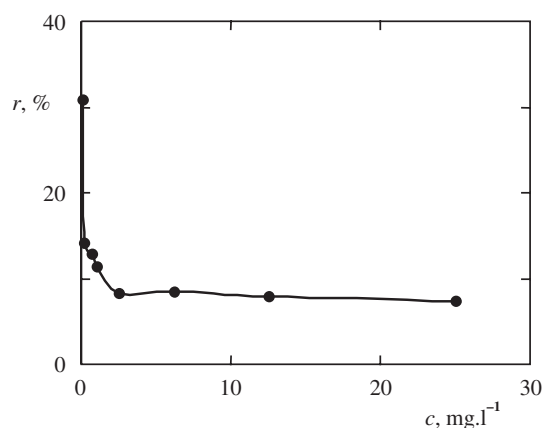
Tabulka II
Parametry SPE

Parametr	Hodnota
Kondicionace kolonky	3 ml H ₂ O
Sušení kolonky	15 min prosáváním vzduchu
Eluce analytu	2×0,5 ml CH ₃ OH

Výsledky a diskuse

Postup HPLC

Optimální parametry HPLC analýzy byly určeny s využitím roztoků CH₃HgCl. Analýza byla ověřována roztoky CH₃HgCl o koncentraci rtuti 0,125 až 25 mg.l⁻¹ na osmi hladinách při pěti opakováních. Relativní intervaly spolehlivosti ($P = 0,9$)



Obr. 1. Relativní interval spolehlivosti r (%) stanovení CH₃Hg při různé koncentraci c kalibračních roztoků

pro jednotlivé hladiny koncentrace jsou uvedeny na obr. 1, celkový koeficient korelace $R = 0,9987$.

Výsledky naznačují, že metoda je použitelná pro vyšší koncentrace CH₃Hg skupin. Mez stanovitelnosti pro relativní interval spolehlivosti 0,1 ($P = 0,9$) pro uvedené podmínky analýzy je 1,3 mg.l⁻¹.

Izolace analytu

Výtěžnost analytu v jednotlivých stupních analytického postupu byla testována na pěti hladinách koncentrace s pětinásobným opakováním na každé hladině. Stupeň SPE byl testován roztoky CH₃HgCl o koncentraci Hg 0,5 až 25 mg.l⁻¹, SPE s následným odpařením do sucha roztoky o koncentraci rtuti 0,1 až 5 mg.l⁻¹ a celý postup přidavkem CH₃HgCl v množství 0,1 až 5 µg Hg k 10 g čerstvé rybí svaloviny. Výtěžnost byla vyhodnocena regresní analýzou – stanovené množství Hg proti původnímu, resp. přidávanému množství Hg. Hodnoty regresních koeficientů pro jednotlivé stupně jsou uvedeny v tabulce III.

Podle uvedených výsledků nejsou ztráty analytu pro uvedený postup analýzy na hladině spolehlivosti $P = 0,9$ statisticky významné. Celková mez stanovitelnosti metody v přepočtu na vzorek o hmotnosti 10 g je pak 26 µg.kg⁻¹.

Tabulka III
Výtěžnost CH₃Hg skupin v jednotlivých stupních analytického postupu

Stupeň analýzy	Regresní koeficient ^a	Mez ($P = 0,9$)	
		dolní	horní
SPE	0,9917	0,9641	1,0193
SPE + odpar	0,9832	0,9527	1,0137
Vzorek s přidavkem	0,9819	0,9306	1,0332

^a Regresní koeficienty závislosti teoreticky přítomného a stanoveného množství Hg

Přesnost a správnost metody

Přesnost a správnost metody byla ověřována s využitím referenčního materiálu CRM 464 (tuňák), produktu BCR (Community Bureau of Reference) s deklarovaným obsahem CH₃Hg 5,50 mg.kg⁻¹ s intervalem spolehlivosti ($P = 0,95$) 0,17 mg.kg⁻¹.

Bylo provedeno pět paralelních stanovení při navázce vzorku 0,2 g. Poměr stanoveného a deklarovaného množství Hg byl 0,9371 s intervalem spolehlivosti ($P = 0,9$) 0,1183. Vzhledem k tomu, že poměr stanoveného a deklarovaného množství Hg je významně ($P = 0,9$) odlišný od 1,0, byly u reálných vzorků výsledky korigovány koeficientem 0,9371.

Praktická aplikace

Uvedená metoda byla použita pro stanovení CH₃Hg ve svalovině ryb z několika lokalit ČR. Výsledky jsou uvedeny v tabulce IV.

Ze 17 vzorků byl pouze v jednom případě zjištěn obsah

Tabulka IV

Koncentrace Hg ve formě CH₃Hg skupin ve svalovině ryb z několika lokalit ČR

Lokalita	Druh ryby	Počet vzorků	Koncentrace CH ₃ Hg [μg(Hg).kg ⁻¹]		
			průměr	minimum	maximum
Malše – vodní nádrž Římov	bolen dravý	4	33,4	26,5	43,2
	okoun říční	1	120	–	–
Vltava – Klecany	štika obecná	6	131	75,2	195
	okoun říční	2	132	68,4	195
Labe – Štětí	jelec tloušť	4	425	334	602

Hg mírně pod určenou mezí stanovitelnosti. Lze proto konstatovat, že metoda je pro uvedený typ materiálu použitelná. Použití ji lze i pro stanovení CH₃Hg skupin ve svalovině mořských ryb, případně i některých orgánech s nízkým obsahem tuku.

Srovnání s jinými postupy

Použitý postup při izolaci analytu se ve srovnání s re-extrakčními postupy^{2,5-7} vyznačuje vysokou výtěžností. Nevýhodou je nižší mez stanovitelnosti při UV detekci. Jako zajímavé se v této souvislosti jeví použití citlivějších detektorů^{5,10,11} ve spojení s popsáním izolačním postupem.

Závěr

Popsaná metoda je použitelná pro stanovení skupin CH₃Hg v biologických vzorcích, kde lze předpokládat jejich obsah minimálně v desítkách μg.kg⁻¹, a to s využitím běžné laboratorní techniky. Výhodou je zejména vysoká výtěžnost analytu.

Práce byla realizována s podporou grantu FRVŠ 0173/1999.

LITERATURA

1. Wilken R. D., Hinttelmann H., v knize: *Metal Speciation in the Environment* (Broekaert J. A. C., Grucer S., Adams F., ed.), NATO ASI Ser., sv. G23, str. 339. Springer-Verlag, Berlin 1990.
2. Vural N., Ünlü H.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 315 (1996).
3. Caricchia A. M., Minervini G., Soldati P., Chiavarini S., Ubaldi C., Morabito R.: *Microchem. J.* 55, 44 (1997).
4. Yoshinaga J., Morita M., Okamoto K.: *J. Anal. Chem.* 357, 279 (1997).
5. Aceto M., Foglizzo A. M., Mentasti E., Sacchero G., Sarzanini C.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 60, 1 (1995).
6. Cai Y., Tang G., Jaffé R., Jones R.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 68, 331 (1997).
7. Mizuishi K., Takeuchi M., Hobo T.: *Chromatographia* 44, 386 (1997).
8. Cela R., Lorenzo R. A., Mejuto M. C., Bollanu M. H., Boltana A., Rubi E., Medina M. I.: *Mikrochim. Acta* 109, 111 (1992).
9. Minagawa K., Sasaki T., Takizawa R., Kifune I.: *Anal. Chim. Acta* 115, 103 (1980).
10. Falter R., Schöler H. F.: *Chemosphere* 29, 1333 (1994).
11. Harrington C. F., Catterick T.: *J. Anal. At. Spectrom.* 2, 1053 (1997).

J. Špička, L. Svoboda, and D. Janoušková (*Department of Chemistry, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice*): **Determination of CH₃Hg Groups in Fish Muscle by HPLC with UV Detection**

An analytical method was developed for the determination of the CH₃Hg group content in fish muscles. CH₃HgCl was isolated by SPE and determined by HPLC with UV detection. The method can be used for samples with high CH₃Hg contents. The detection limit was 26 μg.kg⁻¹ in 10 g samples.