

UTILIZE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-COLD VAPOUR ATOMIC FLUORESCENCE SPECTROMETRY (HPLC/CV-AFS) FOR DETERMINATION OF MERCURY SPECIES IN BIOLOGICAL SAMPLES

VYUŽITÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE VE SPOJENÍ S ATOMOVOU FLUORESCENČNÍ SPEKTROMETRIÍ (HPLC/CV-AFS) PRO STANOVENÍ SPECIÍ RTUTI V BIOLOGICKÝCH MATERIÁLECH

Houserová P.¹, Kubáň V.¹, Kráčmar S.¹, Sitko J.²

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

²Muzeum Komenského Přerov, Horní náměstí 1, 751 52 Přerov, CZ

E-mail: pavlusa@centrum.cz

ABSTRACT

A method for the determination of inorganic mercury (Hg^{2+}), methylmercury (MeHg), ethylmercury (EtHg) and phenylmercury (PhHg) by high-performance liquid chromatography coupled with atomic fluorescence spectrometry (HPLC-CV-AFS) was proposed. Isocratic elution using a mobile phase containing 7% methanol and 0.05% 2-mercaptoethanol (pH = 5) at flow rate 0.15 ml min^{-1} was used for separation mercury species on a reverse phase Hypersil BDS C18 column. The limits of detection of HPLC-AFS system were estimated to 0.2 ppb (3%) for MeHg^+ , 0.07 ppb (5.3%) for inorganic Hg, 0.06 ppb (3.4%) for PhHg^+ and 0.12 ppb (4.4%) for EtHg with corresponding RSDs at $5 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ ($n = 10$) given in parentheses. The method was used for determination of mercury species in muscle, intestines, liver and kidney of three bird species – cormorant (*Phalacrocorax carbo*), great crested grebe (*Podiceps cristatus*) and european buzzard (*Buteo buteo*). Relative percentual contents of MeHg in muscle and intestines were in the range from 71.28 % to 93.74 % , in kidney from 63.33 % to 77.42 % and in liver from 17.99 % up to 62.75 % for all birds.

Keywords: total mercury, methylmercury, ethylmercury, phenylmercury, inorganic mercury, muscle, intestines, kidney, liver, *Phalacrocorax carbo*, *Podiceps cristatus*, *Buteo buteo*, AAS, HPLC-AFS

ABSTRAKT

Byla vyvinuta a optimalizována metoda pro stanovení anorganické rtuti (Hg^{2+}), methylrtuti (MeHg), ethylrtuti (EtHg) a fenylrtuti (PhHg) vysoce účinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s atomovou fluorescenční spektrometrií (HPLC/CV-AFS). Pro separaci specií rtuti

byla používána reverzní chromatografická stacionární fáze Hypersil BDS C18 a isokratická eluce mobilní fází obsahující 7% methanol a 0,05% 2-mercaptoethanol (pH = 5) při průtokové rychlosti 0.15 ml min^{-1} . Meze detekce a RSD hodnoty uvedené v závorkách (při $5 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, $n = 10$) byly 0,2 ppb (3%) pro MeHg^+ , 0,07 ppb (5,3%) pro anorganickou Hg, 0,06 ppb (3,4%) pro PhHg^+ and 0,12 ppb (4,4%) pro EtHg. Navržená metoda byla použita pro stanovení specií rtuti ve svalovině, střevech, játrech a ledvinách u kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*), potápky roháče (*Podiceps cristatus*) a káně lesní (*Buteo buteo*). Procentuální obsahy MeHg se u všech sledovaných ptáků pohybovaly ve svalovině a střevech v rozmezí od 71,28 % do 93,74 %, v ledvinách od 63,33 % do 77,42 % a v játrech od 17,99 % do 62,75 %.

Klíčová slova: celková rtuť, methylртуť, ethylртуť, fenylртуť, Hg^{2+} , svalovina, střeva, ledviny, játra, *Phalacrocorax carbo*, *Podiceps cristatus*, *Buteo buteo*, AAS, HPLC-AFS

ÚVOD

Rtuť patří mezi nejvíce toxické škodliviny vyskytující se v životním prostředí. Nejčastěji se v životním prostředí vyskytují anorganické chemické formy rtuti (páry rtuti, rtuťnaté a rtuťné soli) a její alkylované (méně častěji arylované) sloučeniny [1]. Z organokovových sloučenin rtuti se v životním prostředí nejčastěji objevují halogenidy methylrtuti, které jsou přibližně 10krát toxičtější než její anorganické formy, jsou neurotoxické a mají silnou tendenci se bioakumulovat v potravních řetězcích, zvláště ve vodních ekosystémech [2,3]. Kontaminace vodních ekosystémů rtutí nejvýznamněji ovlivňuje organismy na nejvyšších trofických úrovních potravní pyramidy. Koncentrace rtuti v rybožravých ptácích mohou dosahovat velmi vysokých úrovní a výrazně tak ovlivňovat jejich reprodukční schopnosti, imunitní a nervový systém. Vzhledem k velmi rozdílné ekologické toxicitě jednotlivých forem rtuti je důležité stanovovat ve složkách životního prostředí nejenom celkový obsah rtuti, ale také její jednotlivé formy.

Mezi nejčastěji používané techniky pro stanovení specií rtuti patří plynová a kapalinová chromatografie ve spojení s UV/VIS, atomovou absorpční, emisní a hmotnostní spektrometrickou detekcí [4,5]. Za vysoce citlivou a selektivní metodu pro stanovení specií rtuti je považována plynová nebo kapalinová chromatografie ve spojení s atomovou fluorescenční detekcí [6,7]. Separace specií rtuti kapalinovou chromatografií je výhodná hlavně z hlediska nenáročnosti přípravy vzorku, kdy není zapotřebí vzorek získaný po extrakci již dále zpracovávat (derivatizovat).

Cílem práce bylo optimalizovat robustní metodu pro stanovení specií rtuti v řadě biologických materiálů a přinést nové a zpřesňující údaje o akumulaci a biotransformaci jednotlivých specií rtuti.

METODIKA

Pro stanovení specií rtuti byl použit kapalinový chromatograf LC-200 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) vybavený vysokotlakou pumpou Series 200 LC, autosamplerem Series 200 a atomovým fluorescenčním detektorem PSA Millenium Merlin (P S Analytical Ltd., Orpington, GB). Eluent z chromatografické kolony po smísení s okyseleným roztokem bromidu/bromičnanu přecházel přes UV reaktor, který zajišťoval převedení všech specií rtuti na Hg^{2+} . Rtuťnaté sloučeniny byly dále redukovány reakcí s SnCl_2 na elementární rtuť. Z roztoku byla pára rtuti uvolněna probubláním v g-l separátoru, vysušena v PermaPure[®] membránové jednotce a detekována AFS při 253,65 nm. Výsledná data byla zpracována chromatografickým softwarem Clarity (verze 2.1, Data Apex, Praha, ČR). Pro extrakce byl používán ultrazvuk K5 (Kraintex, SR) a vysokotlaký mikrovlnný extraktor Ethos SEL (Milestone, Itálie). Optimalizované parametry stanovení jsou shrnuty v tabulce 1.

Pro stanovení celkové rtuti byl použit automatický atomový absorpční spektrometr AMA 254 (Altec, Praha, ČR).

Bioakumulace specií rtuti byla sledována ve vybraných tkáních (svalovině, střevě, játrech a ledvinách) u kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*), potápky roháče (*Podiceps cristatus*) a káně lesní (*Buteo buteo*) z lokality střední Moravy (Záhlinice u Přerova). Byly odebrány tkáně od 10 jedinců káně lesní, 16 jedinců potápky roháče (z nichž bylo 5 samic) a od 16 jedinců kormorána velkého (z nichž bylo 8 mláďat ve stáří asi 1 rok). Záměrně byly zvoleny 2 živočišné druhy živící se převážně rybami (kormorán velký, potápka roháč) a 1 živočišný druh (káně lesní) byl vybrán jako kontrolní skupina. Vzorčky byly odebrány v březnu 2003. Všechny odebrané tkáně byly zamrazeny, lyofilizovány a homogenizovány mlýnkem Grindomix GM 200 (Retsch GmbH & Co. KG, Německo). Stanovení celkové rtuti bylo prováděno na atomovém absorpčním spektrometru AMA 254 (Altec, Česká republika). Relativní směrodatná odchylka (RSD) a mez detekce (3S/N) byly 2.06 % (při $4,64 \pm 0,25 \text{ mg kg}^{-1}$, $n = 10$) a 0,05 ng.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Optimalizace HPLC-AFS

Optimalizace analytické metody se skládala z optimalizace extrakčního postupu, separační metody a detekčních podmínek. Ultrazvuková i mikrovlnná extrakce specií rtuti byla prováděna v přítomnosti řady extrakčních činidel (kyselina thiooctová, octová, chlorovodíková, cystein, 2-mercaptoethanol atd.). Extrakční účinnosti jednotlivých extrakčních činidel byly testovány pomocí referenčního materiálu DORM-2. Vliv jednotlivých extrakčních činidel na extrakční účinnosti je znázorněn v tabulce 2. Při použití mikrovlnné extrakce byly extrakční výtěžky přibližně o 10 % vyšší. Nejvyšší extrakční výtěžky byly získány při použití směsných extrakčních činidel na bázi kyseliny chlorovodíkové (6M HCl v přítomnosti 0,1; 0,5 a 1M NaCl nebo 5,8%ní HCl v přítomnosti 5%ní kyseliny thiooctové). RSD mikrovlnných extrakcí byla 4 %. Bylo zjištěno, že kyselina thiooctová negativně ovlivňuje analytický signál AFS detektoru (obr. 1). Negativní působení kys. thiooctové je pravděpodobně způsobeno velmi silnými komplexy se rtutí, které nejsou rozrušeny UV reaktorem. Jako nejvhodnější extrakční činidlo byla tedy zvolena směs 6M HCl s 0,1M NaCl. Stabilita specií v tomto extrakčním činidle byla ověřena analýzou referenčního materiálu DORM-2.

Při optimalizaci detekční metody bylo zjištěno, že některá organická rozpouštědla (acetonitril) zhašší fluorescenci rtuti. Vliv koncentrace acetonitrilu a methanolu na signál AFS detektoru je znázorněn na obr. 2.

Pro chromatografickou separaci specií rtuti byla použita modifikovaná metoda popsána [6]. Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu (5-45 % v/v) a 2-mercaptoethanolu (0,01 – 0,2 % v/v) v acetátovém pufru (pH = 5). Nejlepší separační účinnost chloridu methylrtuti (MeHg) a Hg^{2+} byla získána pokud mobilní fáze obsahoval 7%ní methanol (obr. 3). Vzrůstající koncentrace 2-mercaptoethanolu ovlivňovala citlivost stanovení MeHg i Hg^{2+} . Citlivost stanovení MeHg vzrostla 4krát a Hg^{2+} 1,5krát v prostředí 0,05 %ního 2-mercaptoethanolu v porovnání s 0,01%ním 2-mercaptoethanolem (obr.4).Vzrůstající koncentrace 2-mercaptoethanolu způsobovala také pokles rozlišení (R) těchto dvou specií (obr. 5). Navržená metoda nevyžaduje složitou přípravu vzorku a umožňuje stanovení ethylrtuti (EtHg) i fenylrtuti (PhHg), pokud je koncentrace methanolu v mobilní fázi od 15 minuty separace zvednuta na 100%. Mrtvý retenční čas byl 5 min. Výsledný chromatogram je znázorněn na obr.6.

Meze detekce a RSD (uvedené v závorkách pro konc. $5 \mu\text{g l}^{-1}$ a $n=10$) byly 0,2 ppb (3 %) pro MeHg, 0,07 ppb (5,3 %) pro Hg^{2+} , 0,06 ppb (3,4 %) pro PhHg a 0,12 ppb (4,4 %) pro

EtHg. Správnost výsledků byla kontrolována analýzou certifikovaného referenčního materiálu DORM-2 (Institute for National Measurement Standard, National Research Council, Canada) s obsahem MeHg $4,47 \pm 0,32 \text{ mg kg}^{-1}$ a obsahem celkové Hg $4,64 \pm 0,26 \text{ mg kg}^{-1}$. Výsledky byly v dobré shodě s certifikovanými hodnotami ($4,45 \pm 0,11$ a $4,60 \pm 0,13 \text{ mg kg}^{-1}$).

Analýza reálných vzorků

Navržená metoda byla použita pro stanovení specií rtuti ve svalovině, střevech, játrech a ledvinách u kormorána velkého, potápky roháče a káně lesní (obr. 8). Obsahy EtHg a PhHg byly u všech vzorků pod mezí detekce metody.

Nejvyšší obsahy celkové rtuti byly nalezeny ve všech testovaných tkáních kormorána velkého a nejnižší obsahy v tkáních káně lesní (obr.7). Toto pozorování souvisí se skladbou potravy zkoumaných druhů ptáků a bylo předpokládáno. Z uvedených výsledků (obr.8) vyplývá, že ve svalovině a ve střevech je u všech tří sledovaných druhů ptáků rtuť přítomna převážně ve své methylované formě (71,28 – 93,74 %).

Procentuální obsahy MeHg v játrech sledovaných ptáků byly v rozmezí od 15,3 % až do 62,1 %. Nízké obsahy organických forem rtuti v játrech jsou způsobeny biotransformačními procesy rtuti v játrech. Při statistickém porovnání procentuálních obsahů MeHg v játrech byly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi dospělou populací kormorána velkého a potápky roháče ($p < 0,0001$, ANOVA) i mezi dospělou populací kormorána velkého a káně lesní ($p < 0,001$, ANOVA).

Byly také nalezeny statisticky významné rozdíly ($p < 0,001$, ANOVA) mezi obsahem MeHg v játrech u dospělé populace kormorána velkého a u jeho mláďat. Je předpokládáno, že mláďata kormorána velkého pravděpodobně postrádají schopnost plně metabolizovat organické formy rtuti a tato schopnost se u nich vytváří až v pokročilejším věku. Obsah celkové rtuti v játrech byl u mláďat kormorána velkého 6krát nižší než v játrech dospělé populace.

V ledvinách se procentuální obsahy MeHg pohybovaly v rozmezí mezi 63,3 – 77,4 %.

ZÁVĚR

Byla optimalizována metoda pro vysoce citlivé, selektivní, správné a přesné stanovení specií rtuti. Metoda je vhodná pro stanovení specií rtuti v biologických materiálech i v jiných vzorcích životního prostředí. Navržená metoda je použitelná pro stanovení specií rtuti v jednotlivých orgánech u ptáků a sladkovodních ryb, v sedimentech a vodních rostlinách.

Metoda není vhodná pro stanovení specií rtuti ve vodách, které obsahují velmi nízké obsahy rtuti pohybující se pod mezí detekce přístroje.

Cílem výsledků této studie bylo také přinést nové a zpřesňující údaje o akumulaci a biotransformaci jednotlivých specií rtuti ve vybraných orgánech zkoumaných ptáků a přispět tak k lepšímu porozumění vlivu rtuti na vodní faunu. Zaznamenané výsledky ukazují statisticky významné rozdíly mezi obsahem MeHg v jednotlivých orgánech testovaných ptáků a výrazně odlišné obsahy celkové Hg v testovaných tkáních kormorána velkého hnízdícího blízko Záhlinic (ČR) v porovnání s kormorány hnízdícími v Japonsku (Tokyo, Lake Biwa) [8] a podél Carson River v Nevadě [9].

LITERATURA

- [1] Wheatley, B., Wyzga, R.: Water Air Soil Poll. 97, (1997) 5-7
- [2] Ikingura, J.R., Akagi, H.: The Science of the Total Envir. 234 (1999) 109-118
- [3] Fournier, F., Karasov, W.H., Kenow, K.P., Meyer, M.W., Hines, R.K.: CBP Part A 133 (2002) 703-714
- [4] Montes-Bazón M., DeNicola K., Caruso J.A.: J. Chromatografy A 1000 (2003) 457-475
- [5] Quarnstrom J., Tu Q., Frech W., Ludke C.: Analyst 125 (2000) 1193-1197
- [6] Ramalhosa E., Rio-Segade S., Pereira E., Vale C., Duarte A.: Anal. Chim. Acta 448 (2001) 135-143
- [7] Leermakers M., Nguyen H.L., Kurunczi S., Vanneste B., Galletti S., Baeyens W.: Anal. Bioanal. Chem. 377 (2003) 327-333.
- [8] Saeki K., Okabe Y., Kim E.-Y., Tanabe S., Fukuda M., Tatsukawa R.: Environm. Pollut. 108 (2000) 249-255.
- [9] Henny C.J., Hill E.F., Hoffmann D.J., Spalfing M.G., Grove R.A.: Ecotoxicol. 11 (2002) 213-231.

Tabulka 2: Extrakční účinnosti jednotlivých extrakčních činidel

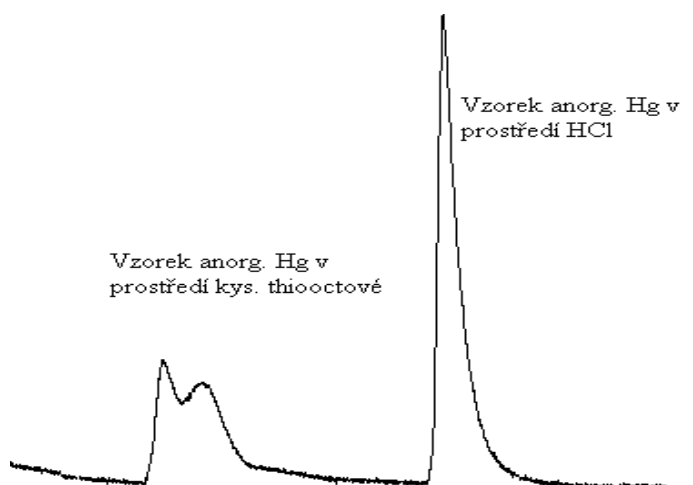
Extrakční činidlo	Výtěžek [%]	Extrakční činidlo	Výtěžek [%]
0,05% cystein + 0,05% ME, ultrazv.	16	5% TAA + 5,8% HCl, MWAE	91
5% kys. octová, ultrazv.	35	6M HCl, MWAE	75
14% HCl, ultrazv.	67	6M HCl + 0,1M NaCl, MWAE	97
1,5% cystein + 5,8% HCl, ultrazv.	73	6M HCl + 0,5M NaCl, MWAE	97
5% TAA + 5,8% HCl, ultrazv.	80	6M HCl + 1,0M NaCl, MWAE	99

ME-2-mercaptoethanol, TAA-thiooctová kyselina, ultrazv.-ultrazvuková extrakce, MWAE-mikrovlňná extrakce

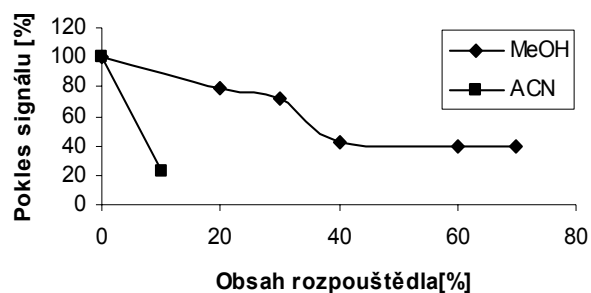
Tabulka 1: Experimentální podmínky HPLC, AFS, AMA, MWE (mikrovlnné extrakce)

HPLC	
Kolona	Hypersil BDS C18, 2*125 mm, 3 μ m (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA)
Mobilní fáze	7% (v/v) CH ₃ OH, 0,05% (v/v) 2-mercaptoethanol v acetátovém pufru pH = 5, 100%ní MeOH od 15 min separace
Průtoková rychlost	0,15 ml min ⁻¹
Injektovaný objem	100 μ l
AFS	
Oxidační činidlo	0,002 M KBr/KBrO ₃ v 5% HCl, (0,004% hydroxylamin hydrochlorid) průtoková rychlost 2,5 ml min ⁻¹
Redukční činidlo	2% (m/v) SnCl ₂ v 10% HCl, průtoková rychlost 2,5 ml min ⁻¹
MWE	
Doba extrakce	10 min
Teplota	55 °C
Výkon	400 W
Extrakční činidlo	10 ml roztoku 6M HCl + 0,1M NaCl
AMA	
Sušení	90 s při 120 °C
Rozklad	180 s při 550 °C
Vlnová délka	253,65 nm

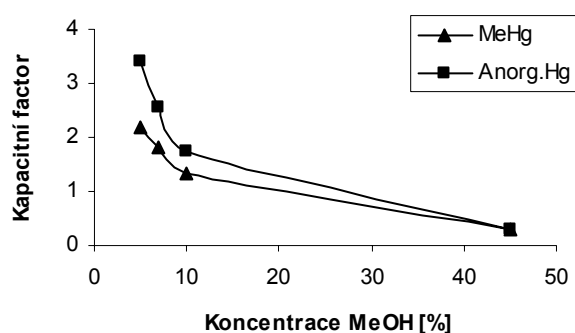
Obr. 1: Vliv kyseliny thiooctové na analytický signál AFS



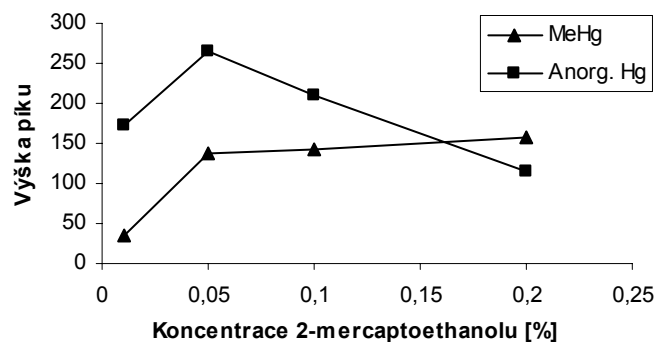
Obr. 2: Závislost analytického signálu Hg (10 ppb) na obsahu org. rozpouštědla (acetonitril, methanol v %) při FIA-AFS



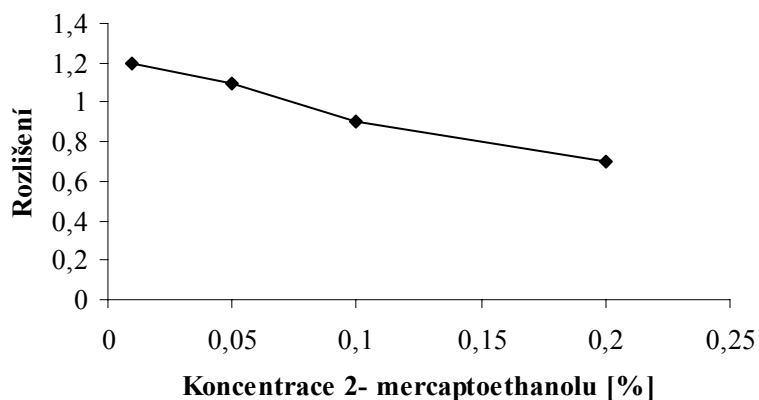
Obr. 3: Závislost kapacitních faktorů MeHg a Hg^{2+} (30 ppb) na obsahu MeOH [%] v mob. fázi



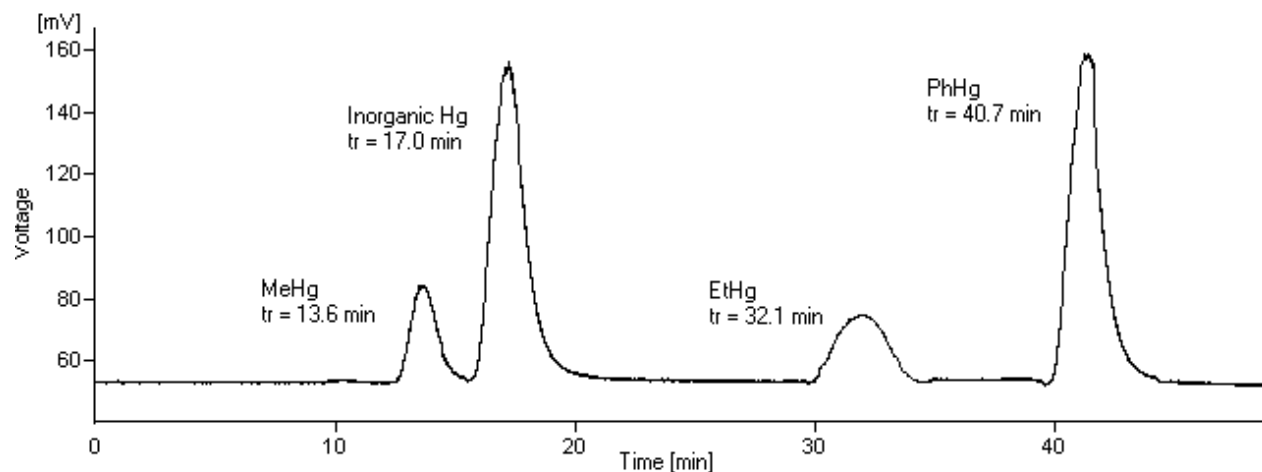
Obr. 4: Závislost analyt. signálu (30 ppb) na konc. 2-mercaptoethanolu [%]



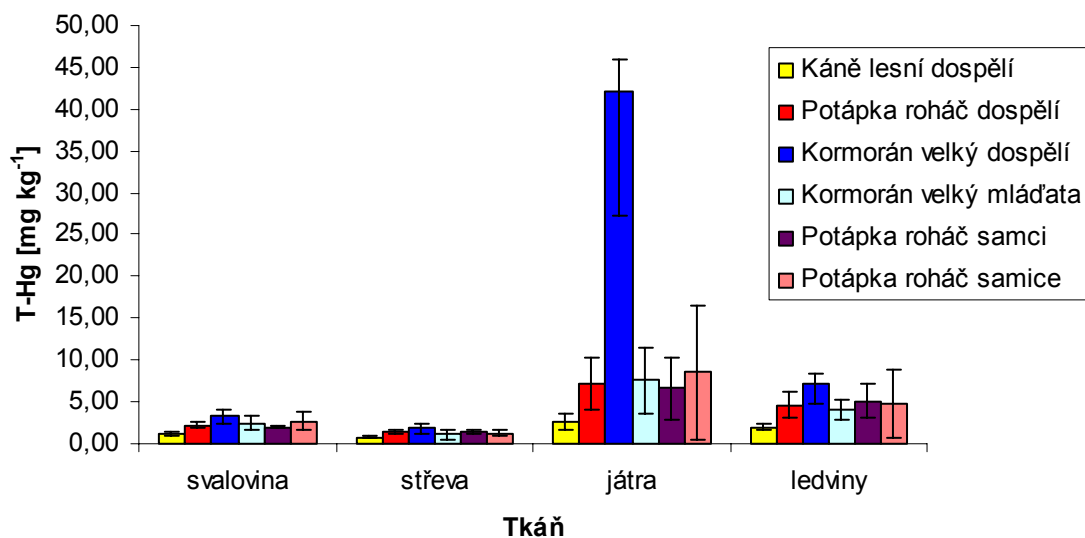
Obr. 5: Vliv koncentrace 2-mercaptoethanolu [%] na rozlišení MeHg a Hg^{2+}



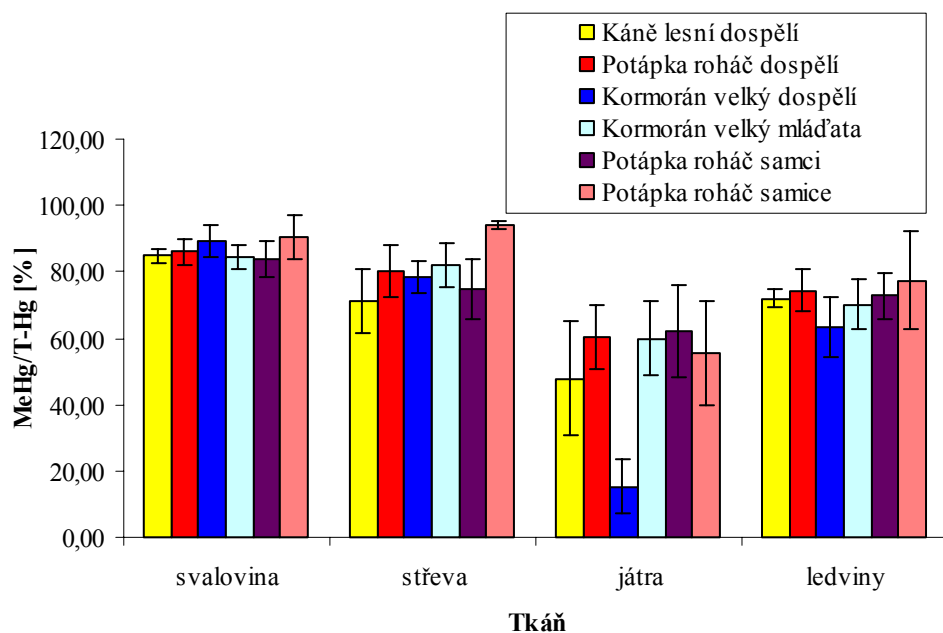
Obr. 6: Chromatogram MeHg, Hg^{2+} , EtHg, PhHg (30ppb v 1,2M HCl a 0,02M NaCl) při stanovení HPLC-AFS



Obr. 7: Závislost obsahu celkové Hg [mg kg^{-1}] na tkáních ptáků



Obr. 8: Závislost poměru MeHg/T-Hg [%] na tkáních ptáků



Příspěvek je řešen v rámci grantu Grantové agentury České republiky (GAČR 525/03/1367) a výzkumného záměru MSM 432100001.