

STANOVENIE ŠPÉCIÍ ORTUTE V ĽUDSKEJ KRVI TANDEMOM GC-ICP-MS

**RASTISLAV SERBIN, IVETA UHNÁKOVÁ,
ZUZANA HUŠEKOVÁ a MONIKA URSÍNÝOVÁ**

*Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave, Limbová
12, 833 03 Bratislava 37
rastislav.serbin@szu.sk*

Došlo 19.10.10, prepracované 28.2.11, prijaté 28.4.11.

Kľúčové slová: metylortuť, ortuť, krv, špeciácia,
GC-ICP-MS

Úvod

Ortuť je chemický prvok, ktorého toxicita závisí od jeho chemickej a fyzikálnej formy a spôsobu expozície. Všeobecne, toxicita foriem ortute stúpa od elementárnej ortute cez anorganické soli ortute až po jej najtoxickejšie organické formy, ako sú metylortuť, etylortuť atď., pričom najtoxickejšia forma je dimethylortuť. Rozdielna toxicita foriem ortute je spôsobená ich rozdielnou absorpciou v organizme a tiež ich rozdielnou schopnosťou prechodu cez membrány. Elementárna ortuť a zlúčeniny metylortute majú väčšiu schopnosť prechodu cez bunkové membrány ako ortuťné a ortuťnaté soli, v dôsledku čoho sú aj viac neurotoxicke. Ortuť ľahko prechádza cez placentu, čím môže dochádzať k expozícii plodu ortuťou uvoľňujúcou sa z depozitu matky, napr. z amalgámových plomb¹. Podľa experimentálnych údajov je placenta viac permeabilná pre kovovú ortuť podanú intravenózne než pre jej anorganické soli².

Methylortuť (MeHg) má u ľudí výrazné nežiaduce neurologické účinky. Veľké množstvo MeHg nachádzajúcej sa v ľudskom tele sa akumuluje v mozgu (98 %), čo predstavuje zvýšené riziko pre CNS². Chronická prenatálna expozícia MeHg môže viesť k neurologickým poruchám (prenatálna intoxikácia v Minamate v Japonsku^{1,3}) vrátane porúch reči, učenia a pozornosti⁴. V menšom rozsahu môže viesť expozícia MeHg k motorickým poruchám a poruchám priestorového videnia⁵.

Stopové a ultrastopové stanovenie ortute je možné realizovať použitím analytických metód lišiacich sa od seba princípom, presnosťou, medzou detekcie, úpravou vzorky a pod. Patria sem atómová absorpčná spektrometria s modifikáciou studených pár (CV-AAS) alebo v kombinácii s amalgamačnou technikou, atómová fluorescenčná spektrometria (AFS), optická emisná spektrometria s indukčne viazanou plazmou (ICP-OES), hmotnostná spektrometria s indukčne viazanou plazmou (ICP-MS) a iné⁶. Nedostatkami uvedených metód je neschopnosť

priamo stanoviť špecie prvkov vo vzorkách. Pre tento účel je nevyhnutné pred samotnou analýzou realizovať separáciu špecií rôznymi separačnými technikami, ako sú: extrakcia kvapalina – kvapalina (LLE), extrakcia alebo mikroextrakcia na tuhej fáze (SPE alebo SPME), plynová chromatografia (GC), vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) a iné⁶. Pre stanovenie špecií ortute v biologických materiáloch je vhodné použiť tandemové techniky, ako sú napr. GC/HPLC-ICP-MS.

Stanovovanie špecií ortute vo vzorkách pre biomedicínske štúdie a v klinických vzorkách vzhľadom na ich rôznu toxicitu, fyzikálno-chemické vlastnosti ako aj ich rôzny metabolizmus odbúravania je kľúčové z hľadiska hodnotenia zdravotných rizík. Aj napriek tomuto faktu je v literatúre veľmi málo analytických postupov pre špeciáciu ortute v krvi. Prevažne sú to metódy pre stanovenie vyššieho obsahu MeHg (cit.^{7,8}), alebo metódy vyžadujúce komplikovanú a zdĺhavú úpravu väčšieho objemu vzorky^{9,10}. Aj to má za následok, že publikované štúdie sú prevažne založené len na výsledkoch zo stanovenia celkovej ortute (THg).

Cieľom tejto práce bolo vyvinúť metódu stanovenia MeHg v ľudskej krvi profesionálne neexponovaných jedincov. Využitím poznatkov z výsledkov niekoľkých výskumných tímov bola na našom pracovisku vyvinutá nová metóda pre stanovenie špecií ortute vo venóznej a pupočníkovej krvi tandemom GC-ICP-MS.

Metóda je založená na extrakcii špecií ortute z veľmi malého objemu (150 µl) krvi roztokom 6M-HCl s obsahom NaCl pomocou ultrazvuku¹¹, úprave pH, následnej derivatizácii špecií ortute so súčasnou extrakciou vznikajúcich produktov do hexánu^{12,13} a stanovení MeHg v hexánových extraktoch vzoriek tandemom GC-ICP-MS.

Experimentálna časť

Prístroje, zariadenia a podmienky merania

Pre stanovenie celkovej ortute sa používal prístroj AAS s amalgamačnou technikou AMA 254 so softvérom WinAMA (Altec, ČR). Pre stanovenie MeHg sa používala kombinácia prístrojov GC Trace Ultra s automatickým dávkovačom Tri Plus a softvérom Chromquest 5.0 a prístroj ICP-MS XSeries 2 so softvérom Thermo Plasma Lab (Thermo Scientific, UK). Výsledky pre THg boli vyhodnocované a spracovávané v softvéri WinAMA. Výsledky pre MeHg boli vyhodnocované a spracovávané v softvéri Thermo Plasma Lab. Pre extrakciu vzoriek v ultrazvuku sa používal ultrazvukový kúpeľ USC 600D (VWR, Rakúsko). Na centrifugáciu sa používala centrifúga EBA-20 (Hettich Zentrifugen, SRN). Na meranie pH sa používal pH meter Inolab 720 s elektródou Sen Tix 81 (WTW, SRN).

Optimalizované podmienky pre merania v tandeme GC-ICP-MS sú uvedené v tabuľke I.

Tabuľka I
Optimálne operačné podmienky tandemu GC-ICP-MS

GC	Thermo Trace Ultra
Kolóna	Tr-5, 7 m, 0,32 mm I. D., 0,25 µm vrstva
Nosný plyn	Hélium
Prietok nosného plynu	3 ml min ⁻¹
Teplotný program pece	50 °C stúpanie 45 °C min ⁻¹ na 250 °C
Dávkovací objem	2 µl
Injektor 1	Na kolónu (OC) injektor, sekundárny čas chladenia 0,2 min
Injektor 2	PTV 816 RP – 2004, injektor s programovanou teplotou odparovania, splitless, 200 °C, programovaný injektovací tlak 170 kPa, splitless čas 1 min, liner pre biologické vzorky
Prepojenie transferovou trubicou	280 °C, Make up plyn: argón, prietok: 300 ml min ⁻¹
ICP-MS	Thermo XSeries 2
Výkon rádiografického generátora, W	1400
Prietok plynu v zhmŕňovači, l min ⁻¹	0,55
Prietok pomocného plynu, l min ⁻¹	0,70
Prietok chladiaceho plynu, l min ⁻¹	13
Prietok prídavného plynu, l min ⁻¹	0,30
Izotopy	²⁰⁰ Hg, ²⁰² Hg, ²⁰⁹ Bi
Čas zotrvania na hmotnostnej jednotke, ms	25

Chemikálie a roztoky

Kyselina chlorovodíková, hydroxid sodný, octan sodný a 100% ľadová kyselina octová (Suprapur, Merck, Nemecko); *n*-hexán pre GC (Suprasolv, Merck, Nemecko); chlorid sodný (p.a. ACS, Merck, Nemecko); metanol (Suprasolv, Merck, Nemecko); tetrafenylboritan sodný [NaB(Ph)₄], metylortuť chlorid, etylortuť chlorid a chlorid ortuťnatý (Sigma-Aldrich, Nemecko); interný štandard pre ICP-MS (Analytika, Česká republika); deionizovaná voda pripravovaná z redestilovanej vody denne na zariadení Simplicity UV (Millipore, Francúzsko). Roztoky 2% HCl, 6 M-HCl s 0,3 M obsahom NaCl a 6 M-NaOH, boli pripravované rozpúšťaním a/alebo riedením v deionizovanej vode. Derivatizačné činidlo 1% NaB(Ph)₄ bolo pripravované denne rozpustením v deionizovanej vode. Zásobný roztok štandardu MeHg s koncentráciou 150 mg l⁻¹ (ako Hg) a celkovým objemom 100 ml bol pripravený rozpustením 18,775 mg CH₃HgCl v metanole. Roztok skladovaný v tme a chlade bol stabilný minimálne 6 mesiacov. Zásobný roztok štandardu EtHg s koncentráciou 150 mg l⁻¹ (ako Hg) a celkovým objemom 100 ml bol pripravený rozpustením 19,824 mg C₂H₅HgCl v metanole. Roztok skladovaný v tme a chlade bol stabilný minimálne 6 mesiacov. Zásobný roztok HgCl₂ s koncentráciou 1000 mg l⁻¹ (ako Hg) a objemom 50 ml bol pripravený rozpustením 67,674 mg HgCl₂ v 2% roztoku HCl. Roztok skladovaný v tme a chlade bol stabilný minimálne 6 mesiacov. Pracovné roztoky MeHg pre kalibráciu ako aj pracovné roztoky EtHg a HgCl₂ boli pripravované denne riedením ich zásob-

ných roztokov 2% roztokom HCl.

Analyzovaný materiál

Na analýzy sa použili vzorky venóznej a pupečníkovej krvi od dobrovoľných darcov (matky, novorodenci), ktoré boli ihneď po odbere zmrazené pri -20 °C až do doby analýzy. Odberu vzoriek predchádzal schvaľovací proces etickou komisiou Slovenskej zdravotníckej univerzity v Bratislave, informovanie dobrovoľníka a jeho písomný súhlas s účasťou na štúdiu. Na validáciu metódy bol použitý certifikovaný referenčný materiál SRM NIST 966 Level 2. Pre internú kontrolu správnosti meraní sa používala pulovaná lyofilizovaná krv, ktorá bola vždy pred analýzou rekonštruovaná deionizovanou vodou.

Úprava vzoriek

Z každej vzorky krvi bolo odpipetovaných po 150 µl do piatich PP skúmaviek. Do prvej skúmavky bolo pridaných 50 µl 2% HCl, do druhej 50 µl roztoku 10 µg l⁻¹ Hg (CH₃HgCl) v 2% HCl (odpovedá zvýšeniu koncentrácie Hg (CH₃HgCl) vo vzorke o 3,33 µg l⁻¹), do tretej 50 µl roztoku 20 µg l⁻¹ Hg (CH₃HgCl) v 2% HCl (odpovedá zvýšeniu koncentrácie Hg (CH₃HgCl) vo vzorke o 6,67 µg l⁻¹), do štvrtej 50 µl roztoku 30 µg l⁻¹ Hg (CH₃HgCl) v 2% HCl (odpovedá zvýšeniu koncentrácie Hg (CH₃HgCl) vo vzorke o 10 µg l⁻¹) a do piatej 50 µl roztoku 40 µg l⁻¹ Hg (CH₃HgCl) v 2% HCl (odpovedá zvýšeniu koncentrácie Hg (CH₃HgCl) vo vzorke o 13,33 µg l⁻¹). Do každej zo

skúmaviek bolo ďalej pridaných 1,3 ml zmesi 6 M-HCl s 0,3 M obsahom NaCl a uzavreté vzorky boli na 45 min ponorené do ultrazvuku s maximálnym výkonom bez aditívneho zohrievania¹¹. Po extrakcii v ultrazvuku boli extrakty 5 min centrifugované pri 5000 ot./min. 1 ml supernatantu (extraktu) z každej skúmavky bol opatrne prenesený do novej 15ml uzatvárateľnej PP skúmavky. Do každej PP skúmavky s 1 ml extraktu sa pridalo 2 ml 0,2 M acetátového tlmivého roztoku, zistený objem 6 M-NaOH (spravidla v intervale 0,8–1 ml), 0,5 ml hexánu a 1 ml 1% NaB(Ph)₄, v uvedenom poradí.

Objem prídavku 6 M-NaOH potrebný na úpravu pH ~ 4,7 bol vždy zisťovaný v skúmavke s 1 ml supernatantu slepého pokusu s prídavkom 2 ml 0,2 M acetátového tlmivého roztoku.

Takto upravené vzorky sa nechali v uzavretých 15ml PP skúmavkách energicky trepať 15 min na trepačke. Po skončení trepania boli vzorky 10 min centrifugované pri 5000 ot./min. Časť oddelenej fázy hexánu bola opatrne pipetou prenesená do 300µl GC vialiek a vzorky boli následne merané v tandeme GC-ICP-MS.

Slepý pokus bol pripravený uvedeným postupom, pričom krv bola nahradená fyziologickým roztokom.

Výsledky a diskusia

Derivatizácia

Vzhľadom na silne kyslé prostredie extraktov nie je možné dosiahnuť pH potrebné pre derivatizáciu v malom objeme akéhokoľvek tlmivého roztoku. Preto bolo pH extraktov upravované na hodnotu ~ 4,7 prídavkom malého objemu 6 M-NaOH (KOH spôsobovalo zrážanie derivatizačného činidla, zrejme kvôli prítomnosti iónu K⁺). Aby nedochádzalo k zbytočnej kontaminácii vzoriek elektródou pH metra, bol potrebný objem 6 M-NaOH pre úpravu pH zisťovaný vždy na 1 ml extraktu slepého pokusu s prídavkom 2 ml acetátového tlmivého roztoku (pre tento účel bol slepý pokus pripravovaný denne v dvojnásobnom objeme) a roztok, v ktorom bolo pH zisťované sa už ďalej nepoužíval.

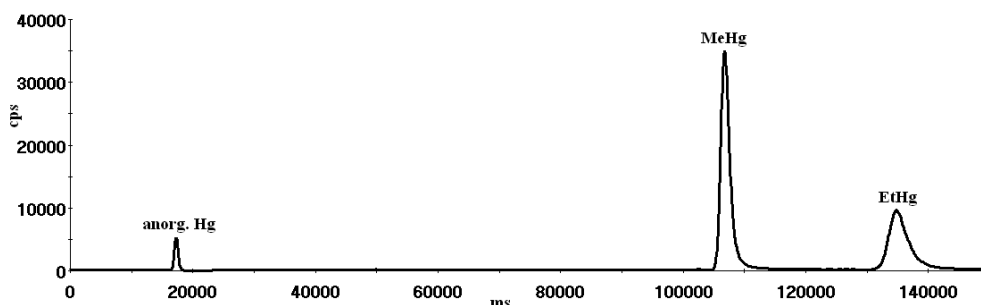
Derivatizácia MeHg na MeHgPh prebieha s rovnakou účinnosťou v rozmedzí pH 4,5–4,9, preto aj prípadné rôzne pH vzoriek krvi nespôsobilo zmenu výsledného pH mimo interval $4,7 \pm 0,2$. Aj pre tento účel bolo nutné používať 0,2 M acetátový tlmivý roztok. Vhodnosť dosiahnutého pH vo vzorkách potvrdzuje aj mierny zákal vytvorený po pridaní 6 M-NaOH a miernom premiešaní. Pri nevhodnom pH bola zmes čira. Úprava pH pred derivatizáciou bola skúšaná aj priamo roztokom 6 M-NaOH bez predchádzajúceho prídavku 2 ml pufru, avšak bezvýsledne.

V kyslom prostredí dochádza k okamžitému rozkladu produktu derivatizácie anorganickej ortute difenylortute (PhHgPh)¹¹. To je dôvod, prečo touto metódou možno stanoviť iba vysoké množstvá anorganickej nederivatizovanej ortute bez matrice. Vyriešenie tohto problému si bude vyžadovať ešte ďalší výskum (iné derivatizačné činidlá, resp. extrakčný postup a i.). Obsah anorganickej ortute bol preto stanovovaný ako rozdiel medzi stanovenou MeHg (ako Hg) a THg stanovenou na prístroji AMA 254 vždy v ten deň, keď bola vo vzorke stanovovaná aj MeHg tandemom GC-ICP-MS.

Stanovenie špecií ortute tandemom prístrojov GC-ICP-MS si vyžaduje vysoko čisté chemikálie a činidlá. Pri optimalizácii metódy sa zistilo, že niektorí výrobcovia resp. distribútori v certifikátoch kvality dodávaných chemikálií uvádzajú nepresné údaje o obsahu tohto kovu resp. neuvádzajú ich vôbec. Najvhodnejším derivatizačným činidlom pre simultánne stanovenie špecií Hg by bol tetrapropylboritan sodný [NaB(Pr)₄] (v porovnaní s NaB(Ph)₄, v daných podmienkach derivatizuje anorganickú ortuť na stabilný produkt dipropylortuť). Toto činidlo bolo u nás taktiež použité na modelových vzorkách. Ako sa neskôr ukázalo, činidlo obsahuje vysokú koncentráciu Hg, čo z analytického hľadiska takmer úplne znemožňuje stanovenie niekoľkonásobne nižšej koncentrácie Hg v reálnych vzorkách. V súčasnej dobe však toto činidlo nie je k dispozícii v iných čistotách resp. u iných dodávateľov.

Optimalizácia podmienok a validácia

Naším cieľom bolo predovšetkým vyvinúť rutinnú, rýchlu, citlivú a spoľahlivú metódu stanovenia MeHg



Obr. 1. Chromatogram znázorňujúci separáciu špecií ortute; modelová vzorka obsahujúca $20 \mu\text{g l}^{-1}$ Hg z každej zlúčeniny ortute (HgCl₂, MeHgCl a EtHgCl)

v ľudskej krvi s čo najnižšou spotrebou vzorky a veľmi nízkym detekčným limitom. Týmto kritériám bola podrobená celá optimalizácia.

Optimalizácia extrakcie špécii Hg z biologického materiálu¹¹ ako aj podmienky pre derivatizáciu a extrakciu produktov derivatizácie do hexánu¹³ už boli popísané.

Experimentálne podmienky separácie a detekcie špécii ortute boli optimalizované využitím štandardov a modelových vzoriek (obr. 1).

Sledovanými parametrami pri optimalizácii boli predovšetkým analytický signál (plocha píku) a chromatografické rozlíšenie píkov pre Hg²⁺, MeHg a EtHg. Aj napriek tomu, že sa nám podarilo vyvinúť metódu len pre spoľahlivé stanovenie MeHg v krvi ľľovka, bolo viac než dôležité odseparovať všetky špécie ortute, ktoré sa môžu nachádzať v reálnych vzorkách, aby nedošlo k prípadnému ovplyvneniu signálu pre MeHg. Optimalizované podmienky sú uvedené v experimentálnej časti v tab. I.

Aby bola dosiahnutá čo najvyššia citlivosť systému, pre vývoj metódy na ultrastopové stanovenie MeHg v krvi sa využíval „on column (OC) injektor“. Používanie tohto injektora pre väčšie množstvá vzoriek malo však za následok veľmi krátku životnosť kolóny. Preto sa po zoptimalizovaní extrakčných a derivatizačných postupov pre vzorky používal injektor s programovanou teplotou odparovania (PTV) so špeciálnym linerom pre biologické vzorky, ktorý významne predlžuje životnosť separačnej GC kolóny.

Pri optimalizácii ako aj vývoji metódy bol zistený významný matrix efekt prítomnej krvi. Tento matrix efekt však nebol vo všetkých vzorkách krvi rovnaký a výťažnosť signálu pre MeHg vo vzorkách krvi sa pohybovala v rozsahu 20–50 % zo signálu modelových vzoriek.

Využitie metódy interného štandardu (etylortuť) nedosahovalo požadované validačné parametre. Preto sa nám pri tejto metóde podarilo dosiahnuť správne výsledky len využitím metódy štandardných prídavkov (obr. 2).

Pri stanovení medze detekcie (LOD) sa vychádzalo z trojnásobku a pri stanovení medze stanoviteľnosti (LOQ) z desaťnásobku smerodajnej odchýľky slepého pokusu ($n = 10$).

Medza detekcie metódy pre stanovenie MeHg (ako Hg) v krvi bola 86 ng l⁻¹ a medza stanoviteľnosti metódy pre stanovenie MeHg (ako Hg) v krvi bola 300 ng l⁻¹.

Lineárna oblasť kalibračnej závislosti pre stanovenie MeHg (ako Hg) v krvi bola v širokom koncentračnom rozsahu 0,3–200 µg l⁻¹. Pracovný objem vzorky pre opakované stanovenie bol 150 µl.

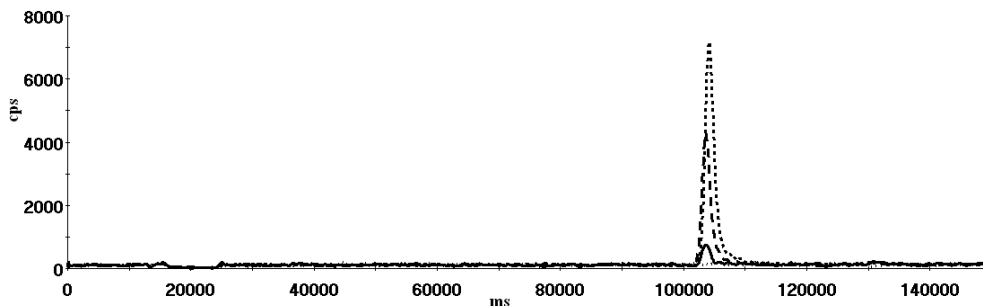
Spoľahlivosť uvedeného postupu bola overená na viacnásobnom stanovení MeHg v certifikovanom referenčnom materiáli SRM NIST 966 Level 2 (obr. 3, tab. II), tak ako v rôznych časových intervaloch tak aj rôznymi experimentátormi.

Stabilita metylortute vo vzorkách

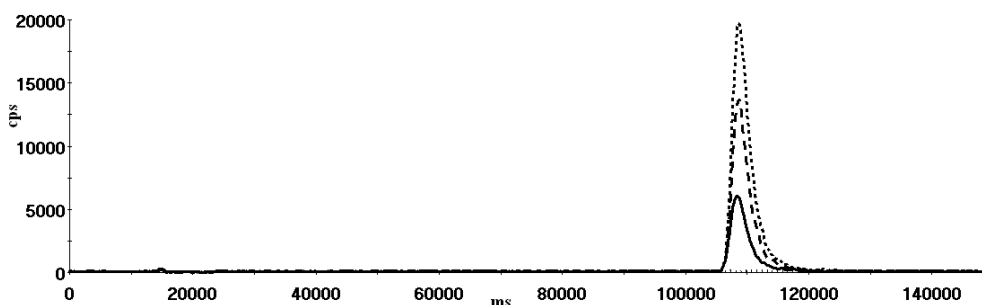
Taktiež bola realizovaná aj štúdia vplyvu skladovania vzoriek a extraktov ako aj vplyv násobnosti rozmrazovania na obsah MeHg. Zistilo sa, že MeHg v extraktoch vzoriek bola stabilná 24 h pri skladovaní v chladničke, v zmrazených extraktoch bola nestabilná. Značné straty obsahu MeHg vo vzorkách boli zistené po viacnásobnom rozmrazovaní, zatiaľ čo obsah celkovej Hg sa nezmenil. Výsledky potvrdzujú niektoré z už dávnejšie popísaných tvrdení o nestabilite MeHg vo vzorkách^{14,15} v dôsledku ich viacnásob-

Tabuľka II
Výsledky stanovenia Hg v SRM NIST 966 ($n = 3$, priemer \pm SD)

Parameter	Certifikovaná hodnota [$\mu\text{g l}^{-1}$]	Stanovená hodnota [$\mu\text{g l}^{-1}$]	Metóda
THg	31,4 \pm 1,7	30,3 \pm 0,8	AAS
MeHg (ako Hg)	16,4 \pm 1,4	15,9 \pm 1,1	GC-ICP-MS



Obr. 2. Chromatogramy pre stanovenie MeHg vo vzorke ľľudskej krvi metódou štandardných prídavkov; slepý pokus....., vzorka krvi _____, vzorka krvi + 3,33 µg l⁻¹ Hg (MeHg) _ _ _ _ , vzorka krvi + 6,67 µg l⁻¹ Hg (MeHg) _ _ _ _ _



Obr. 3. Chromatogramy pre stanovenie MeHg v SRM NIST 966 Level 2 metódou štandardných prídavkov; slepý pokus....., SRM NIST 966 Level 2 _____, SRM NIST 966 Level 2 + 16,67 $\mu\text{g l}^{-1}$ Hg (MeHg) _ _ _ _ , SRM NIST 966 Level 2 + 33,33 $\mu\text{g l}^{-1}$ Hg (MeHg) _ _ _ _

Tabuľka III

Výsledky stanovenia Hg v ľudskej krvi
($n = 3$; priemer \pm SD)

Vzorky krvi	MeHg (ako Hg) [$\mu\text{g l}^{-1}$], GC-ICP-MS	THg [$\mu\text{g l}^{-1}$], AAS
1	0,357 \pm 0,03	0,799 \pm 0,06
2	0,619 \pm 0,07	1,010 \pm 0,02
3	1,145 \pm 0,09	1,190 \pm 0,02

sobného rozmrazovania, lyofilizácie, či antikoagulácie.

Výsledky jednoznačne preukázali nestabilitu MeHg pri viacnásobnom rozmrazovaní a zmrazení vzoriek dokonca aj pri referenčnom materiáli SRM NIST 966 Level 2 (MeHg v ňom bola stanovená v jeden deň v prvý, druhý a tretí krát rozmrazenom referenčnom materiáli). Možno aj z tohto dôvodu dodávateľ SRM v súčasnosti deklaruje už iba certifikovanú hodnotu pre THg.

Veľmi malý pokles v stanovených koncentráciách MeHg bol zistený vo vzorkách zmrazených menej ako 12 mesiacov. Dlhodobá zmrazená vzorka (viac ako tri roky) vykazujú signifikantné straty v obsahu MeHg. Celkový obsah Hg sa však v takto skladovaných vzorkách stále pohyboval v medziach neistôt stanovení.

Vzhľadom na stabilitu THg po viacnásobnom rozmrazovaní ako aj skladovaní v skúmaných obdobiach možno predpokladať, že sa MeHg zo vzoriek neodparuje, resp. neadsorbujú na povrchu skladovacích nádob, ale zrejme dochádza k rozkladu a/alebo zmene na iné formy Hg (Hg^0 , Hg^+ , Hg^{2+} , iné organické fragmenty a i.). Mechanizmus poklesu koncentrácie MeHg vo vzorkách si vyžaduje ďalší výskum.

Záver

Optimalizovaná metóda bola a je úspešne aplikovaná na stanovenie MeHg vo veľkom počte vzoriek krvi profesionálne neexponovanej populácie a vo veľmi malých objemoch krvi novorodencov. Stanovené koncentrácie THg v krvi sa pohybujú v intervale 0,4–8 $\mu\text{g l}^{-1}$ a MeHg (ako Hg) v intervale 0,3–5 $\mu\text{g l}^{-1}$. Pre názornosť v tab. III uvádzame koncentrácie MeHg v 3 nameraných vzorkách, ktoré predstavujú spodnú, strednú a hornú hladinu bežne prítomných koncentrácií MeHg v našich vzorkách ľudskej krvi. Prezentované hodnoty koncentrácií MeHg namerané v krvi matiek a pupočníkovej krvi sú však nižšie ako údaje z literatúry¹⁰ pre vzorky krvi európskej populácie s nízkou konzumáciou rýb.

Hlavným dôvodom vývoja tejto metódy bola predovšetkým jej aplikácia pre epidemiologickú štúdiu vplyvu obsahu MeHg v materskej krvi na prenatálnu a perinatálnu expozíciu a neurobehaviorálny vývoj detí. Závery pre epidemiologické štúdie si však vyžadujú stanovenia MeHg vo veľkých počtoch vzoriek krvi a na takejto štúdiu sa intenzívne pracuje.

Táto práca bola plne financovaná z projektu „SK0020“ (Výskum vplyvu metalómov a genetických faktorov na zdravie detí), financovaný z FM EHP, NFM a štátneho rozpočtu SR.

LITERATÚRA

- Reinhardt J.: J. Public Health Dent. 48, 172 (1988).
- Chien L. C., Gao C. S., Lin H. H.: Environ. Res. 110, 123 (2010).
- Díez S.: Rev. Environ. Contam. Toxicol. 198, 111 (2009).
- Freire C., Ramos R., Lopez-Espinosa M. J., Díez S., Vioque J., Bellester F., Fernández M. F.: Environ. Res. 110, 96 (2010).
- Castoldi A. F., Johansson C., Onishchenko N., Cocci-

- ni T., Roda E., Vahter M., Ceccateli S., Manzo L.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 51, 201 (2008).
6. Leopold K., Foulkes M., Worsfold P.: *Anal. Chim. Acta* 663, 127 (2010).
 7. Li Y.-F., Chen C., Li B., Li W., Qu L., Dong Z., Nomura M., Gao Y., Zhao J., Hu W., Zhao Y., Chai Z.: *J. Inorg. Biochem.* 102, 500 (2008).
 8. Rodrigues J. L., de Souza S. S., de Oliveira Souza V. C., Barbosa Jr. F.: *Talanta* 80, 1158 (2010).
 9. Hippler J., Hoppe H. W., Mosel F., Rettenmeier A. W., Hirner A. V.: *J. Chromatogr., B* 877, 2465 (2009).
 10. Vahter M., Akesson A., Lind B., Bjors U., Schutz A., Berglund M.: *Environ. Res., A* 84, 186 (2000).
 11. Houserova P., Matejcek D., Kuban V., Pavlickova J., Komarek J.: *Chem. Lett.* 101, 495 (2007).
 12. Rodil R., Carro A. M., Lorenzo R. A., Abuin M., Cela R.: *J. Chromatogr., A* 963, 313 (2002).
 13. Cai Y., Monsalud S., Jaffe R., Jones R. D.: *J. Chromatogr., A* 876, 147 (2000).
 14. Yu L.-P., Yan X.-P.: *Trends Anal. Chem.* 22, 245 (2003).
 15. Cornelis R., Caruso J., Crews H., Heumann K. (ed.): *Handbook of Elemental Speciation II – Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*. Wiley, New York 2005.

R. Serbin, I. Uhnáková, Z. Hušeková, and M. Ursínyová (*Department of Environmental Medicine, Slovak University of Medicine, Bratislava, Slovak Republic*): **Determination of Mercury Species in Human Blood Using Combined GC and MS with Inductively Coupled Plasma**

A simple method for methylmercury (MeHg⁺) determination in human venous blood is described using GC-ICP-MS. The blood sample preparation consists in the extraction with a mixture of 6M HCl and NaCl, pH adjustment, derivatization of mercury species using NaBPh₄ with simultaneous extraction of products into hexane. The detection limits for MeHg⁺ were 86 ppt (as Hg) in the optimized method. The sample volume for repeated measurements was 150 μl. The total Hg level in blood was determined by AAS using the amalgamation technique.