



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ
DEPARTAMENTUL DE CHIMIE
CENTRUL DE CERCETARE ANALYTICA

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

METODE ECO-ANALITICE DE DETERMINARE ȘI SPECIERE
A MERCURULUI PRIN SPECTROMETRIA DE EMISIE
OPTICĂ ÎN MICROPLASME

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Prof. Univ. Dr. Tiberiu FRENȚIU

DOCTORAND:

Asist. Univ. Enikő COVACI

Cluj-Napoca

2022



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ
DEPARTAMENTUL DE CHIMIE
CENTRUL DE CERCETARE ANALYTICA

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

METODE ECO-ANALITICE DE DETERMINARE ȘI SPECIERE
A MERCURULUI PRIN SPECTROMETRIA DE EMISIE
OPTICĂ ÎN MICROPLASME

COMISIA DE DOCTORAT

PREȘEDINTE:

Acad. Prof. Univ. Dr. Cristian SILVESTRU (Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca)

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Prof. Univ. Dr. Tiberiu FRENȚIU (Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca)

REFERENȚI:

Prof. Univ. Dr. Romeo-Iulian OLARIU (Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Iași)

CSI Dr. Erika-Andrea LEVEI (INCDO INOE-2000 București, Filiala Institutul de Cercetări pentru Instrumentație Analitică, Cluj-Napoca)

Prof. Univ. Dr. Claudia Valentina CIMPOIU (Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca)

DOCTORAND:

Asist. Univ. Enikő COVACI

Cluj-Napoca

2022

Cercetările din prezenta teză de doctorat au fost finanțate dintr-un grant al Autorității Naționale
Române pentru Cercetare Științifică, CNDI-UEFISCDI, număr proiect:
PN-III-P2-2.1-PED-2016-0135 (nr. contract 93PED/2017)

Cuprins

Cuvinte cheie.....	7
Lista de abrevieri	8
Mulțumiri.....	11
Introducere.....	13
Motivația cercetării.....	13
Obiectivele și metodologia cercetării.....	14
Prezentarea științifică a tezei	16
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	18
1. Chimia Analitică Verde și Albă – Principii și metode de evaluare.....	19
2. Apariția mercurului în mediu și metode de determinare și speciere.....	21
CONTRIBUȚII PERSONALE	24
3. Determinarea CH_3Hg^+ în alimentația marină prin derivatizare fotoindusă la vapori reci și detecție prin spectrometria de emisie optică în microtorța de plasmă cuplată capacitiv.....	25
3.1. Situația la nivel internațional. Ipoteze de lucru și obiective.....	25
3.2. Prepararea probelor pentru determinarea CH_3Hg^+ prin UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$	26
3.3. Instrumentația UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$	26
3.4. Optimizarea operării sistemului analitic UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$	28
3.5. Caracterizarea și validarea metodei UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$ prin analiza de materiale de referință certificate și evaluarea performanțelor analitice	30
3.6. Aplicarea metodei UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$ la determinarea CH_3Hg^+ din probe reale de mușchi de pește.....	32
3.7. Concluzii	33
4. Specierea CH_3Hg^+ și Hg^{2+} în alimentația marină prin derivatizare clasică și UV fotoindusă la vapori reci și spectrometria de emisie optică în microtorța de plasmă cuplată capacitiv	35
4.1. Situația la nivel internațional. Ipoteze de lucru și obiective.....	35
4.2. Prepararea probelor pentru specierea Hg sub formă de CH_3Hg^+ și Hg^{2+} în alimentația marină prin $\text{SnCl}_2\text{-CV-}\mu\text{CCP-OES}$ și UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$	36
4.3. Instrumentația $\text{SnCl}_2\text{-CV-}\mu\text{CCP-OES}$ și UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$	36
4.4. Caracterizarea și validarea metodei UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$ prin analiza de materiale de referință certificate și evaluarea performanțelor analitice	37
4.5. Aplicarea metodei de speciere la analiza de probe reale de mușchi de pește.....	38
4.6. Riscul de expunere a populației la Hg prin consumul de carne de pește	40
4.7. Concluzii	41

5. Metodă eco-scală generală de determinare a Hg total din alimente și apă prin spectrometria de emisie optică în microplasma cuplată capacitiv și derivatizare fotoindusă cu radiație UV.....	43
5.1. Situația la nivel internațional. Ipoteze de lucru și obiective.....	43
5.2. Prepararea probelor pentru determinarea Hg total	43
5.3. Instrumentația SnCl ₂ -CV-μCCP-OES și UV-PVG-μCCP-OES.....	44
5.4. Caracterizarea și validarea metodei UV-PVG-μCCP-OES cu/fără preconcentrare prin analiza de materiale de referință certificate și evaluarea performanțelor analitice.....	45
5.5. Aplicabilitatea metodei UV-PVG-μCCP-OES la determinarea Hg total din apă și alimente extrase în HCOOH	48
5.6. Concluzii.....	51
6. Metodă eco-scală generală de speciere a Hg sub formă de Hg ²⁺ și CH ₃ Hg ⁺ în alimentația de origine marină prin generare fotoindusă UV/Vis a vaporilor reci și detecția prin spectrometria de emisie optică în microtorța de plasmă cuplată capacitiv.....	53
6.1. Situația la nivel internațional. Ipoteze de lucru și obiective.....	53
6.2. Prepararea probelor pentru specierea Hg sub formă de CH ₃ Hg ⁺ și Hg ²⁺	54
6.3. Instrumentația UV/Vis-PVG-μCCP-OES pentru specierea Hg sub formă de Hg ²⁺ și CH ₃ Hg ⁺	54
6.4. Caracterizarea și validarea metodei UV/Vis-PVG-μCCP-OES	55
6.5. Aplicarea metodei de speciere la analiza de probe reale de mușchi de pește.....	56
6.6. Concluzii	59
7. Evaluarea gradului de verde și de alb a metodelor UV/Vis-PVG-μCCP-OES pentru determinarea și specierea mercurului	61
7.1. Situația la nivel internațional. Ipoteze de lucru și obiective.....	61
7.2. Rezultatele evaluării gradului de verde și de alb al metodelor UV/Vis-PVG-μCCP-OES de determinare și speciere a Hg	61
7.3. Concluzii.....	67
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei. Concluzii generale	69
Bibliografie	71
Lista de articole publicate în reviste ISI în cadrul programului de doctorat	75
Lista de articole publicate în volumele unor conferințe internaționale.....	76
Lista de comunicări științifice în care au fost diseminate rezultatele tezei de doctorat.....	76
Alte articole publicate în perioada programului de doctorat, care nu au fost invocate în prezenta teză de doctorat.....	78

Cuvinte cheie

Speciere mercur în alimente de origine marină

Determinare metilmercur în alimente de origine marină

Metode verzi de derivatizare pentru mercur

Derivatizare eco-scală fotoindusă UV/Vis la vapori reci în acid formic

Extracție mercur din probe alimentare în acid formic

Evaluare risc de expunere populație la mercur

Microtorța de plasmă cuplată capacitiv

Spectrometria de emisie optică în microtorța de plasmă cuplată capacitiv

Evaluare grad de verde metode analitice

Evaluare grad de alb metode analitice

Lista de abrevieri

Abreviere	Denumire în limba română	Denumire în limba engleză
AAS	Spectrometrie de absorbție atomică	Atomic absorption spectrometry
AFS	Spectrometrie de fluorescență atomică	Atomic fluorescence spectrometry
AGREE	Procedura pictogramei analizei verdeții	Analytical greenness metric
AOAC	Asociația Chimistilor Analisti Oficiali	Association of Official Analytical Chemists
CCD	Detector cu sarcină cuplată	Charge coupled device
μCCP-OES	Spectrometria de emisie optică în microplasma cuplată capacitiv	Capacitively coupled microplasma optical emission spectrometry
CRM	Material certificat de referință	Certified reference material
CV-AAS	Spectrometria de absorbție atomică și generare de vapori reci	Cold vapor generation atomic absorption spectrometry
CV-AFS	Spectrometria de fluorescență atomică și generare de vapori reci	Cold vapor generation atomic fluorescence spectrometry
CV-ICP-OES	Spectrometria de emisie optică în plasma cuplată inductiv și generarea de vapori reci	Cold vapor generation inductively coupled plasma optical emission spectrometry
EFSA	Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară	European Food Safety Authority
ESA	Procedura Eco-Scala Analitică	Analytical Eco-Scale procedure
ETAAS	Spectrometria de absorbție atomică cu evaporare electrotermică	Electrothermal atomic absorption spectrometry
FAO	Organizația pentru Alimentație și Agricultură a Națiunilor Unite	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GAC	Chimie Analitică Verde	Green Analytical Chemistry
GAPI	Procedura Indicelui Analitic Verde	Green Analytical Procedure Index

GC	Cromatografie de gaze	Gas chromatography
GFAAS	Spectrometria de absorbție atomică în cuptor de grafit	Graphite furnace atomic absorption spectrometry
HG	Generare de hidruri	Hydride generation
HG-AFS	Spectrometria de fluorescență atomică cu generare de hidruri	Hydride generation atomic fluorescence spectrometry
HPLC	Cromatografie de lichide de înaltă performanță	High performance liquid chromatography
ICP	Plasma cuplată inductiv	Inductively coupled plasma
ICP-MS	Spectrometrie de masă în plasma cuplată inductiv	Inductively coupled plasma mass spectrometry
ICP-OES	Spectrometrie de emisie optică în plasma cuplată inductiv	Inductively coupled plasma optical emission spectrometry
LA-ICP-MS	Spectrometria de masă în plasma cuplată inductiv cu ablație laser	Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry
LC	Cromatografie de lichide	Liquid chromatography
LMWOA	Acizi organici cu masă moleculară mică	Low molecular weight organic acids
LOD	Limita de detecție	Limit of detection
LOQ	Limita de determinare	Limit of quantification
MS	Spectrometria de masă	Mass spectrometry
NEMI	Procedura Indicelui Național de Protecție a Mediului	National Environmental Methods Index
PD-OES	Spectrometria de emisie optică în plasma punctiformă	Point discharge optical emission spectrometry
PRSD	Deviația standard relativă procentuală prezisă	Predicted relative standard deviation
PTFE	Politetrafluoroetilenă	Tetrafluoroethylene
PTWI	Limita tolerabilă săptămânală provizorie	Provisional tolerably weakly intake
RGB-12	Procedura roșu, verde, albastru 12	Red Green Blue 12 procedure
RSD	Deviația standard relativă	Relative standard deviation

SnCl ₂ -CV-AFS	Spectrometria de fluorescență atomică și generare de vapori reci cu SnCl ₂	SnCl ₂ cold vapor generation atomic fluorescence spectrometry
SnCl ₂ -CV-μCCP-OES	Spectrometrie de emisie optică în microplasma cuplată capacitiv și generare de vapori reci cu SnCl ₂	SnCl ₂ cold vapor generation capacitively coupled microplasma optical emission spectrometry
SnCl ₂ -CV-ICP-OES	Spectrometrie de emisie optică în plasma cuplată inductiv și generare de vapori reci cu SnCl ₂	SnCl ₂ cold vapor generation in inductively coupled plasma optical emission spectrometry
SOP	Procedură standard de operare	Standard operating procedure
TD-AAS	Spectrometria de absorbție atomică cu desorbție termică	Thermal desorption atomic absorption spectrometry
THQ	Coeficient de hazard țintă	Target hazard quotient
TMAH	Hidroxid de tetrametilamoniu	Tetramethylammonium hydroxide
TOC	Carbon organic total	Total organic carbon
TTHQ	Coeficient de hazard țintă total	Total target hazard quotient
USEPA	Agencia pentru Protecția Mediului din Statele Unite	United States Environmental Protection Agency
UV-PVG	Generare UV fotoindusă de vapori reci	UV photochemical vapor generation
UV-PVG-μCCP-OES	Spectrometrie de emisie optică în microplasma cuplată capacitiv și generare fotoindusă UV a vaporilor reci	UV photochemical vapor generation capacitively coupled plasma microtorch optical emission spectrometry
WAC	Chimie Analitică Albă	White Analytical Chemistry
WHO	Organizația Mondială a Sănătății	World Health Organization

Mulțumiri

Cu această ocazie aș dori să mulțumesc tuturor persoanelor, care m-au încurajat, sprijinit și îndrumat în realizarea experimentelor științifice și elaborarea tezei de doctorat.

În primul rând doresc să-mi exprim recunoștința, respectul și mulțumirile față de coordonatorul științific, Prof. Dr. Ing. Tiberiu Frențiu, pentru permanenta îndrumare, sprijinire și încurajare de-a lungul perioadei de pregătire a doctoratului și de elaborare a tezei. De asemenea, doresc să mulțumesc Autorității Naționale Române pentru Cercetarea Științifică și Inovare (CNDI-UEFISCDI) pentru sprijinul financiar acordat printr-un proiect PED, număr proiect: PN-III-P2-2.1-PED-2016-0135, nr. contract 93PED/2017, pe care am fost angajată în calitate de doctorandă.

Sincere mulțumiri membrilor comisiei de îndrumare: Conf. Dr. Michaela Lucia Ponta, Conf. Dr. Eugen Darvasi, Prof. Dr. Habil. Costel Sârbu și Lect. Dr. Dorina Casoni pentru sfaturile științifice acordate în timpul efectuării experimentelor, susținerii referatelor de cercetare și presusținerii tezei.

Mulțumesc, de asemenea, domnului Acad. Prof. Univ. Dr. Cristian Silvestru, care mi-a făcut onoarea să accepte să fie președintele comisiei pentru susținerea publică a tezei de doctorat, respectiv referenților Prof. Univ. Dr. Romeo-Iulian Olaru (Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Iași), CSI Dr. Erika-Andrea Levei (INCDO INOE-2000 București, Filiala Institutul de Cercetări pentru Instrumentație Analitică, Cluj-Napoca) și Prof. Univ. Dr. Claudia Valentina Cimpoi (Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca) pentru verificarea tezei de doctorat și sfaturile utile.

Mulțumesc în același timp conducerii și colectivului de cercetare din cadrul INCDO INOE-2000 București, Filiala Institutul de Cercetări pentru Instrumentație Analitică (ICIA), Cluj-Napoca, pentru sprijinul acordat în efectuarea experimentelor științifice.

Sincere mulțumiri domnului Prof. Dr. Ing. Dorin Petreuş și colectivului său de la Universitatea Tehnică Cluj-Napoca, pentru sprijinul acordat în realizarea componentelor electronice ale echipamentului miniaturizat.

De asemenea, mulțumesc profesorilor și colegilor de la Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Cluj-Napoca pentru sprijinul, încurajarea și formarea mea profesională, fără de care nu ar putea exista prezenta teză de doctorat.

Dedic această teză familiei mele care a fost mereu alături de mine, m-a sprijinit necondiționat, și care întotdeauna a subliniat importanța unei bune educații.

Introducere

Motivația cercetării

În anul 2011 Comisia Europeană a elaborat un studiu interlaborator, care a avut drept scop, dezvoltarea unor metode de determinare a unor contaminanți problematici în alimente, printre care metilmercurul (CH_3Hg^+). La acest studiu s-au prezentat numai 8 laboratoare din Uniunea Europeană, multe din laboratoare care au fost invitate declinând participarea, deoarece au considerat faptul că metodele de determinare a metilmercurului necesită o prelucrare complicată a probei și o instrumentație sofisticată și costisitoare, de care nu dispun. În baza acestui studiu interlaborator Comisia Europeană a propus o metodă simplă de determinare a CH_3Hg^+ în alimentația de origine marină bazată pe o dublă extracție lichid-lichid în sistemul HBr-toluen-L-cisteină, și detecție prin spectrometria de absorbție atomică cu desorbție termică (TD-AAS). În baza acestui studiu, Comisia Europeană a încurajat și încurajează dezvoltarea de noi metode, care să depășească dificultățile analitice și performanțele analitice a metodei recomandate TD-AAS. Mai mult, EFSA recomandă ca metodele dezvoltate să fie extinse și la alte alimente de origine animală și vegetală consumate aproape zilnic. Metodele standardizate clasice la ora actuală pentru determinarea Hg sunt cele care au la bază spectrometria de absorbție atomică cu desorbție termică (TD-AAS), spectrometria de absorbție atomică cu generare de vapori reci (CV-AAS) și spectrometria de fluorescență atomică cu generare de vapori reci (CV-AFS) cu derivatizare la vapori reci cu SnCl_2 și NaBH_4 .

Odată cu introducerea principiilor Chimiei Analitice Verzi (GAC) în anul 2012 de către grupul de cercetare a profesorului Namiesnik, a fost introdus un nou principiu în spectrometrie, și anume spectrometria atomică verde de către Bendicho și colaboratorii. Direcțiile de cercetare în cadrul spectrometriei verzi o constituie dezvoltarea de instrumentație miniaturizată bazate pe surse de microplasmă cu consum redus de Ar și energie, miniaturizarea procedurilor de preparare și preconcentrare a analiților, introducerea de metode verzi de derivatizare, care să utilizeze reactivi verzi, biodegradabili, cu toxicitate scăzută, și să genereze o cantitate cât mai redusă de reziduu. La ora actuală cuplajul dintre principiile GAC în general și generarea de vapori chimici prin metode verzi de derivatizare cu spectrometria de emisie optică în surse de microplasmă este o tehnologie emergentă în plină dezvoltare, și sunt considerate abordări critice în spectrometria atomică. Multe dintre metodele de determinare și speciere a Hg prin metode spectrale utilizează derivatizarea clasică cu reactivi concentrați, toxici și scumpi, precum SnCl_2 , NaBH_4 și HCl. Ca urmare, în prezenta teză de doctorat s-a avut în vedere dezvoltarea unor metode eco-scală de determinare și de speciere a Hg folosind o instrumentație complet miniaturizată, bazată pe spectrometria de emisie optică în microtorța de plasmă cuplată capacitiv folosind derivatizarea fotoindusă UV-PVG

(UV/VIS-PVG- μ CCP-OES). În cazul mercurului nu este posibilă atingerea unor sensibilități deosebite în absența derivatizării, chiar dacă unul dintre principiile chimiei analitice verzi cere evitarea derivatizării. Pentru a menține gradul de verde, a fost optată pentru o procedură de extracție și derivatizare, în care să fie utilizat numai HCOOH cu și fără preconcentrare *on-line* a vaporilor de Hg pe un microcolector cu filament de aur cu radiație UV/Vis, care să permită specierea Hg pe cele două forme, anorganice (Hg^{2+}) și organometalice (CH_3Hg^+). Metodele au fost extinse pe lângă alimentația marină și la diverse alimente de origine animală și vegetală terestră și probe de apă.

După introducerea celor 12 principii GAC au apărut metode noi de abordare în ceea ce privește evaluarea gradului de verde pe baze obiective, care să elimine abordările subiective fără principii clar definite și lăsate adesea în decizia dezvoltatorului. Din acest motiv multe metode erau evaluate în trecut doar pe o bază subiectivă și nu erau justificate corespunzător. Nivelul de exagerare subiectivă putând fi ușor remarcată în entuziasmul autorilor de aș-i prezenta într-o lumină cât mai bună metodele dezvoltate. Astfel, au fost introduse metode obiective de evaluare a gradului de verde, dintre care cele mai frecvent utilizate sunt Procedura Indicelui Național al Metodelor de Mediu (NEMI), Metoda Eco-Scala Analitică (ESA), Procedura Indicelui Analitic Verzi (GAPI) și Pictograma Analizei Verdeții (AGREE). Deoarece aceste proceduri consideră numai aspecte privind toxicitatea reactivilor și consumul de energie a instrumentației utilizate, în anul 2021 Nowak și colaboratorii au introdus principiile Chimiei Analitice Albe (WAC), respectiv Procedura Roșu-Verde-Albastru 12 (RGB-12). În procedura RGB-12 se evaluează gradul de alb ținând cont și de performanțele analitice ale metodei (culoare roșie), respectiv aspectele economice și aplicabilitatea metodei (culoare albastră). Astfel, printr-o abordare integrată bazată pe cele 4 proceduri de evaluare a gradului de verde și a procedurii RGB-12 s-au evidențiat clar toate aspectele care contribuie la îmbunătățirea nivelului de verde și alb pentru câteva metode necromatografice de determinare și speciere a mercurului prin UV/VIS-PVG- μ CCP-OES față de metodele tradiționale, TD-AAS, CV-AFS și CV-ICP-OES utilizate la determinarea Hg. Această abordare constituie o noutate la nivel internațional în ceea ce privește evaluarea obiectivă a unui grup larg de metode de determinare și speciere a Hg folosind atât o instrumentație miniaturizată, cât și metodele tradiționale.

Obiectivele și metodologia cercetării

Pe baza studiului literaturii de specialitate la nivel național și internațional în ceea ce privește metodele analitice utilizate la determinarea și specierea Hg cu surse de microplasmă, a rezultat faptul că există abordări în ceea ce privește diverse surse de microplasmă, dar fără a utiliza microplasma cuplată capacitiv. De asemenea, la nivel național nu există colective de cercetare care să aibă drept obiectiv dezvoltarea de instrumentație și de metode eco-scală de determinare și de

speciere a Hg în alimente și probe de mediu. În consecință, obiectivul general al tezei de doctorat constituie o noutate absolută la nivel național, și în unele aspecte chiar la nivel internațional prin dezvoltarea și validarea de metode necromatografice eco-scală pentru determinarea și specierea Hg sub formă de CH_3Hg^+ și Hg^{2+} bazate pe UV/Vis-PVG- μCCP -OES, respectiv evaluarea obiectivă a gradului de verde și de alb în vederea încadrării corecte a noilor metode față de cele tradiționale. De asemenea, s-a avut în vedere și compararea performanțelor analitice impuse în legislația Comisiei Europene în ceea ce privește determinarea Hg în alimente.

Obiectivele specifice au fost următoarele:

1. Determinarea CH_3Hg^+ în alimentația marină prin derivatizare fotoindusă la vapori reci și detecție prin spectrometria de emisie optică în microtorța de plasma cuplată capacitiv;
2. Specierea CH_3Hg^+ și Hg^{2+} în alimentația marină prin derivatizare clasică și UV fotoindusă la vapori reci și spectrometria de emisie optică în microtorța de plasmă cuplată capacitiv;
3. Metodă eco-scală generală de determinare a Hg total din alimente și apă prin spectrometria de emisie optică în microplasma cuplată capacitiv și derivatizare fotoindusă cu radiație UV;
4. Metodă eco-scală generală de speciere a Hg sub formă de Hg^{2+} și CH_3Hg^+ în alimentația de origine marină prin generare fotoindusă UV/Vis a vaporilor reci și detecția prin spectrometria de emisie optică în microtorța de plasmă cuplată capacitiv;
5. Evaluarea gradului de verde și de alb a metodelor UV/Vis-PVG- μCCP -OES pentru determinarea și specierea mercurului.

În scopul atingerii acestor obiective specifice, metodologia cercetării a constat în:

1. Studiul cuplajului dintre fotoreactorul UV/Vis în flux continuu (*on-line*) (construcție de laborator) cu microtorța de plasmă cuplată capacitiv de mică putere și consum redus de argon pentru determinarea și specierea Hg sub formă de CH_3Hg^+ și Hg^{2+} ;
2. Dezvoltarea unei metode de determinare a CH_3Hg^+ din mușchi de pește prin implementarea protocolului de preparare a probei, recomandat de Comisia Europeană, bazat pe o dublă extracție lichid-lichid în sistemul HBr-toluen-soluție apoasă de L-cisteină, derivatizare UV-PVG în mediu de HCOOH și determinare prin μCCP -OES;
3. Optimizarea noului sistem analitic UV/Vis-PVG- μCCP -OES în ceea ce privește condițiile de derivatizare în mediu de HCOOH diluat (concentrația de HCOOH în probă și timpul de iradiere UV), respectiv condițiile de operare a microtorței de plasmă cuplată capacitiv (debitul de Ar, puterea și înălțimea de observare a microplasmei);
4. Studiul extracției Hg total din alimente de origine animală, vegetală și de mediu în HCOOH concentrat prin ultrasonare, respectiv optimizarea condițiilor de extracție (timpul de ultrasonare și raportul dintre cantitatea de probă și HCOOH utilizat);

5. Evaluarea performanțelor analitice ale sistemului analitic miniaturizat UV/Vis-PVG- μ CCP-OES cu/fără preconcentrare, în ceea ce privește limita de detecție (LOD), limita de determinare (LOQ), precizia și acuratețea metodei;
6. Verificarea performanțelor analitice a noii metode UV/Vis-PVG- μ CCP-OES față de cerințele din Legislația Europeană privind determinarea și specierea Hg din probe de alimente și mediu, conform directivelor 2002/657/CE, 2007/333/CE și 2006/1881/CE, respectiv recomandărilor AOAC;
7. Verificarea aplicabilității metodelor UV/Vis-PVG- μ CCP-OES pe probe reale alimentare (mușchi de pește, carne, legume, fructe, cereale, suplimente alimentare) și apă, respectiv compararea rezultatelor obținute cu metodele tradiționale TD-AAS, SnCl₂-CV-AFS și SnCl₂-CV-ICP-OES, folosind testul statistic Bland și Altman;
8. Evaluarea riscului de expunere a populației la Hg total, CH₃Hg⁺ și Hg²⁺ prin consumul de mușchi de pește pe baza următoarelor abordări: (i) calculul intrării săptămânale a Hg total și CH₃Hg⁺ și comparația cu limitele tolerabile săptămânale provizorii (PTWI) de 4 μ g/kg masă corp și 1,3 μ g/kg masă corp, recomandate de EFSA; (ii) calculul coeficienților de hazard țintă (THQ) pentru boli necancerigene pe baza metodologiei recomandate de Agenția pentru Protecția Mediului din SUA (USEPA), (iii) estimarea concentrației de Hg în sânge și păr în conformitate cu studiul de evaluare a riscului de expunere realizat de EFSA;
9. Evaluarea integrată a gradului de verde a noilor metode analitice dezvoltate prin 4 proceduri (Procedura Indicelui Național de Protecție a Mediului (NEMI), Procedura Eco-Scala Analitică (ESA), Procedura Indicelui Analitic Verde (GAPI) și Procedura Pictogramei Analizei Verdeții (AGREE)), respectiv a gradului de alb prin Procedura Roșu-Verde-Albastru (RGB-12), comparativ cu metodele tradiționale utilizate la determinarea Hg.

Prezentarea științifică a tezei

Cercetările din cadrul tezei de doctorat au fost realizate în cadrul proiectului *Metode analitice eco-scală de determinare și speciere a Hg prin derivatizare UV fotoindusă și detecție cu un sistem spectrometric experimental complet miniaturizat (ECOSPEC)*, finanțat de către Autoritatea Națională Română pentru Cercetare Științifică, cod proiect PN-III-P2-2.1-PED-2016-0135, coordonator Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, director de proiect Prof. Univ. Dr. Tiberiu Frențiu.

Teza de doctorat este structurată în două părți, și anume, stadiul actual al cunoașterii, capitolele 1–2, respectiv contribuțiile personale, capitolele 3–7, ultimul capitol fiind dedicat concluziilor și contribuțiilor inovative ale tezei. *Capitolul 1* prezintă principiile Chimiei Analitice Verzi (GAC) și procedurile de evaluare a gradului de verde a metodelor analitice cel mai frecvent utilizate în literatura de specialitate, și anume NEMI, ESA, GAPI și AGREE. De asemenea, sunt

prezentate în detaliu principiile Chimiei Analitice Albe (WAC), respectiv procedura de evaluare RGB-12. A doua parte a capitolului prezintă o scurtă prezentare a câtorva surse de microplasmă utilizate la determinarea și specierea Hg. *Capitolul 2* prezintă aspecte legate de apariția mercurului în mediu, toxicitatea și riscul de expunere a populației, metode cromatografice și necromatografice de determinare și speciere a Hg, respectiv metode de derivatizare clasică și eco-scală bazate pe derivatizarea fotoindusă și sono-indusă în prezența compușilor organici cu masă moleculară mică. *Capitolul 3* prezintă dezvoltarea unei metode de determinare a CH_3Hg^+ în mușchi de pește în urma dublei extracții lichid-lichid în sistemul HBr-toluen-L-cisteină, urmat de determinare prin derivatizare UV fotoindusă în mediu de $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ HCOOH și detecție prin $\mu\text{CCP-OES}$. *Capitolul 4* prezintă o metodă de speciere a Hg sub formă de Hg^{2+} și CH_3Hg^+ în mușchi de pește prin (1) determinarea Hg total din probe mineralizate în amestec de HNO_3 și H_2O_2 , derivatizare clasică cu soluție de 20% (m/v) SnCl_2 în mediu de 5% (v/v) HCl și detecție prin $\text{SnCl}_2\text{-CV-}\mu\text{CCP-OES}$; (2) determinarea CH_3Hg^+ în urma dublei extracții lichid-lichid în sistemul HBr-toluen-L-cisteină, derivatizare fotoindusă în mediu de HCOOH și detecție prin UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$; respectiv (3) calcularea concentrației de Hg^{2+} prin diferență. De asemenea, în acest capitol este prezentat o evaluare a riscului de expunere a populației la Hg prin consumul de pește din soiurile analizate. *Capitolul 5* prezintă o metodă de determinare a Hg total din probe alimentare extrase în HCOOH concentrat prin ultrasonare, derivatizare fotoindusă în mediu de HCOOH și detecție prin UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$ cu/fără preconcentrate pe un microcolector cu filament de aur. Metoda UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$ cu preconcentrate a fost de asemenea aplicată la determinarea Hg total din probe de apă aduse în mediu de $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ HCOOH. *Capitolul 6* prezintă o metodă de speciere a Hg sub formă de Hg^{2+} și CH_3Hg^+ prin UV/Vis-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$ din probe de mușchi de pește extrase în HCOOH. Specierea s-a realizat prin derivatizare selectivă fotoindusă cu radiații UV (lampa pornită), respectiv Vis (lampa oprită) în mediu de $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ HCOOH, pentru determinarea Hg total (suma Hg^{2+} și CH_3Hg^+), respectiv Hg^{2+} . Concentrația CH_3Hg^+ a fost calculată prin diferența Hg total – Hg^{2+} . Deoarece derivatizarea speciilor de Hg^{2+} sub acțiunea radiației Vis a avut loc cu o viteză mult mai mică, a fost necesară preconcentrarea vaporilor de Hg pe microcolectorul cu filament de aur, pentru a atinge sensibilitatea necesară aplicației analitice. *Capitolul 7* prezintă evaluarea gradului de verde și de alb al metodelor dezvoltate bazate pe UV/Vis-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$ cu/fără preconcentrare pe microcolector prin procedurile NEMI, ESA, GAPI, AGREE și RGB-12. În *capitolul 8* sunt prezentate concluziile generale, elementele de originalitate și cele inovative ale tezei în domeniu.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Chimia Analitică Verde și Albă – Principii și metode de evaluare

Conștientizarea necesității protecției mediului a luat naștere după anul 1940, în urma dezvoltării explozive a industriei chimice, cu efecte majore asupra calității mediului. Ca urmare, în anul 1998 Anastas și Warner¹ au introdus conceptul și principiile Chimiei Verzi, iar în anul 2012 a fost introdus cele 12 principii ale Chimiei Analitice Verzi (GAC) de către grupul de cercetare a profesorului Namiesnik². Principiile GAC au în vedere următoarele 4 aspecte: (1) Reducerea sau eliminarea utilizării reactivilor chimici pentru prelucrarea, conservarea și analiza probelor; (2) Reducerea consumului de energie; (3) Tratarea eficientă a reziduurilor; și (4) Creșterea siguranței operatorului.² Din păcate, evaluarea gradului de verde a metodei, fără principii clar definite a fost mult timp lăsată în decizia dezvoltatorului, și din acest motiv evaluarea era de multe ori subiectivă, și nu era justificată corespunzător. Ca urmare, au fost dezvoltate proceduri obiective de evaluare a gradului de verde a noilor metode analitice, dintre care cele mai utilizate sunt: Procedura Indicelui Național al Metodelor de Mediu (NEMI)³, Procedura Eco-Scala Analitică (ESA)⁴, Procedura Indicelui Analitic Verde (GAPI)⁵ și Pictograma Analizei Verdeții (AGREE)⁶.

Deși evaluarea gradului de verde a metodelor analitice se bazează pe criterii obiective, stabilite la nivel calitativ și cantitativ, procedurile s-au dovedit a fi foarte rigide și limitate, deoarece este greu să se evalueze exhaustiv o metodă analitică doar pe baza celor 12 principii GAC, fără să se țină cont de performanțele analitice și aspectele economice și practice ale metodei. Ca urmare, în anul 2021 Nowak și colab.⁷ au introdus cele 12 principii ale Chimiei Analitice Albe (WAC), care presupune caracterizarea metodelor analitice după 3 criterii evidențiate prin culori diferite, și anume criteriul roșu (R, performanța analitică), criteriul verde (G, toxicitatea reactivilor) și criteriul albastru (B, aspecte economice și practice). A fost dezvoltată, de asemenea o metodă de evaluare a gradului de alb prin procedura Roșu-Verde-Albastru (RGB-12). Figura 1.1 prezintă schematic principiile Chimiei Analitice Albe.

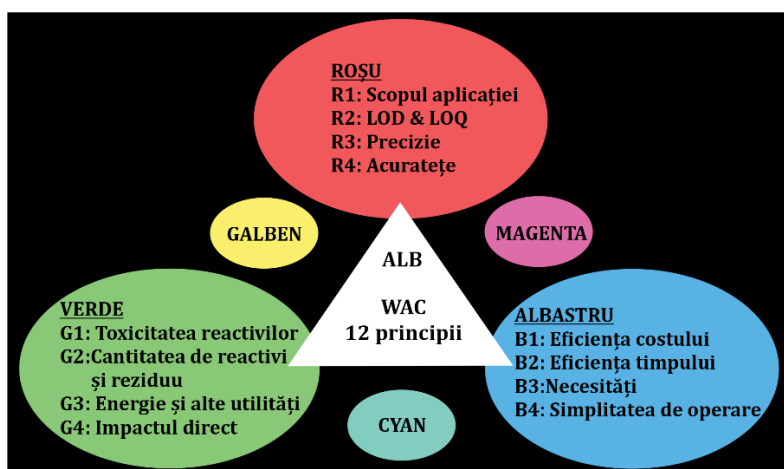


Figura 1.1. Reprezentarea schematică a principiilor Chimiei Analitice Albe^{7,8}

În acord cu noul principiu de spectrometrie atomică verde, introdusă de Bendicho și colab.⁹, direcțiile de cercetare vizează dezvoltarea de instrumentație miniaturizată bazate pe surse de microplazme, miniaturizarea procedurilor de preparare și preconcentrare a analiților, respectiv introducerea de metode verzi de derivatizare. Astfel, au fost dezvoltate o varietate de microplazme, cu avantaje precum (1) consum redus de energie (< 100 W) și Ar (< 1 L min⁻¹); (2) portabilitate datorită dimensiunii mici; (3) posibilitate de interfațare cu sisteme de detecție bazate pe spectrometria de emisie optică (OES), spectrometria de fluorescență atomică (AFS), spectrometria de absorbție atomică (AAS) și spectrometria de masă (MS); (4) determinare multielementală simultană în OES și AFS; (5) spectru simplu de emisie, ceea ce permite utilizarea unor spectrometre de joasă rezoluție pentru înregistrarea spectrelor fără interferențe; și (6) performanțe analitice similare cu instrumentația clasică bazată pe ICP, dacă proba este introdusă sub formă de vapori obținuți prin derivatizare chimică clasică sau fotoindusă.⁹⁻¹³ Figura 1.2 prezintă o clasificare a surselor de microplazme utilizate la determinarea și specierea Hg.

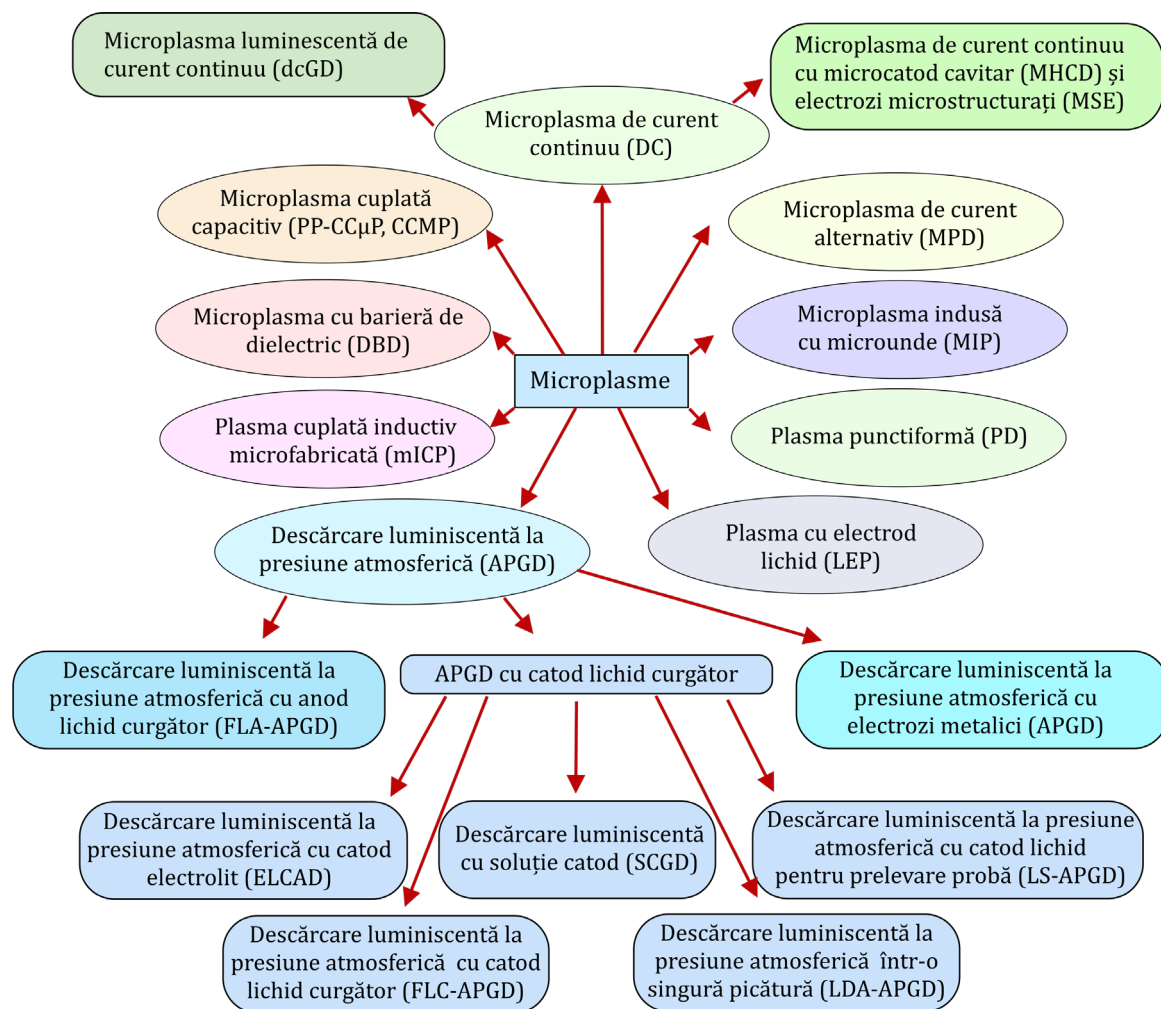


Figura 1.2. Clasificarea surselor de microplasmă

2. Apariția mercurului în mediu și metode de determinare și speciere

Mercurul este un element ubicuitar și apare în mediu într-o diversitate de specii anorganice și organometalice, ca urmare a biodisponibilității ridicate și diverselor procese naturale și antropogenice. În formă anorganică mercurul apare în mediu în stare elementară (Hg^0), compuși mercurici (Hg^{2+}) și compuși mercurioși (Hg_2^{2+}), pe când compușii organometalici cei mai cunoscuți sunt monometilmercurul (MMeHg, CH_3Hg^+), dimetilmercurul (DMeHg, $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}^+$), monoetilmercurul (MEtHg, $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$) și dietilmercurul (DEtHg, $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{Hg}^+$).¹⁴ Principalele surse naturale de Hg prezintă vaporizarea din apele de suprafață, sol și vegetație și erupțiile vulcanice, pe când cele antropogenice sunt industria mineritului, industria energetică prin arderea cărbunelui, industria metalelor neferoase și a cimentului, respectiv incinerarea deșeurilor.¹⁵

Mercurul, în toate formele sale prezintă activitate toxică asupra tuturor organismelor vegetale și animale. Principalul pericol asupra sănătății umane o reprezintă speciile organomercurice, în special CH_3Hg^+ , prin consumul de alimente de origine marină, în care mercurul se află într-o proporție de peste 85% sub formă de CH_3Hg^+ , fiind principala sursă de intrare a CH_3Hg^+ în corpul uman.^{14,16} Efectele negative asupra sănătății umane în urma expunerii la CH_3Hg^+ vizează sistemul nervos, cu efecte negative cognitive asupra gândirii, memoriei, limbajului, mișcării, abilității vizuale spațiale, sistemului cardiovascular și imunitar.¹⁴ Toxicitatea ridicată a CH_3Hg^+ se datorează absorbției ridicate prin tractul intestinal și prin plămâni, respectiv eliminării foarte lente din organism.¹⁷ Datorită efectelor negative multiple asupra organismului uman Comisia Europeană a stabilit o valoare maximă admisă de Hg total de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ în peștii neprădători și 1 mg kg^{-1} în peștii prădători, respectiv o limită maximă de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ în suplimente alimentare.^{18,19} Față de aceasta, EFSA a stabilit o limită tolerabilă săptămânală (PTWI) de $1,3 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ masă corp/săptămână de CH_3Hg^+ și $4 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ masă corp/săptămână de Hg^{2+} în alimente.¹⁴

Pe baza unui studiu, realizat de EFSA, s-a arătat faptul că la nivel European, populația consumă între 10–80 g de carne de pește zilnic, ceea ce rezultă într-o expunere de $0,1\text{--}1,0 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ Hg masă corporală/săptămână pentru un adult de 60 kg, sub limita PTWI. În același studiu s-a evidențiat faptul că un consum de 1–2 porții (150–300 g) de carne de pește pe săptămână nu determină un risc de expunere a populației, indiferent de soiul de pește, fiind chiar benefică asupra sănătății, datorită acizilor grași n-3 polinesaturați cu catenă lungă (omega 3), și a nutrienților esențiali precum iodul, seleniul, calciul, respectiv vitaminelor A, D și E. Totuși, studiul recomandă un consum rezonabil de pești prădători, precum tonul, peștele spadă, rechinul, albioara (merlanul) și știuca.²⁰

Metodele spectrometrice de determinare a Hg total și specierea sa sub formă de Hg^{2+} și CH_3Hg^+ utilizează cel mai adesea derivatizarea la vapori reci (CV). Specierea Hg se bazează fie pe

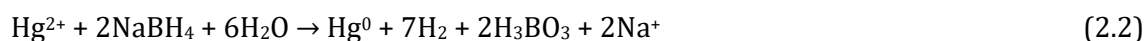
derivatizarea selectivă a speciilor de Hg, fie pe separarea speciilor prin extracția lichid-lichid ca urmare a diferenței de polaritate a speciilor Hg^{2+} și CH_3Hg^+ , urmată de măsurarea directă sau derivatizarea la vapori reci. Vaporii de Hg generați sunt separați de matricea probei prin purjare și introduși în detectorul spectral cu un flux de gaz. Metodele comune utilizate la determinarea Hg total și speciere prin derivatizare selectivă sunt spectrometria de absorbție atomică și generare de vapori reci (CV-AAS),^{21,22} spectrometria de fluorescență atomică și generare de vapori reci (CV-AFS),^{23,24} spectrometria de emisie optică în plasma cuplată inductiv și generare de vapori reci (CV-ICP-OES)²⁵ și spectrometria de masă în plasma cuplată inductiv și generare de vapori reci (CV-ICP-MS)²⁶. Metodele spectrometrice directe de determinare a Hg total, precum spectrometria de absorbție atomică cu desorbție termică (TD-AAS)²⁷, se bazează pe analiza directă din proba solidă sau lichidă fără prelucrare. În cazul specierii este necesară separarea printr-o procedură adecvată, cel mai adesea extracția lichid-lichid.

Derivatizarea la vapori chimici constă în convertirea speciilor originale ionice sau nevolatile din probă în derivate gazoase care pot fi purjate din proba lichidă sau în derivate nepolare volatile, care de asemenea pot fi purjate sau extrase într-un solvent organic nepolar și pot fi separate ulterior prin cromatografia de gaze. În cazul mercurului se utilizează 3 metode clasice de derivatizare pentru determinarea Hg total și specierea sub formă de Hg^{2+} și CH_3Hg^+ : (1) derivatizarea la vapori reci (CV) cu SnCl_2 ; (2) derivatizarea la vapori reci/hidruură cu NaBH_4 și (3) derivatizare prin alchilare (etilare) cu NaBEt_4 .²⁸⁻³⁰ Dintre aceste 3 metode, în cazul metodelor necromatografice, cel mai adesea se utilizează SnCl_2 și NaBH_4 .

Derivatizarea la vapori reci cu SnCl_2 . Reactivul de derivatizare în acest caz este o soluție acidă de SnCl_2 și permite doar derivatizarea selectivă la vapori reci pentru Hg^{2+} . Astfel, pentru determinarea Hg total este necesară mineralizarea completă a probei, care implică reactivi oxidanți, precum HNO_3 și H_2O_2 . Vaporii de Hg rezultați sunt purjați din reactor și introduși în detectorul spectral. Prin utilizarea numai a SnCl_2 nu este posibilă specierea Hg. Reacția de derivatizare cu SnCl_2 în soluție apoasă decurge conform procesului:³¹



Derivatizarea cu NaBH_4 . În acest caz proba în mediu de HCl este amestecată cu o soluție de NaBH_4 stabilizată în mediu bazic. Reacțiile de derivatizare sunt următoarele:³²



În funcție de concentrația NaBH_4 procesul de derivatizare poate fi selectiv sau neselectiv. Astfel, o soluție foarte diluată de NaBH_4 derivatizează selectiv numai Hg^{2+} , pe când o soluție concentrată derivatizează atât Hg^{2+} , cât și CH_3Hg^+ . Cu alte cuvinte, prin controlul concentrației soluției de NaBH_4 este posibilă specierea printr-o metodă necromatografică.³³ De asemenea, prin

combinarea reactivilor NaBH_4 cu SnCl_2 este posibilă specierea prin metode necromatografice, deoarece cu SnCl_2 se determină numai Hg^{2+} , iar cu NaBH_4 se determină suma Hg^{2+} și CH_3Hg^+ .

Printre avantajele utilizării derivatizării, în general și în particular în cazul mercurului pot fi enumerate următoarele: (1) îmbunătățirea substanțială a limitelor de detecție, prin faptul că analitul este introdus în faza gazoasă în sursa de atomizare/excitare, cu un randament de 100%; (2) evitarea efectelor de matrice prin separarea analitului de matricea probei; (3) posibilitatea de speciere a mercurului, fie prin aplicarea derivatizării selective în cazul metodelor spectrale, sau prin utilizarea metodelor combinate cromatografice spectrale.³⁴

Deoarece metodele clasice de derivatizare necesită un mediu concentrat de HCl și necesită reactivi instabili și toxici, au fost dezvoltate metode verzi de derivatizare, care utilizează ca agent de derivatizare compuși organici cu masă moleculară mică (acidul formic, propionic, malonic, oxalic), alcooli (metanol, etanol, n-propanol), formaldehida, acetaldehida, lichide ionice, etc.³⁵, respectiv energii mai prietenoase pentru mediu, dar mai eficiente în derivatizare, precum iradierea UV/Vis sau ultrasonarea. Metodele verzi de derivatizare sunt considerate la ora actuală abordări critice în spectrometria atomică, deoarece au fost aduse îmbunătățiri substanțiale în ceea ce privește sensibilitatea, evitarea efectelor non-spectrale și avantaje economice prin utilizarea unor reactivi mai ieftini, și care nu trebuie preparați zilnic.³⁴⁻³⁶

Procedura de derivatizare fotoindusă are la bază generarea de radicali puternic reactivi prin fotoliza LMWOA, care au capacitatea de a derivatiza eficient Hg^{2+} și CH_3Hg^+ . Reacțiile chimice și detaliile privind posibilitatea determinării Hg total și a specierii prin procedurile UV/Vis-PVG sunt prezentate în detaliu în Capitolul 3, Paragraful 3.4. Față de metodele clasice de derivatizare, prin derivatizarea UV fotoindusă este evitată utilizarea reactivilor anorganici, instabili și toxici, este simplificată procedura de preparare a probei, este posibilă specierea Hg^{2+} și CH_3Hg^+ cu un singur reactiv (HCOOH) dacă se utilizează derivatizarea UV/Vis-PVG, respectiv scade considerabil cantitatea de H_2 generată, care ar putea afecta stabilitatea microplasmiei.^{34,35} Figura 2.1 prezintă schema unui fotoreactor în flux continuu utilizat la determinarea și specierea Hg .

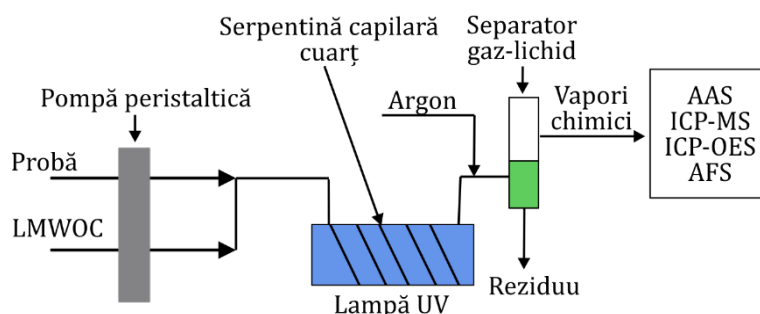


Figura 2.1. Schema unui fotoreactor continuu pentru determinarea și specierea Hg ³⁵

CONTRIBUȚII PERSONALE

3. Determinarea CH_3Hg^+ în alimentația marină prin derivatizare fotoindusă la vapori reci și detecție prin spectrometria de emisie optică în microtorța de plasmă cuplată capacitiv

3.1. Situația la nivel internațional. Ipoteze de lucru și obiective.

În cazul speciilor de Hg, cea mai mare toxicitate față de organismul uman o constituie speciile organomercurice, precum metilmercurul (CH_3Hg^+), care prezintă un efect dăunător de lungă durată asupra sistemului nervos, celui cardiovascular și imunitar.³⁷ Într-un studiu, realizat de Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară (EFSA) în 20 de țări europene pe perioada 2004–2011, a fost evidențiat faptul că riscul de expunere a populației la mercur este prin consumul de carne de pește, în care peste 75% din Hg total se află sub formă de CH_3Hg^+ .¹⁴ Cu toate acestea, în Deciziile elaborate de Comisia Europeană¹⁸ nu se face distincție între speciile organice și anorganice ale Hg, cu toate că este mult mai important să se cunoască conținutul de CH_3Hg^+ , fiind stabilite numai valori PTWI pentru CH_3Hg^+ și Hg^{2+} de către WHO³⁸ și EFSA¹⁴.

Determinarea speciilor de Hg prin metode necromatografice se realizează prin extracție dublă lichid-lichid și/sau derivatizare selectivă la vapori reci cu reactivi toxici, corozivi și instabili, precum SnCl_2 sau NaBH_4 . Din acest motiv, în acord cu principiile Chimiei Analitice Verzi (GAC)², au fost dezvoltate metode de prelucrare a probelor și de determinare a Hg folosind derivatizarea asistată de ultrasunete³⁹, radiații UV⁴⁰ sau microunde⁴¹ în prezența acidului formic sau acidului acetic⁴² cu detecție utilizând microplasmă, precum PD-OES⁴³ sau $\mu\text{CMP-OES}$ ⁴⁴. În anul 2011 Comisia Europeană a elaborat un studiu interlaborator, care a avut drept scop dezvoltarea unor metode de determinare a unor contaminanți problematici în alimente, printre care arsenul și metilmercurul.⁴⁵ Din păcate, la acest studiu au participat numai opt laboratoare din Uniunea Europeană, cele mai multe refuzând invitația, considerând greșit că determinarea CH_3Hg^+ necesită o prelucrare complicată a probei, pe de o parte, nerealizabilă în laboratoarele de analiză de rutină, iar pe de altă parte necesită utilizarea unei instrumentații sofisticate.⁴⁵ Pe baza acestor ipoteze, obiectivul general al studiului a fost dezvoltarea unei metode necromatografice de determinare a CH_3Hg^+ din alimentația de origine marină folosind derivatizarea fotoindusă sub acțiunea radiațiilor ultraviolete și detecția prin spectrometria de emisie optică într-o microtorță de plasmă cuplată capacitiv de mică putere și consum redus de Ar (UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$). Protocolul de preparare a probei a fost în concordanță cu Procedura Standard de Operare (SOP)⁴⁶, dezvoltată de Comisia Europeană pentru determinarea CH_3Hg^+ prin TD-AAS. Față de aceasta noutatea studiului constă în derivatizarea fotoindusă eco-scală cu radiații UV a speciilor de CH_3Hg^+ în mediu de HCOOH și detecție prin $\mu\text{CCP-OES}$ cu consum redus de operare și un microspectrometru de joasă rezoluție.

3.2. Prepararea probelor pentru determinarea CH_3Hg^+ prin UV-PVG- μCCP -OES

Prepararea probelor CRM (4 probe) și a celor test de mușchi de pește liofilizate (12 probe) a fost în acord cu procedura SOP,⁴⁶ dezvoltată de Comisia Europeană (Figura 3.1). Extracțiile s-au realizat în eprubete de plastic de 50 mL prin umectarea a 200 mg probă cu 0,5 mL apă ultrapură, urmată de adăugarea a 10 mL soluție 47% (m/m) HBr și agitare manuală viguroasă timp de 2–3 minute. CH_3Hg^+ extras în HBr a fost apoi extras succesiv în 20 mL, respectiv 15 mL de toluen prin agitare puternică timp de 10 minute. Cele două faze au fost separate prin centrifugare, iar supernatantele au fost introduse într-un tub de centrifugă, peste care s-au adăugat 6 mL soluție 1% (m/v) L-cisteină. Re-extracția CH_3Hg^+ din faza organică în faza apoasă de L-cisteină s-a realizat prin agitare vortex, a fost prelevată cu o pipetă Pasteur și transvazată într-un recipient de sticlă cu dop. Paralel cu probele, s-au preparat soluții blanc după aceeași procedură. În vederea determinării CH_3Hg^+ prin UV-PVG- μCCP -OES, volume alicote de 1–5 mL extract apos au fost diluate la 50 mL în mediu de $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ HCOOH. Determinările prin TD-AAS s-au efectuat direct pe extractele apoase cu L-cisteină.

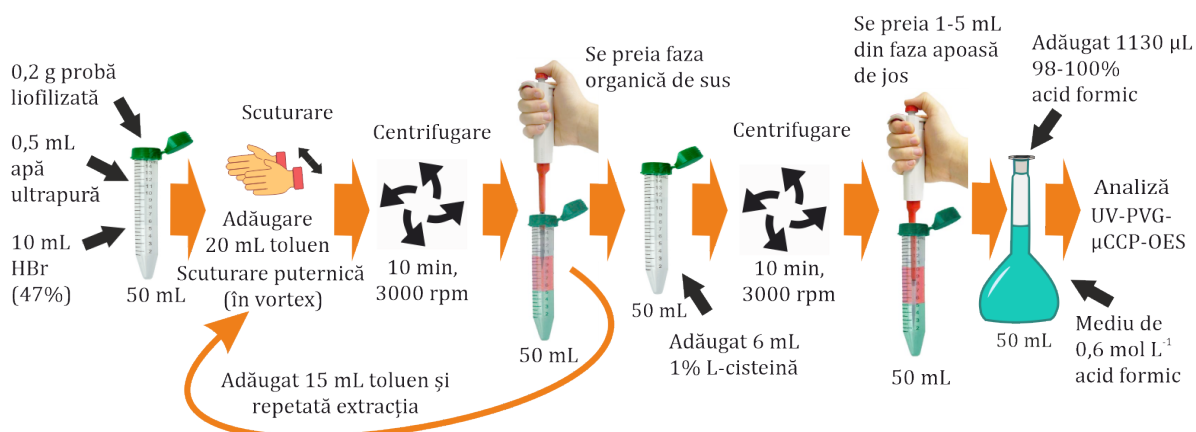


Figura 3.1. Schema de pregătire a probelor de mușchi de pește prin extracția dublă lichid-lichid pentru determinarea CH_3Hg^+ prin UV-PVG- μCCP -OES^{46,47}

3.3. Instrumentația UV-PVG- μCCP -OES

Schema de principiu a modelului experimental UV-PVG- μCCP -OES este prezentată în Figura 3.2, iar condițiile de operare în Tabelul 3.1. Fotoreactorul (Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, Romania) a constatat dintr-un tub de PTFE (1 mm d.i. x 1,5 mm d.e. x 120 cm lungime, limita de tăiere 185 nm), înfășurat în jurul unei eprubete de cuarț a digesterului UV 705 Metrohm (Herisau, Elveția), dotat cu o lampă de Hg de mare putere (500 W). Proba a fost pompată prin fotoreactor în separatorul de faze gaz-lichid (Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, România) cu pompa peristaltică MasterFlex L/S Model 7535-04 Cole Parmer (Montreal, Canada). Vaporii de Hg au fost purjați din soluție cu un flux de Ar (5.0, Linde, Cluj-Napoca, Romania) și introduși în

microtorța de plasmă prin 4 orificii cu diametrul de 75 μm . Microtorța a constat dintr-un tub de cuarț optic (5 mm d.i., 1,25 mm grosime perete, lungime 25 mm, limita de tăiere 160 nm), așezat într-un corp de teflon în centrul căruia este montat microelectrodul vârf de Mo (diametrul 1,25 mm), pentru cuplarea puterii de radiofrecvență.⁴⁷

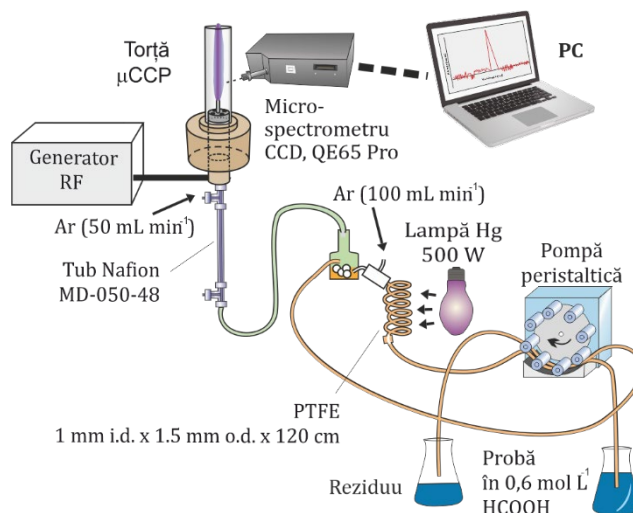


Figura 3.2. Montajul experimental UV-PVG- μCCP -OES folosit la determinarea CH_3Hg^+ ⁴⁷

Pentru alimentarea plasmelor s-a folosit un generator de radiofrecvență de putere mică (10–30 W, 13,56 MHz, 15 x 17 x 24 cm^3 , Universitatea Tehnică din Cluj-Napoca, România). Microplasma se dezvoltă sub forma unei descărcări de culoare albastră, difuză, la vârful microelectrodului de Mo. Uscarea fluxului de Ar cu vaporii de mercur purjați din proba lichidă s-a realizat cu o membrană Nafion Perma Pure MD-050-48 (120 cm lungime, Chromoservis, Praha, Republica Cehă) cu o eficiență de până la 90 % (punct de condensare $-8\text{ }^\circ\text{C}$), intercalată între separatorul de faze gaz-lichid și microtorța de plasmă. Uscarea a fost necesară pentru a îndepărta vaporii de apă, care afectează stabilitatea descărcării de putere mică, respectiv eficiența excitării atomilor de Hg. Pentru înregistrarea spectrelor de emisie a plasmelor și a Hg la 253,652 nm s-a utilizat microspectrometrul Ocean Optics QE65 Pro (domeniul spectral de 190–380 nm, 0,4 nm FWHM, Dunedin, SUA), echipat cu un sistem de răcire Peltier ($-20\text{ }^\circ\text{C}$). Semnalul de emisie observat radial printr-o lentilă cu distanța focală de 10 mm a fost înregistrat cu softul SpectraSuite a microspectrometrului. Determinarea CH_3Hg^+ prin UV-PVG- μCCP -OES s-a realizat pe baza calibrării externe cu soluții de Hg^{2+} pe domeniul de concentrație 0–5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg^{2+} în mediu de 0,6 mol L^{-1} HCOOH ($n=7$ soluții standard). Efectul de memorie între probe a fost eliminat prin pomparea soluției blanc de 0,6 mol L^{-1} HCOOH prin fotoreactor timp de 40 s.

Rezultatele obținute prin UV-PVG- μCCP -OES au fost comparate cu metoda TD-AAS de determinare a CH_3Hg^+ în conformitate cu metoda recomandată de Comisia Europeană, direct din extractul apos de 1% L-cisteină⁴⁶. În acest scop a fost folosit Analizorul Automat de Mercur Hydra IIC, Teledyne Instruments (Leeman Labs, Hudson, New Hampshire SUA).

Tabelul 3.1. Condițiile de lucru a sistemului experimental UV-PVG- μ CCP-OES folosit la determinarea CH_3Hg^+ prin calibrare externă⁴⁷

<i>Generarea fotoindusă a vaporilor reci de Hg</i>	
Concentrația HCOOH (mol L^{-1})	0–1,4; optim 0,6
Timpul de iradiere probă (s)	3–33; optim 5
Debitul probei (mL min^{-1})	1,5–13,5; optim 10
<i>Generarea plasmei</i>	
Debit Ar (mL min^{-1})	50–200; optim 100
Putere (W)	10–20; optim 15
<i>Înregistrarea semnalului de emisie a Hg</i>	
Lungimea de undă (nm)	253,652
Procesare semnal	Înălțime pic
Timp de integrare (s)	10
Înălțimea de observare a plasmei (mm)*	0–2,6, optim 1,6
Tipul corecției de fond	Liniară în două puncte

3.4. Optimizarea operării sistemului analitic UV-PVG- μ CCP-OES

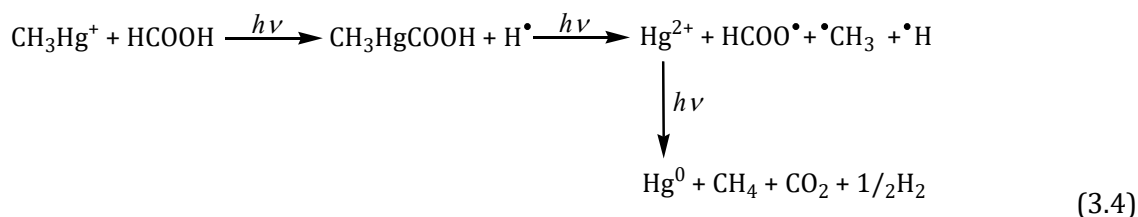
Au fost optimizate condițiile de operare a sistemului analitic UV-PVG- μ CCP-OES pentru a obține cea mai bună sensibilitate a metodei. În acest sens, au fost optimizate condițiile de derivatizare fotoindusă a speciei de CH_3Hg^+ la vapori de Hg, precum concentrația acidului formic, timpul de iradiere UV a probei și condițiile de operare a plasmei, precum puterea, debitul de Ar și înălțimea de observare.⁴⁷

Influența concentrației HCOOH asupra semnalului obținut în urma generării de vapori reci a $1,00 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1} \text{Hg}^{2+}$ și $1,00 \pm 0,10 \mu\text{g L}^{-1} \text{Hg}^{2+}$ ca CH_3Hg^+ , obținută în urma extracției din CRM DOLT-4, a fost studiată în domeniul 0–1,4 mol L^{-1} . A fost observat faptul că reacția de derivatizare la vapori la reci a speciilor de Hg^{2+} și CH_3Hg^+ decurge cu aceeași eficiență, indiferent de concentrația HCOOH, fiind astfel posibilă derivatizarea ambelor specii de Hg în prezența radiației UV prin reacții radicalice de fotoliză.⁴⁸⁻⁵⁰ Ca urmare, rezultă că este posibilă determinarea CH_3Hg^+ prin metoda UV-PVG- μ CCP-OES, folosind calibrarea externă cu soluții de Hg^{2+} , la o concentrație optimă de 0,6 mol L^{-1} HCOOH.⁴⁷

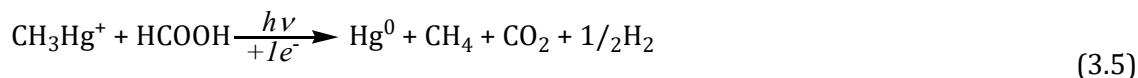
Reacțiile de fotoliză a acidului formic sub acțiunea radiației UV sunt următoarele:⁴⁸



Etaplele reacției de derivatizare la vapori reci a speciei de CH_3Hg^+ de către HCOOH sunt următoarele:



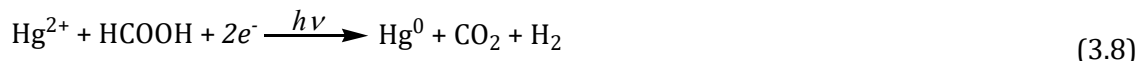
Reacția generală de derivatizare este:



Reacțiile posibile de derivatizare la vapori reci a Hg^{2+} în acid formic, în prezența radiației UV sunt următoarele:⁴⁸



Reacția generală de derivatizare este:

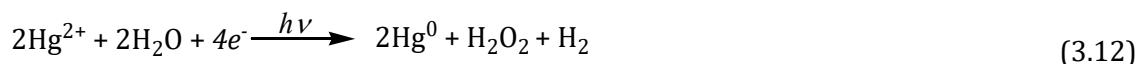


Conform datelor termodinamice din literatură a fost evidențiat faptul că reacția de derivatizare fotoindusă a CH_3Hg^+ în mediu de HCOOH este una exotermă și spontană la temperatura de 298 °K (25 °C).⁴⁸⁻⁵⁰ De asemenea, entalpia liberă a celor două reacții în prezența acidului formic este similară (-204,5 kJ mol⁻¹ pentru Hg^{2+} , ecuația 3.8, și -206,4 kJ mol⁻¹ pentru CH_3Hg^+ , ecuația 3.5), ceea ce conduce la ideea că ambele reacții decurg cu viteze apropiate în condiții similare de derivatizare.

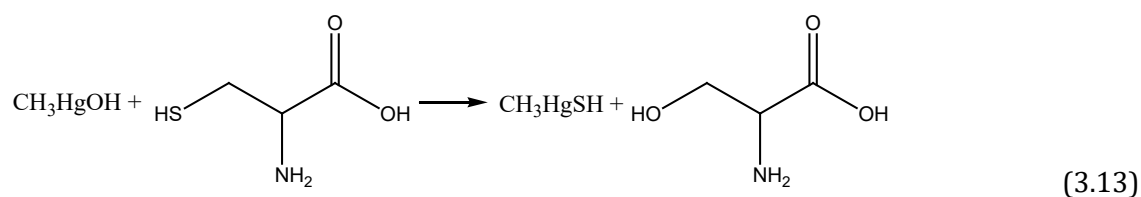
Apariția semnalului de emisie a Hg, chiar și în absența acidului formic, se datorează fotolizei moleculei de apă în prezența radiației ultraviolete, care generează radicali $\bullet\text{OH}$ și $\bullet\text{H}$, capabili să derivatizeze speciile de Hg^{2+} și CH_3Hg^+ la vapori reci⁴⁹. Reacțiile sunt:



Reacția totală este:



În conformitate cu constanta de stabilitate a speciilor de CH_3Hg^+ în soluție apoasă⁵⁰, aceasta este prezentă sub formă hidrolizată de CH_3HgOH , iar în prezența L-cisteinei (acidul 2-amino-3-sulhidril propanoic) are loc următoarea reacție de schimb ionic:



Această reacție chimică este în conformitate cu constanta de stabilitate mai mare a speciei CH_3HgSH comparativ cu CH_3HgOH , ceea ce sugerează că utilizarea L-cisteinei pentru extracție în soluția apoasă, în procedura de extracție, este justificată prin creșterea stabilității speciei de CH_3Hg^+ și creșterea randamentului de extracție din toluen.

Timpul de iradiere UV a fost optimizat pe baza semnalului de emisie a unei soluții etalon, cu o concentrație de $1,00 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1} \text{Hg}^{2+}$, și o soluție de $1,00 \pm 0,10 \mu\text{g L}^{-1} \text{Hg}^{2+}$ ca CH_3Hg^+ din CRM DOLT-4. Rezultatele au demonstrat o scădere exponențială a semnalului Hg odată cu creșterea timpului de iradiere, pentru ambele specii de Hg. Timpul optim de iradiere a fost stabilit la 5 s, care a asigurat derivatizarea eficientă pentru ambele specii de Hg. Timpul foarte mic de expunere a probei la radiația UV a eliminat pierderile de vapori de Hg prin readsorbție în fluxul de probă, sau prin adsorbție pe pereții capilarei de teflon.⁴⁷

Studiul de optimizare a microplasmiei a indicat un debit optim de 100 mL min^{-1} Ar, o putere de 15 W și o înălțime de observare de 1,6 mm deasupra microelectrodului de vârf, condiții în care a fost obținut un semnal maxim de emisie al Hg și cea mai bună LOD pentru CH_3Hg^+ .⁴⁷

3.5. Caracterizarea și validarea metodei UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$ prin analiza de materiale de referință certificate și evaluarea performanțelor analitice

Caracterizarea metodei UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$ s-a realizat prin evaluarea parametrilor de performanță analitică (LOD, LOQ, precizia și acuratețea).⁵¹ Conform rezultatelor prezentate în Tabelul 3.2, valoarea LOD obținută pentru determinarea CH_3Hg^+ prin UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$ a fost de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ în proba solidă, fiind de aproximativ două ori mai bună față de cea obținută prin metoda TD-AAS de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Deoarece limitele de detecție și de determinare a CH_3Hg^+ prin metoda UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$ sunt de 250, respectiv 85 de ori mai mici decât valoarea maximă admisă a Hg în mușchiul de pește ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$)¹⁸, metoda dezvoltată satisface cerințele impuse de Comisia Europeană în Decizia 2007/333/CE⁵² cu privire la determinarea CH_3Hg^+ din alimente de origine marină.

Rezultatele evaluării acurateții metodei UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$ prin analiza de materiale standard certificate (CRM), comparativ cu metoda tradițională TD-AAS, sunt prezentate în Tabelul 3.3. Gradele de regăsire obținute prin metoda UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$ s-au încadrat între 97–102%, îndeplinind cerința Comisiei Europene din Decizia 2002/657/CE⁵³ care impune o încadrare între 90–110%, pentru un nivel de încredere de 95%. Astfel, metoda UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$ poate fi considerată că nu prezintă erori sistematice la determinarea CH_3Hg^+ .

Tabelul 3.2. Parametri curbelor de etalonare, LOD și LOQ la determinarea CH₃Hg⁺ prin UV-PVG-μCCP-OES și TD-AAS⁴⁷

	Metoda	
	UV-PVG-μCCP-OES	TD-AAS
Domeniul de etalonare	0–5 (μg L ⁻¹) (n=7)	0–0,025 (μg) (n=5)
Panta curbei de etalonare	2150 ± 9 (înălțime pic/μg L ⁻¹)	11780 ± 81 (arie semnal/μg)
Intercepția	3,5	8640
Sensibilitatea analitică (γ) ^a	238	145
s _{y/x} ^b	6,2	3005
Coeficientul de corelație (r)	0,9999	0,9999
LOD ^c (ng L ⁻¹)	7	-
(μg kg ⁻¹)	2 ^d	5 ^e
LOQ ^f (μg kg ⁻¹)	6	10

^a Sensibilitatea analitică, exprimată ca raportul dintre Panta curbei de etalonare și Deviația standard a pantei; ^b s_{y/x} este deviația standard a rezidualelor; ^c Limita de detecție (LOD) în proba lichidă; ^d LOD în proba solidă pentru UV-PVG-μCCP-OES calculată pentru 200 mg probă supusă extracției și o diluție ulterioară de 10 ori; ^e LOD pentru metoda TD-AAS calculată pentru un volum alicot de 200 μL soluție și 200 mg probă extrasă în 6 mL soluție 1% (m/v) L-cisteină; ^f LOQ în proba solidă considerată ca fiind 3xLOD.

Selectivitatea metodei UV-PVG-μCCP-OES a fost verificată prin determinarea gradului de regăsire a CH₃Hg⁺ după aplicarea unei diluții a probei de 10–50 ori și determinarea concentrației concomitanților, precum anionii (Br⁻, Cl⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻, F⁻), metalele (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Cr) și carbonul organic total (TOC). Rezultatele au indicat faptul că prezența anionilor între 0,1–5,2 mg L⁻¹, a metalelor între <LOD – 0,6 mg L⁻¹ și a TOC de 0,12–0,65 mg L⁻¹ nu au cauzat interferențe non-spectrale la determinarea CH₃Hg⁺.⁴⁷ Determinarea anionilor s-a realizat cu Cromatograful de Ioni 761 Compact IC (Metrohm, Herisau, Elveția), a metalelor prin ICP-OES folosind spectrometrul Spectro CIROS^{CCD} cu vizare axială (Kleve, Germania), și TOC cu ajutorul Analizorului N/C 2100S (Analytik Jena, Jena, Germania).

Tabelul 3.3. Rezultatele (mg kg⁻¹) obținute pentru CH₃Hg⁺ în materiale certificate de referință prin UV-PVG-μCCP-OES și TD-AAS⁴⁷

CRM	Valoare certificată ± U ^a	Valoare găsită ± C.I. ^{b,c}		Grad de regăsire ± C.I. ^c	
		UV-PVG-μCCP-OES	TD-AAS	UV-PVG-μCCP-OES	TD-AAS
TORT-2	0,152 ± 0,013	0,152 ± 0,014	0,152 ± 0,015	100 ± 9	100 ± 10
DOLT-4	1,33 ± 0,12	1,34 ± 0,13	1,36 ± 0,14	101 ± 10	102 ± 10
BCR-463	3,04 ± 0,16	3,03 ± 0,22	2,97 ± 0,26	100 ± 7	98 ± 9
ERM-CE464	5,50 ± 0,17	5,36 ± 0,33	5,38 ± 0,35	97 ± 6	98 ± 7
Grad de regăsire mediu ± C.I. ^d				99 ± 8	99 ± 9

^a U este incertitudinea extinsă; ^b C.I. este intervalul de încredere pentru un nivel de încredere de 95%; ^c n = 5 extracții complete pentru fiecare probă; ^d C.I. este intervalul de încredere cumulat.

3.6. Aplicarea metodei UV-PVG- μ CCP-OES la determinarea CH_3Hg^+ din probe reale de mușchi de pește

Tabelul 3.4 prezintă concentrațiile de CH_3Hg^+ în probele test de mușchi de pește determinate prin UV-PVG- μ CCP-OES, în comparație cu TD-AAS. Valorile obținute au fost între 0,044–0,208 mg kg^{-1} CH_3Hg^+ în cazul metodei UV-PVG- μ CCP-OES și 0,041–0,202 mg kg^{-1} în cazul metodei TD-AAS. În toate probele analizate nu a fost depășită limita maximă admisă de Hg total în carnea de pește (0,5 mg kg^{-1}), conform Deciziei 1881/2006/EC.¹⁸

Tabelul 3.4. Rezultatele (mg kg^{-1}) obținute la determinarea CH_3Hg^+ în mușchi de pește prin metoda UV-PVG- μ CCP-OES și TD-AAS⁴⁷

Proba	UV-PVG- μ CCP-OES			TD-AAS		
	Medie \pm C.I. ^a	RSD ^b (%)	HorRat ^c	Medie \pm C.I.	RSD (%)	HorRat
1	0,176 \pm 0,017	4,9	0,26	0,165 \pm 0,018	5,5	0,29
2	0,208 \pm 0,019	4,6	0,24	0,198 \pm 0,021	5,2	0,27
3	0,129 \pm 0,020	7,9	0,42	0,121 \pm 0,021	8,6	0,45
4	0,195 \pm 0,021	5,4	0,28	0,202 \pm 0,022	5,5	0,29
5	0,097 \pm 0,018	9,4	0,49	0,089 \pm 0,019	10,4	0,55
6	0,115 \pm 0,016	7,2	0,38	0,120 \pm 0,017	7,1	0,37
7	0,154 \pm 0,025	8,0	0,42	0,155 \pm 0,021	6,9	0,36
8	0,100 \pm 0,008	4,0	0,21	0,097 \pm 0,008	4,0	0,21
9	0,044 \pm 0,003	3,9	0,21	0,041 \pm 0,005	6,4	0,34
10	0,117 \pm 0,007	2,8	0,15	0,118 \pm 0,009	3,7	0,19
11	0,099 \pm 0,005	2,7	0,14	0,097 \pm 0,007	3,5	0,18
12	0,172 \pm 0,017	4,8	0,25	0,169 \pm 0,025	7,5	0,39
Minim	0,044 \pm 0,003	2,7	0,14	0,041 \pm 0,005	3,5	0,18
Maxim	0,208 \pm 0,019	9,4	0,49	0,202 \pm 0,022	10,4	0,55
Medie	0,134 \pm 0,016	5,5	0,29	0,131 \pm 0,017	6,2	0,32

^a C.I. este intervalul de încredere pentru un nivel de încredere de 95% și factor de acoperire $k=2$ (5 extracții complete); ^b RSD(%) este deviația standard relativă procentuală; ^c Indicele HorRat pentru un PRSD de 19%

Precizia metodei UV-PVG- μ CCP-OES, evaluată prin măsurări repetate a probelor test și exprimată prin RSD a fost între 2,7–9,4% (Tabelul 3.4), și satisface cerința Asociației Chimicilor Analști Oficiali (AOAC)⁵⁴ și a Comisiei Europene din Decizia 2007/333/EC⁵².

Rezultatele obținute în urma testului statistic Bland și Altman sunt prezentate în Tabelul 3.5. S-a stabilit că nu există diferențe semnificative între rezultatele obținute prin UV-PVG- μ CCP-OES și TD-AAS, diferențele încadrându-se între limitele de încredere de 0,026 și -0,020 mg kg^{-1} CH_3Hg^+ . Eroarea sistematică pozitivă (0,003 \pm 0,007 mg kg^{-1}) înspre metoda UV-PVG- μ CCP-OES față de TD-AAS este întâmplătoare, deoarece intervalul de încredere conținea valoare zero, respectiv valoarea absolută a bias-ului este nesemnificativă în comparație cu concentrațiile de CH_3Hg^+ determinate în probele de mușchi de pește. Valorile deviațiilor standard obținute în cadrul fiecărei metode și între metode au dovedit o bună repetabilitate a măsurătorilor, iar diferențele observate au fost întâmplătoare. În concluzie, testul statistic Bland și Altman a dovedit că metoda

UV-PVG- μ CCP-OES asigură corectitudinea măsurării CH_3Hg^+ în alimente de origine marină comparativ cu metoda de referință TD-AAS, în cazul utilizării calibrării externe cu soluții de Hg^{2+} .

Tabelul 3.5. Rezultatele obținute în urma testului statistic Bland și Altman la determinarea CH_3Hg^+ ($m = 5$ măsurări pentru fiecare probă) din mușchi de pește pentru un nivel de încredere de 95%⁴⁷

Domeniul de concentrație de CH_3Hg^+ ca Hg (mg kg^{-1})	Numărul de probe analizate	SUV-PVG- μ CCP-OES ^a (mg kg^{-1})	STD-AAS ^a (mg kg^{-1})	$S_{B_{X-Y}}$ ^b (mg kg^{-1})	Bias ^c (mg kg^{-1})	Limite de încredere ^d (mg kg^{-1})
0,043-0,203	12	0,008	0,008	0,012	0,003 \pm 0,007	0,026 \pm 0,008 -0,020 \pm 0,008

^a Deviația standard medie a rezultatelor obținute prin UV-PVG- μ CCP-OES, respectiv TD-AAS.

^b Deviația standard medie a rezultatelor obținute între metoda UV-PVG- μ CCP-OES și TD-AAS.

^c Eroarea sistematică pentru un nivel de încredere de 95%.

3.7. Concluzii

Rezultatele obținute în urma dezvoltării metodei UV-PVG- μ CCP-OES la determinarea CH_3Hg^+ în mușchiul de pește au condus la următoarele concluzii:

1. Metoda UV-PVG- μ CCP-OES satisface cerințele Comisiei Europene în ceea ce privește performanțele analitice (LOD, LOQ, acuratețea, precizia) impuse pentru determinarea Hg în alimentația marină;
2. Parametri de performanță ai metodei UV-PVG- μ CCP-OES sunt similari cu cei ai metodei TD-AAS recomandată de Comisia Europeană, iar testul statistic Bland și Altman a demonstrat că nu există diferențe semnificative între cele două, și drept urmare UV-PVG- μ CCP-OES poate fi considerată o alternativă la TD-AAS;
3. Metoda UV-PVG- μ CCP-OES este sensibilă și poate fi considerată ca fiind eco-scală prin procedura simplă de preparare a probei fără oxidarea suplimentară a CH_3Hg^+ , eliminarea reactivilor scumpi și instabili pentru derivatizare, și prin utilizarea instrumentației complet miniaturizate cu consum redus de energie și argon;
4. Derivatizarea instantanee la vapori reci prin iradiere UV, cu eficiență similară pentru Hg^{2+} și CH_3Hg^+ , a permis dezvoltarea unei metode *on-line* de determinare a CH_3Hg^+ prin etalonare externă cu soluții de Hg^{2+} fără interferențe non-spectrale;
5. Prin rezultatele obținute și prin procedura de abordare analitică de preparare a probei și de determinare, folosind derivatizarea fotoindusă a CH_3Hg^+ fără interferențe non-spectrale și prin utilizarea calibrării externe cu soluții de Hg^{2+} , au fost aduse îmbunătățiri substanțiale metodei de determinare a CH_3Hg^+ , și în consecință metoda UV-PVG- μ CCP-OES poate fi considerată o abordare inovativă în cadrul spectrometriei atomice verzi.

4. Specierea CH_3Hg^+ și Hg^{2+} în alimentația marină prin derivatizare clasică și UV fotoindusă la vapori reci și spectrometria de emisie optică în microtorța de plasmă cuplată capacitiv

4.1. Situația la nivel internațional. Ipoteze de lucru și obiective.

Pe baza datelor colectate de EFSA în ceea ce privește prezența Hg în alimente și furaje comercializate în 20 de țări europene în decursul anilor 2004-2011 au rezultat următoarele: (1) sursa principală de expunere a populației la Hg o constituie alimentația de origine marină, care reprezintă o pondere de 17,6–36,8% în alimentația oamenilor; (2) peste 98% din datele colectate de EFSA se referă doar la conținutul total de Hg în astfel de alimente, și sub 2% se referă la specierea Hg sub formă de CH_3Hg^+ și Hg^{2+} .¹⁴ Într-un alt studiu, EFSA a abordat riscul de expunere la Hg împreună cu beneficiile asigurate de către acizii grași n-3 polinesaturați cu catenă lungă (omega 3 și omega 6), prin consumul de carne de pește, și a arătat că un consum de 1–4 porții de carne de pește, în funcție de soi, pe săptămână nu constituie risc de expunere la Hg, dacă concentrația este sub valoarea maximă admisă de $0,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Hg}^{18}$ și se asigură efectele benefice asupra sistemului cardiovascular.²⁰

După cum a fost arătat în capitolul anterior, conform studiului realizat de Comisia Europeană, multe laboratoare consideră determinarea și specierea Hg complicată, datorită prelucrării laborioase a probei și a instrumentației sofisticate necesară pentru detecție.⁴⁵ Pe de altă parte, determinarea Hg total/ CH_3Hg^+ în alimentele de origine marină, și nu numai, este importantă pentru a stabili concentrația maximă admisă pentru CH_3Hg^+ , față de cea a Hg total. În acest scop, dezvoltarea de noi metode cât mai simple, ieftine și accesibile, este de mare interes, și încurajată de Comisia Europeană. Astfel, pe baza acestor considerente, obiectivul principal prezentului studiu a fost dezvoltarea unei metode de speciere a Hg sub formă de CH_3Hg^+ și Hg^{2+} din mușchi de pește, utilizând instrumentația complet miniaturizată cu microtorța de plasmă cuplată capacitiv și detecție prin spectrometrie de emisie optică. Specierea Hg a constat în: (i) Determinarea Hg total din probe mineralizate în HNO_3 și H_2O_2 prin derivatizare la vapori reci cu o soluție de 20% (m/v) SnCl_2 în mediu de 15% (v/v) HCl; (ii) Determinarea CH_3Hg^+ prin derivatizare UV fotoindusă în mediu de $0,6 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCOOH}$, în urma separării prin extracție lichid-lichid în sistemul HBr-toluen-soluție L-cisteină, și (iii) Calcularea concentrației de Hg^{2+} prin diferența Hg total - CH_3Hg^+ . În conformitate cu datele din literatură, noutatea constă în dezvoltarea și validarea unei metode simple de speciere a Hg bazată pe spectrometria de emisie optică într-o microplasmă cuplată capacitiv, echipată cu un microspectrometru de joasă rezoluție, care oferă avantaje economice prin consumul redus de energie și de Ar pentru susținerea plasmei.

4.2. Prepararea probelor pentru specierea Hg sub formă de CH_3Hg^+ și Hg^{2+} în alimentația marină prin $\text{SnCl}_2\text{-CV-}\mu\text{CCP-OES}$ și $\text{UV-PVG-}\mu\text{CCP-OES}$

Probele au constat din 4 CRM-uri, utilizate la verificarea acurateții metodei de speciere prin $\text{SnCl}_2\text{-CV-}\mu\text{CCP-OES}$ și $\text{UV-PVG-}\mu\text{CCP-OES}$, respectiv din 15 probe test de mușchi de pește, din diferite soiuri de pește (dintre care 8 de origine oceanică și 7 de acvacultură). Prepararea probelor pentru determinarea Hg total a constat în mineralizarea acestora cu 8 mL HNO_3 și 2 mL H_2O_2 în digesterul de microunde Berghof MWS3+ (Berghof, Germania), iar pentru determinarea CH_3Hg^+ s-a utilizat dubla extracție lichid-lichid în sistemul HBr-toluen-L-cisteină, prezentată în Capitolul 3, Paragraful 3.2. Pentru determinarea conținutului total de grăsime din probele de pește s-a utilizat extracția Soxhlet, conform procedurii descrise în SR ISO 1443:2008.⁵⁵

4.3. Instrumentația $\text{SnCl}_2\text{-CV-}\mu\text{CCP-OES}$ și $\text{UV-PVG-}\mu\text{CCP-OES}$

Elementele componente ale instrumentației folosite la specierea Hg au fost similare cu cele prezentate în Capitolul 3, Paragraful 3.3, cu următoarea diferență, după cum urmează. Microtorța de plasmă cuplată capacitiv a fost interfațată atât cu generatorul HGX-200 în flux continuu pentru determinarea Hg total, cât și cu fotoreactorul utilizat anterior pentru determinarea CH_3Hg^+ (Figura 4.1). Generatorul de hidruură HGX-200 (Teledyne Cetac Technologies, Nebraska, SUA) a fost utilizat pentru generarea vaporilor reci de Hg prin amestecarea fluxului continuu de probă cu reactivul de derivatizare, soluția de 20% (m/v) SnCl_2 în 15% (v/v) HCl. Vaporii de Hg generați au fost separați în separatorul gaz-lichid și au fost introduși în plasmă cu un flux de Ar la debitul de 150 mL min^{-1} , printr-un tub Nafion pentru uscare. Semnalul de emisie a Hg total a fost măsurat la $253,652 \text{ nm}$ cu ajutorul microspectrometrului Ocean Optics QE65 Pro. Condițiile optime de lucru pentru determinarea Hg total prin $\text{SnCl}_2\text{-CV-}\mu\text{CCP-OES}$ și a CH_3Hg^+ prin $\text{UV-PVG-}\mu\text{CCP-OES}$ sunt prezentate în Tabelul 4.1.

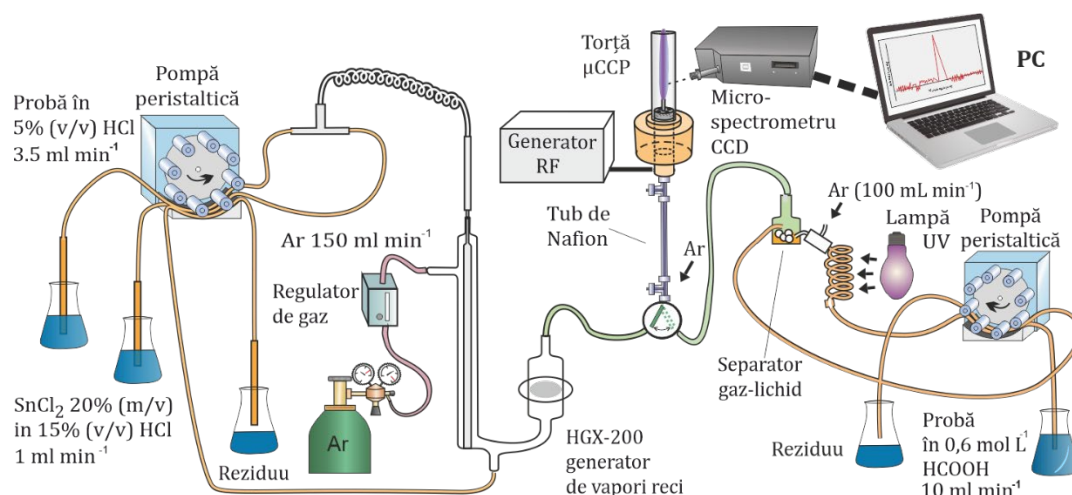


Figura 4.1. Reprezentarea schematică a montajului experimental $\text{SnCl}_2\text{-CV-}\mu\text{CCP-OES}$ (partea stângă) și $\text{UV-PVG-}\mu\text{CCP-OES}$ (partea dreaptă) pentru specierea Hg sub formă de CH_3Hg^+ și Hg^{2+} ⁵⁶

Tabelul 4.1. Condițiile optime de lucru la determinarea Hg total din alimentația de origine marină prin SnCl₂-CV-μCCP-OES și a CH₃Hg⁺ prin UV-PVG-μCCP-OES⁵⁶

Parametru analitic	Hg total SnCl ₂ -CV-μCCP-OES	CH ₃ Hg ⁺ UV-PVG-μCCP-OES
Generatorul de vapori reci	HGX - 200	Fotoreactor, tub PTFE (1 mm d.i. x 1.5 mm d.e. x 120 cm lungime) înfășurat în jurul unei eprubete de cuarț a digestorului UV 705 dotat cu lampă de Hg de 500 W (Metrohm, Elveția)
Mediu probă/CRM/etaloane	5% (v/v) HCl	0,6 mol L ⁻¹ HCOOH
Proba blanc	5% (v/v) HCl	0,6 mol L ⁻¹ HCOOH
Reactivul de derivatizare	20% (m/v) SnCl ₂ în 15% (v/v) HCl	0,6 mol L ⁻¹ HCOOH
Debitul probei (mL min ⁻¹)	3,5	10
Debitul reactivului de derivatizare (mL min ⁻¹)	1	-
Timpul de iradiere UV (s)	-	5
Puterea plasmei (W)	10	15
Debitul de Ar (mL min ⁻¹)	150	100
Înălțimea de vizare (mm)	1,8	1,6
Lungimea de undă (nm)	253,652	253,652
Măsurarea semnalului	Înălțime pic	Înălțime pic
Timpul de integrare (s)	10	10
Corecția de fond	Model liniar în două puncte	Model liniar în două puncte

4.4. Caracterizarea și validarea metodei UV-PVG-μCCP-OES prin analiza de materiale de referință certificate și evaluarea performanțelor analitice

LOD și LOQ la determinarea CH₃Hg⁺ și Hg total obținute la analiza probelor de pește prin UV-PVG-μCCP-OES, respectiv SnCl₂-CV-μCCP-OES sunt prezentate în Tabelul 4.2. Deoarece limitele de detecție sunt de 166, respectiv 250 de ori mai mici față de concentrația maximă admisă de Hg total în carnea de pește (0,5 mg kg⁻¹ conform Comisiei Europene 2006/1881/EC¹⁸), iar cele de determinare de 55, respectiv 83 de ori, noua metodă propusă pentru specierea Hg satisface cerințele Comisiei Europene din Decizia 2007/333/CE⁵² și poate fi utilizată cu succes în analiza de speciere a Hg din alimentația de origine marină.

Rezultatele evaluării acurateții metodei de speciere bazată pe μCCP-OES prin analiza de CRM-uri sunt prezentate în Tabelul 4.3. Deoarece gradele de regăsire pentru Hg total, CH₃Hg⁺ și Hg²⁺ s-au încadrat în intervalul 100 ± 10%, 100 ± 8% și 102 ± 13%, metoda propusă satisface cerința Comisiei Europene din Decizia 2002/657/CE⁵³, și ca urmare nu prezintă erori sistematice.

Tabelul 4.2. Limitele de detecție (LOD) și de determinare (LOQ) în carnea de pește obținute la determinarea CH₃Hg⁺ și Hg total prin UV-PVG-μCCP-OES și SnCl₂-CV-μCCP-OES⁵⁶

Metodă (Specie determinată)	Domeniul de etalonare (μg L ⁻¹) ^a	Coeficientul de corelație (r)	LOD (μg kg ⁻¹)	LOQ (μg kg ⁻¹)
UV-PVG-μCCP-OES (Hg ca CH ₃ Hg ⁺)	0-5	0,9999	2 ^b	6
SnCl ₂ -CV-μCCP-OES (Hg total)	0-5	0,9999	3 ^c	9

^a n=7 soluții standard de Hg²⁺ utilizate pentru etalonare;

^b LOD în solid calculată pentru 200 mg probă supusă extracției urmată de o diluție a probei de 10 ori;

^c LOD calculată pentru 200 mg probă supusă mineralizării și o diluție la 50 mL.

Tabelul 4.3. Rezultatele obținute la specierea Hg din materiale standard certificate prin metoda SnCl₂-CV-μCCP-OES și UV-PVG-μCCP-OES⁵⁶

CRM	Valoare certificată ± C.I. ^a (mg kg ⁻¹)			Valoarea găsită ± C.I. ^{a,b} (mg kg ⁻¹)			Gradul de regăsire ± C.I. ^{a,b} (%)		
	Hg total	CH ₃ Hg ⁺	Hg ²⁺	Hg total	CH ₃ Hg ⁺	Hg ²⁺	Hg total	CH ₃ Hg ⁺	Hg ²⁺
DOLT-4 ^e	2,58 ± 0,22	1.33 ± 0.12 ^c	1.25 ± 0.16	2.58 ± 0.08	1.34 ± 0.13	1.25 ± 0.13	100 ± 3	101 ± 10	100 ± 10
BCR-463 ^f	2.85 ± 0.16	3.04 ± 0.16 ^d	0.02 ± 0.002	2.84 ± 0.15	3.03 ± 0.22	0.02 ± 0.002	99 ± 5	100 ± 7	100 ± 10
ERM CE-464 ^f	5.24 ± 0.10	5.50 ± 0.17 ^d	0.12 ± 0.004	5.23 ± 0.25	5.49 ± 0.33	0.12 ± 0.009	100 ± 5	99 ± 6	100 ± 8
Tort-2 ^g	0.27 ± 0.06	0.152 ± 0.013 ^c	0.118 ± 0.028	0.28 ± 0.05	0.152 ± 0.014	0.128 ± 0.026	104 ± 18	100 ± 9	108 ± 20
Gradul de regăsire cumulat ± C.I.							101 ± 10	100 ± 8	102 ± 13

^a C.I. – interval de încredere pentru un nivel de încredere de 95%; ^b m=5 extracții/analize pentru fiecare probă; ^c Conținut exprimat ca Hg; ^d Conținut exprimat ca CH₃Hg⁺; ^e Ficat de rechin; ^f File de ton; ^g Hepatopancreas de homar.

4.5. Aplicarea metodei de speciere la analiza de probe reale de mușchi de pește

Rezultatele obținute în urma specierii Hg din mușchiul de pește, prezentate în Tabelul 4.4, indică faptul că Hg total în soiurile analizate sunt sub limita de 0,5 mg kg⁻¹ admisă de Comisia Europeană (Decizia 2006/1881/EC)¹⁸, și din acest punct de vedere nu există risc de expunere a populației. Astfel, concentrațiile de Hg total au variat între 0,094–0,308 mg kg⁻¹, 0,021–0,259 mg kg⁻¹ pentru CH₃Hg⁺, și 0,011–0,136 mg kg⁻¹ pentru Hg²⁺. Cele mai mari concentrații de Hg total și CH₃Hg⁺ au fost găsite în soiurile de pește de origine oceanică (cod atlantic, macrou atlantic), pe când cele mai mici în soiurile de acvacultură (păstrăv, crap, somon de Alaska și somon Atlantic). În ceea ce privește distribuția Hg pe specii, a fost observat că specia majoritară este CH₃Hg⁺, reprezentând o medie de 69,3% din Hg total în soiurile de pește analizate, iar din punct de vedere a distribuției speciilor de Hg în funcție de originea peștilor, a fost găsit faptul că specia CH₃Hg⁺ predomină în soiurile de pești de origine oceanică, pe când în cele de acvacultură specia Hg²⁺.

Tabelul 4.4. Rezultatele analizei de speciere a Hg în carnea de pește prin SnCl₂-CV-μCCP-OES și UV-PVG-μCCP-OES⁵⁶

Denumire pește	Origine ^b		Total grăsime (%)	Concentrație medie ± C.I. ^a / mg kg ⁻¹			Pondere/ %	
				Hg total	CH ₃ Hg ⁺	Hg ²⁺	CH ₃ Hg ⁺	Hg ²⁺
Macrou Atlantic 1	Sălbatic	FAO 27	6,12	0,293 ± 0,016	0,259 ± 0,014	0,034 ± 0,003	88	12
Macrou Atlantic 2	Sălbatic	FAO 27	4,94	0,152 ± 0,010	0,123 ± 0,006	0,029 ± 0,002	81	19
Merluciu Pacific 1	Sălbatic	FAO 67	1,25	0,231 ± 0,015	0,201 ± 0,016	0,030 ± 0,003	87	13
Merluciu Pacific 2	Sălbatic	FAO 67	0,72	0,197 ± 0,015	0,167 ± 0,017	0,030 ± 0,004	85	15
Merluciu Atlantic	Sălbatic	FAO 34	0,24	0,149 ± 0,017	0,117 ± 0,007	0,032 ± 0,004	79	21
Cod Atlantic	Sălbatic	FAO 34	1,78	0,308 ± 0,015	0,172 ± 0,017	0,136 ± 0,015	56	44
Cod Alaska	Sălbatic	FAO 61	1,62	0,177 ± 0,010	0,130 ± 0,008	0,047 ± 0,004	73	27
Somon Alaska	Sălbatic	FAO 67	2,82	0,165 ± 0,018	0,154 ± 0,025	0,011 ± 0,002	93	7
Somon Atlantic 1	Acvacultură	FAO 27 Norvegia	1,94	0,126 ± 0,013	0,108 ± 0,012	0,018 ± 0,003	86	14
Somon Atlantic 2	Acvacultură	FAO 27 Norvegia	1,85	0,116 ± 0,009	0,100 ± 0,008	0,016 ± 0,002	86	14
Crap	Acvacultură	România	14,06	0,110 ± 0,013	0,099 ± 0,005	0,011 ± 0,001	90	10
Pangasius 1	Acvacultură	Vietnam	2,81	0,119 ± 0,012	0,056 ± 0,008	0,063 ± 0,011	47	53
Pangasius 2	Acvacultură	Vietnam	3,14	0,127 ± 0,014	0,044 ± 0,003	0,083 ± 0,011	35	65
Păstrăv 1	Acvacultură	Turcia	10,13	0,103 ± 0,016	0,030 ± 0,005	0,073 ± 0,017	29	71
Păstrăv 2	Acvacultură	România	9,02	0,094 ± 0,016	0,021 ± 0,005	0,073 ± 0,021	22	78
Minimum			0,24	0,094	0,021	0,011	22	7
Maximum			14,06	0,308	0,259	0,136	93	78
Medie			4,16	0,164	0,119	0,046	69	31
Deviația standard			4,00	0,067	0,066	0,051	25	25

^a C.I. este intervalul de încredere pentru un nivel de încredere de 95%;

^b FAO – Organizația pentru Alimentație și Agricultură a Națiunilor Unite; FAO 27 – Oceanul Atlantic de Nord-Est; FAO 34 – Oceanul Atlantic de Centru-Est; FAO; 61 – Oceanul Pacific de Nord-Vest; FAO 67- Oceanul Pacific de Nord-Est

Conform datelor din Tabelul 4.4. nu a fost găsită nici o corelație între conținutul total de grăsime și concentrația de CH_3Hg^+ , respectiv ponderea acesteia.

Precizia metodei de speciere UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$ și $\text{SnCl}_2\text{-CV-}\mu\text{CCP-OES}$, evaluată pe baza valorilor RSD obținute în urma analizei repetate a probelor de mușchi de pește a fost între 2,4–14,0% pentru Hg total, CH_3Hg^+ și Hg^{2+} și a satisfăcut cerințele AOAC.⁵⁴ Valorile RSD mai mari în cazul Hg^{2+} se datorează faptului că acestea sunt valori cumulate, calculate pe baza preciziei determinării Hg total și CH_3Hg^+ .

4.6. Riscul de expunere a populației la Hg prin consumul de carne de pește

În urma evaluării riscului de expunere a populației la Hg prin consumul de carne de pește pe baza procedurii recomandate de EFSA, care ține cont de intrărilor relative săptămânale ale CH_3Hg^+ și Hg^{2+} comparativ cu valorile PTWI,¹⁴ a fost estimat faptul că nu există nici un risc de expunere a unui adult de 60 kg, și a unui copil de 15 kg la un consum săptămânal de o porție de 150 g, respectiv 20 g, deoarece ponderea relativă procentuală de intrare a CH_3Hg^+ , Hg^{2+} și Hg total este sub valoarea de 60%, cu riscul de expunere mai mare în cazul consumului de pește oceanic. A fost observat de asemenea, faptul că riscul de expunere la CH_3Hg^+ este mult mai mare, comparativ cu Hg^{2+} , ponderile relative de intrare a CH_3Hg^+ în cazul adulților fiind în intervalul 22–93%, față de 7–78% pentru Hg^{2+} , respectiv în intervalul 2–27% pentru CH_3Hg^+ și 0–5% pentru Hg^{2+} în cazul copiilor. Considerând ponderile relative procentuale de intrare a Hg cu carnea de pește, respectiv valorile PTWI ca fiind 100%, a rezultat că un adult poate consuma 2–3 porții pe săptămână a 150 g din soiurile de pești oceanici (macrou, merluciu, cod), 3–5 porții de somon și 7 porții de soiurile de pește de acvacultură (crap, pangasius, păstrăv). În cazul copiilor, a fost estimat că aceștia pot consuma între 3–10 porții pe săptămână.

Evaluarea riscului de expunere, pe baza coeficientului de hazard țintă (THQ), pentru un anumit contaminant și a THQ total (TTHQ),²⁰⁴ a indicat faptul că nu există nici un risc asupra sănătății umane pentru boli necancerigene, deoarece valorile au fost sub valoarea 1.

A fost estimată, de asemenea, concentrația de Hg total în sânge și păr, pe baza procedurii recomandate de EFSA,¹⁴ și comparată cu diferite valori limită, peste care se consideră că pot apărea diferite boli cancerigene. Rezultatele au evidențiat faptul că nu există risc de expunere la nici o afecțiune de boli coronariene (infarct miocardic, neurologice (demență, deteriorarea funcției cognitive, etc.) la consumul a 1–2 porții de carne de pește (o porție fiind de 150 g pe săptămână) de acvacultură (păstrăv, pangasius, crap sau somon), deoarece valorile estimate în sânge au fost între 1,37–1,85 $\mu\text{g L}^{-1}$, iar între 0,34–0,46 mg kg^{-1} în păr, fiind mai mici decât valorile de referință 2–3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg total în sânge și 0,5–0,7 mg kg^{-1} în păr¹⁴. În schimb, poate apărea risc de expunere la infarct miocardic în cazul consumului a mai mult de 3–4 porții a 150 g pe săptămână, în cazul unor pești de origine oceanică, precum macrou, cod și merluciu, deoarece în acest caz

concentrațiile estimate în sânge ar depăși valoarea limită de $12 \mu\text{g L}^{-1}$. Astfel, la un consum moderat de carne de pește se beneficiază de efectul pozitiv asupra sănătății datorită conținutului de acizi grași polinesaturați cu catenă lungă, precum Omega 3 (n-3 PUFA).²⁰

4.7. Concluzii

Rezultatele obținute în urma dezvoltării și caracterizării metodei de speciere bazată pe $\mu\text{CCP-OES}$, după derivatizarea chimică clasică, respectiv fotoindusă și detecție cu un microspectrometru a condus la următoarele concluzii:

1. Metoda a asigurat limite de detecție, precizie și acuratețe corespunzătoare, care au permis aplicarea acesteia la analize de carne din diferite soiuri de pește, chiar și în probe, în care specia organomercurică reprezintă mai mult de 98% din concentrația totală de Hg, iar concentrația de Hg^{2+} este sub $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$. Astfel, metoda poate fi considerată o alternativă robustă și de încredere la instrumentația mult mai scumpă și sofisticată, bazată pe ICP-OES, ICP-MS și tehnici cromatografice cuplate cu aceste detectoare spectrale;
2. A fost observat, faptul că peștii oceanici prezintă o concentrație mult mai mare de Hg și o pondere mult mai mare de CH_3Hg^+ comparativ cu peștii de acvacultură, în care specia majoritară a fost Hg^{2+} ;
3. A fost evidențiat faptul că pentru evaluarea corectă a riscului de expunere a populației la Hg prin consumul de carne de pește, trebuie realizată neapărat specierea acestuia, deoarece CH_3Hg^+ prezintă o toxicitate mult mai mare decât Hg^{2+} . Astfel, ar fi necesară revizuirea Deciziei Comisiei Europene 2006/1881/EC¹⁸, cu concentrațiile maxime admise de CH_3Hg^+ în alimentația de origine marină, ținând cont de faptul că această decizie normează doar conținutul de Hg total;
4. Deși specia de CH_3Hg^+ este responsabilă de bioacumularea Hg în carnea de pește, a fost demonstrat faptul că nu există nici un risc de expunere pentru adulți și copii la CH_3Hg^+ prin consumul ocazional moderat (2–3 porții) de carne de pește oceanic, comparativ cu soiurile de pește de acvacultură, care pot fi consumate aproape zilnic (3–7 porții);
5. Ținând cont de valorile diferite ale PTWI pentru CH_3Hg^+ și Hg^{2+} , respectiv toxicitățile diferite pentru aceste specii, este mult mai potrivită evaluarea riscului de expunere pe baza intrării celor două specii, a coeficienților THQ și TTHQ, comparativ cu concentrația totală a Hg;
6. De asemenea, este utilă evaluarea riscului de expunere la Hg prin consumul de carne de pește, prin estimarea concentrației Hg total în sânge și păr în conformitate cu procedura EFSA. Cu alte cuvinte, ar trebui efectuată o evaluare integrată a riscului de expunere la Hg, ținând cont de valorile PTWI pentru CH_3Hg^+ și Hg^{2+} , intrările acestora în corpul uman, THQ și TTHQ, respectiv concentrațiile estimate în sânge și păr.

5. Metodă eco-scală generală de determinare a Hg total din alimente și apă prin spectrometria de emisie optică în microplasma cuplată capacitiv și derivatizare fotoindusă cu radiație UV

5.1. Situația la nivel internațional. Ipoteze de lucru și obiective.

După cum a fost arătat în capitolele anterioare, alimentele în care Hg se află într-o concentrație ridicată sunt carnea de pește și produsele piscicole,¹⁶ fiind principala cale de intrare a Hg în corpul uman, în care mai mult de 85% din Hg total se află sub forma de CH_3Hg^+ . Datorită toxicității ridicate a Hg, determinarea conținutului total și specierea sub formă de CH_3Hg^+ și Hg^{2+} în alimente și probe de mediu, continuă să fie o provocare a comunității științifice.^{37,57-60}

Metodele tradiționale de determinare a Hg, se bazează pe derivatizarea la vapori reci cu SnCl_2 sau NaBH_4 , în urma descompunerii complete a matricii organice din probă cu reactivi puternic oxidanți (amestec de HNO_3 și H_2O_2), și detecția prin CV-ICP-OES, CV-ICP-MS, CV-AAS, CV-ETAAS și CV-AFS.⁶¹⁻⁶⁹ Metodele verzi de preparare a probelor și de derivatizare sunt cele care utilizează acizi organici cu masa moleculară mică (LMWOA) (acidul formic, acidul acetic, etc.), și forme de energie prietenoase cu mediul (ultrasunetele și radiațiile UV), cuplate cu detecție prin metode spectrale tradiționale.^{34,35,70-76} Sturgeon și colab.⁷⁷ au demonstrat pentru prima dată, faptul că probele de origine marină pot fi solubilizate în HCOOH concentrat sub acțiunea ultrasunetelor și au arătat faptul că generarea vaporilor reci de Hg în mediu de 2,5% (v/v) HCOOH se poate realiza prin derivatizare fotoindusă cu o radiație UV (lampă de 15 W). Această metodă a fost implementată doar pe alimente de origine marină, fără să se facă referire la alte alimente de origine vegetală sau animală, sau probe de mediu. Astfel, cuplarea solubilizării probei în LMWOA, de regulă în HCOOH , cu derivatizarea fotoindusă în mediu de HCOOH , ar putea fi o abordare eco-scală foarte avansată de determinare și speciere a Hg. Pornind de la acest considerent, obiectivul acestui studiu a fost dezvoltarea și caracterizarea unei metode integrate eco-scală, cu grad ridicat de verde, pentru determinarea Hg total în alimente de origine marină, vegetală, apă și probe solide de mediu, și detecție prin $\mu\text{CCP-OES}$ cu consum redus de reactivi și cost scăzut de operare, în care să fie utilizat numai HCOOH pentru extracția probelor și derivatizarea UV fotoindusă la vapori reci cu/fără preconcentrarea *on-line* a vaporilor de Hg.

5.2. Prepararea probelor pentru determinarea Hg total

Procedura de extracție a probelor în mediu de HCOOH concentrat pentru determinarea Hg total prin UV-PVG- $\mu\text{CCP-OES}$. Procedura de extracție a fost similară cu cea folosită anterior de către Scriver și colab.^{77,78} Cantități de 200 mg CRM/probă test liofilizată, au fost supuse extracției folosind 10 mL HCOOH 98–100% (m/m) în baia de ultrasunete SONOREX SUPER RK 102H

(Bandelin Sonorex, Berlin, Germania) la un timp optim de 3 h la 50 °C. Supernatantul a fost separat prin centrifugare la 4500 rpm timp de 15 minute, după care volume alicote de 0,2–1 mL au fost diluate la 25 mL în mediu de HCOOH 0,6 mol L⁻¹ ca agent de derivatizare. Hg total din extractele de probe CRM și probe test de mușchi de pește și ciuperci au fost determinate prin UV-PVG-μCCP-OES fără preconcentrare, iar cele de alimente de origine animală și vegetală, cu concentrații foarte mici de Hg, prin UV-PVG-μCCP-OES cu preconcentrare.

Procedura de mineralizare a probelor solide pentru determinarea Hg total prin SnCl₂-CV-μCCP-OES, SnCl₂-CV-AFS și SnCl₂-CV-ICP-OES s-a realizat conform procedurii descrise în Capitolul 4, Paragraful 4.2.3, urmată de o diluție suplimentară de 10 ori.

Procedura de preparare a probelor de apă pentru determinarea Hg total prin UV-PVG-μCCP-OES cu preconcentrare a implicat o simplă diluție a unui volum alicot de până la 20 mL la balon cotelat de 25 mL, și adăugarea unui volum corespunzător de HCOOH 98-100% (m/m), astfel încât concentrația acestuia să devină 0,6 mol L⁻¹.

5.3. Instrumentația SnCl₂-CV-μCCP-OES și UV-PVG-μCCP-OES

Schema instrumentului UV-PVG-μCCP-OES cu sau fără preconcentrare, folosit la determinarea Hg total este prezentată în Figura 5.1 (a), iar a microcolectorului cu filament de aur utilizat la preconcentrarea *on-line* a vaporilor de Hg în Figura 5.1 (b).

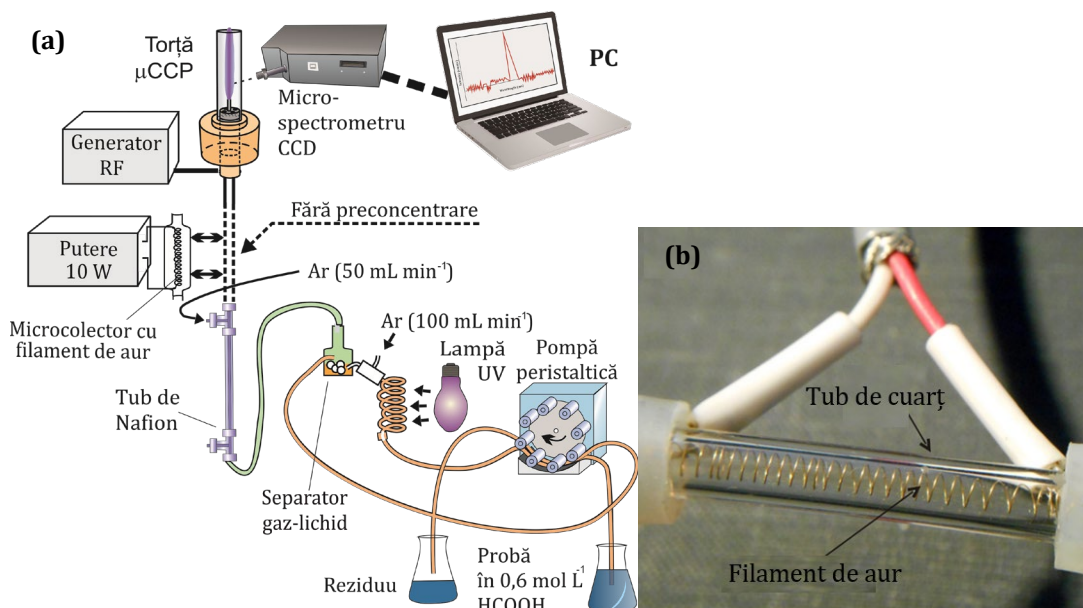


Figura 5.1. Reprezentarea schematică a montajului experimental UV-PVG-μCCP-OES (a)⁷⁹ și a microcolectorului cu filament de aur (b)⁸⁰

Elementele componente ale montajului UV-PVG-μCCP-OES sunt similare cu cele prezentate în capitolele anterioare, cu excepția microspectrometrului și microcolectorului cu filament de aur. În acest studiu, detecția semnalului de emisie a Hg s-a realizat cu microspectrometrul Ocean Optics Maya2000 Pro de joasă rezoluție (Dunedin, SUA). Microcolectorul pentru preconcentrarea

vaporilor de Hg a constat dintr-un filament de aur (puritate 99,99%, Goodfellow, Cambridge, Anglia), cu lungimea de 24 cm și 43 spire, montat într-o capilară de cuarț.⁸¹ Operarea sistemului UV-PVG- μ CCP-OES cu preconcentrare a fost în două etape: (1) captarea vaporilor de Hg generați prin derivatizare UV fotoindusă dintr-un volum de 25 mL probă, pe filamentul de aur, și (2) desorbția termică bruscă a vaporilor de Hg prin încălzirea filamentului, în urma aplicării unui potențial/curent de 5 V/1,8 A de la o sursă HM 7042-5 (Hameg Instruments, Mainhausen, Germania). Un număr de 20 de spectre episod la un timp de integrare de 1 s/episod au fost înregistrate simultan cu etapa de încălzire a filamentului. Semnalul total de emisie al Hg a fost obținut prin însumarea semnalelor nete episod, după corecția liniară de fond în două puncte, de o parte și alta a picului. Condițiile optime de lucru la determinarea Hg total prin UV-PVG- μ CCP-OES cu/fără preconcentrare și a metodelor de referință SnCl₂-CV- μ CCP-OES, SnCl₂-CV-AFS și SnCl₂-CV-ICP-OES sunt prezentate în Tabelul 5.1.⁷⁹

Pentru determinarea Hg total prin SnCl₂-CV-ICP-OES, s-a utilizat spectrometrul ICP-OES Spectro CIROS^{CCD} (Spectro, Kleve, Germania), interfațat cu generatorul de hidruură HGX-200 (Teledyne Cetac Technologies, Nebraska, SUA). Determinările de Hg total prin SnCl₂-CV-AFS au fost efectuate, utilizând analizorul de mercur Hydra-AF (Teledyne Leeman Instruments, SUA).

5.4. Caracterizarea și validarea metodei UV-PVG- μ CCP-OES cu/fără preconcentrare prin analiza de materiale de referință certificate și evaluarea performanțelor analitice

Parametri curbelor de etalonare, LOD și LOQ obținute pentru Hg total prin metoda UV-PVG- μ CCP-OES cu/fără preconcentrare, în comparație cu metodele de referință SnCl₂-CV- μ CCP-OES, SnCl₂-CV-ICP-OES și SnCl₂-CV-AFS, fără preconcentrare, sunt prezentate în Tabelul 5.3. Deoarece LOD a metodei UV-PVG- μ CCP-OES cu/fără preconcentrare de 9/0,25 μ g kg⁻¹ este de 2000/56 de ori, și cea de determinare de 667/14 ori mai mici, decât valoarea maximă admisă în carnea de pește¹⁸, metoda satisface cerințele din Decizia 2007/333/EC⁵².

În ceea ce privește acuratețea metodei UV-PVG- μ CCP-OES fără preconcentrare, evaluată pe baza analizei a 7 probe de CRM, aceasta satisface cerința din Decizia 2002/657/CE⁵³, deoarece R (%) general este de 101 \pm 7% (Tabelul 5.3), Acuratețea metodei UV-PVG- μ CCP-OES cu preconcentrare a fost verificată cu probe de apă fortificate, asigurând R (%) în intervalul 97 \pm 12% (Tabelul 5.4). Aceste valori sunt similare cu cele obținute în metodele de referință. Acuratețea bună a acestei metode demonstrează lipsa interferențelor non-spectrale a elementelor din matricea multiminerală și a materiei organice.

Studiul interferențelor non-spectrale, cauzate de ionii ale metalelor alcaline (Na, K), alcalino-pământoase (Ca, Mg), metalelor tranzitionale (Al, Cr, Cu, Fe, Zn), respectiv de anionii NO₃⁻, SO₄²⁻ și PO₄³⁻, a evidențiat faptul că acestea nu cauzează interferențe non-spectrale, dacă se

Tabelul 5.1. Condițiile optime de lucru la determinarea Hg total prin metodele UV-PVG- μ CCP-OES, SnCl₂-CV- μ CCP-OES, SnCl₂-CV-ICP-OES și SnCl₂-CV-AFS⁷⁹

	UV-PVG-μCCP-OES fără preconcentrare	UV-PVG-μCCP-OES cu preconcentrare	SnCl₂-CV-μCCP-OES	SnCl₂-CV-ICP-OES	SnCl₂-CV-AFS
Etapă de derivatizare					
Agentul de derivatizare	0,6 mol L ⁻¹ HCOOH	0,6 mol L ⁻¹ HCOOH	20% (m/v) SnCl ₂ în 15% (v/v) HCl	20% (m/v) SnCl ₂ în 15% (v/v) HCl	2% (m/v) SnCl ₂ în 10% (v/v) HCl
Blanc	0,6 mol L ⁻¹ HCOOH	0,6 mol L ⁻¹ HCOOH	5% (v/v) HCl	5% (v/v) HCl	5% (v/v) HCl
Debitul probei (mL min ⁻¹)	10	10	3,5	5	5
Debitul agentului de derivatizare (mL min ⁻¹)	-	-	1	2	1
Timpul de iradiere UV a probei (s)	5	5	-	-	-
Volumul probei folosit la preconcentrare (mL)	-	25	-	-	-
Operarea plamei și a celulei de fluorescență pentru detecție					
R.f. (MHz)/Putere (W)	13,56/15	13,56/15	13,56/15	27,12/1400	-
Debit Ar (L min ⁻¹)	0,10	0,10	0,15	Ar exterior: 12; Ar de purjare a vaporilor reci: 0,7; Ar auxiliar: 0,6	0,7
Potențialul (V)/curentul (A) aplicat - pentru încălzirea filamentului de Au în etapa de desorbție	-	5/1,8	-	-	-
Timpul de încălzire a filamentului de Au pentru desorbția Hg (s)	-	20	-	-	-
Înălțimea de observare a plamei (mm)	1,6	1,6	1,6	Vizare axială (mm), poziția torței ICP X=-3,9; Y=+3,6; Z=+2,6.	-
Lungimea de undă (nm)	253,652	253,652	253,652	191,770	253,652
Măsurarea semnalului	Înălțime pic	Înălțime pic	Înălțime pic	Înălțime pic	Semnal stabil treaptă
Timpul de integrare (s)	1	1 (20 de spectre episod)	1	48	15
Domeniul de etalonare (μ g L ⁻¹)	0-1	0-0,1	0-1	0-10	0-1
Tipul corecției de fond	Liniară în două puncte	Liniară în două puncte	Liniară în două puncte	Liniară în două puncte	-

Tabelul 5.2. Parametri curbelor de etalonare, limitele de detecție și de determinare a Hg total obținute prin metoda UV-PVG- μ CCP-OES cu și fără preconcentrare, în comparație cu metodele de referință SnCl₂-CV- μ CCP-OES, SnCl₂-CV-ICP-OES și SnCl₂-CV-AFS, fără preconcentrare⁷⁹.

Parametru	Metodă				
	UV-PVG- μ CCP-OES fără preconcentrare	UV-PVG- μ CCP-OES cu preconcentrare	SnCl ₂ -CV- μ CCP-OES fără preconcentrare	SnCl ₂ -CV-AFS	SnCl ₂ -CV-ICP-OES
Domeniul de etalonare ($\mu\text{g L}^{-1}$) (n=6)	0-1	0-0,1	0-1	0-1	0-10
Panta (semnal u.a. mL ng ⁻¹)	5905 \pm 9	753000 \pm 114	5899 \pm 11	24737 \pm 57	495 \pm 1
Intercepția	-1 \pm 6	0 \pm 411	0 \pm 8	0 \pm 105	0 \pm 2
Raport semnal-zgomot (SNR) ^a	740	7500	590	495	495
Coeficientul de corelație (r)	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9994
$s_{y/x}$ (semnal u.a.)	7	25	7	129	3
LOD (ng L ⁻¹)	3,5	0,1 ^b	3,5	5	19
LOQ (ng L ⁻¹) ^e	10,5	0,3	10,5	15	57
LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	9 ^c	0,25 ^c	9 ^d	12,5 ^d	49 ^d
LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^e	27	0,75	27	38	147

^a Valoare corespunzătoare concentrației de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg²⁺ (raport pantă dreaptă de etalonare – deviație standard pantă); ^b LOD în urma preconcentrării Hg dintr-un volum de 25 mL probă în mediu de 0,6 mol L⁻¹ HCOOH; ^c LOD în solid, calculată pentru 200 mg probă supusă extracției în 10 mL HCOOH 98-100% (m/m), urmată de o diluție de 50 de ori, astfel încât concentrația acidului formic în probă să fie de 0,6 mol L⁻¹; ^d LOD în solid calculată pentru 200 mg probă în 50 mL soluție, urmată de o diluție de 10 ori; ^e Limite de detecție calculate pentru 200 mg probă în 50 mL soluție fără diluție suplimentară.

Tabelul 5.3. Rezultatele obținute la determinarea Hg total din materiale standard certificate prin metoda UV-PVG- μ CCP-OES cu extracție în HCOOH și metodele de referință SnCl₂-CV- μ CCP-OES, SnCl₂-CV-ICP-OES și SnCl₂-CV-AFS cu mineralizare în HNO₃-H₂O₂ fără preconcentrare⁷⁹

CRM	Valoarea certificată \pm U ^a (mg kg ⁻¹)	Gradul de regăsire \pm C.I. (%)			
		UV-PVG- μ CCP-OES	SnCl ₂ -CV- μ CCP-OES	SnCl ₂ -CV-ICP-OES	SnCl ₂ -CV-AFS
Tort-2 hepatopaneas de homar	0,27 \pm 0,06	93 \pm 8	93 \pm 8	104 \pm 7	104 \pm 7
BCR-463 file de ton	2,85 \pm 0,16	100 \pm 6	101 \pm 9	109 \pm 9	108 \pm 9
ERM CE-464 file de ton	5,24 \pm 0,10	100 \pm 6	95 \pm 6	97 \pm 4	101 \pm 5
ERM BB422 mușchi de pește	0,601 \pm 0,030	100 \pm 2	101 \pm 9	101 \pm 2	98 \pm 5
SRM 2976 țesut de midie	0,0610 \pm 0,0036	103 \pm 7	102 \pm 8	95 \pm 10	105 \pm 5
CS-M-3 praf de ciuperci <i>Boletus edulis</i>	2,849 \pm 0,104	101 \pm 10	98 \pm 3	101 \pm 2	98 \pm 3
ERM CA713 apă reziduală ^b	1,84 \pm 0,11	100 \pm 10	101 \pm 7	98 \pm 8	102 \pm 7
Grad general de regăsire \pm C.I.		101 \pm 7	100 \pm 7	100 \pm 7	102 \pm 6

^a U este incertitudinea extinsă;

^b În cazul probei CRM de apă, concentrațiile sunt exprimate în $\mu\text{g L}^{-1}$.

aplică o diluție a probei de cel puțin 50 de ori. În schimb, anionul Cl⁻ poate determina interferențe non-spectrale depresive la determinarea Hg prin metoda UV-PVG-μCCP-OES, dacă proba originală conține o concentrație ridicată de Cl⁻, cum ar fi de exemplu probele de apă.

Tabelul 5.4. Rezultatele obținute pentru determinarea Hg total prin metoda UV-PVG-μCCP-OES cu preconcentrare în probe de apă fortificate cu concentrații cunoscute de Hg⁷⁹

Proba	Hg total în proba originală (ng L ⁻¹)	Hg ²⁺ adăugat în probă (ng L ⁻¹)	Hg total în probe după adaos (ng L ⁻¹)	Gradul de regăsire (%)
Apă de robinet	< LOD	16	16,2	101
Apă de fântână	< LOD	80	75,7	95
Apă de fântână	7,3	80	87,8	100
Apă îmbuteliată plată	6,1	16	19,2	82
Apă îmbuteliată plată	15,4	10	26,2	108
Gradul mediu de regăsire ± C.I. ^a				97 ± 12

^a C.I. reprezintă intervalul de încredere pentru m=5 extracții și analize complete la un nivel de încredere de 95%.

5.5. Aplicabilitatea metodei UV-PVG-μCCP-OES la determinarea Hg total din apă și alimente extrase în HCOOH

Aplicabilitatea metodei UV-PVG-μCCP-OES cu/fără preconcentrare la determinarea Hg total a fost verificată prin analiza unor probe reale de mușchi de pește, ciuperci, alimente de origine animală și vegetală, respectiv probe de apă. Rezultatele obținute în mușchiul de pește și ciuperci, sunt prezentate în Tabelul 5.5, comparativ cu metodele de referință SnCl₂-CV-ICP-OES și SnCl₂-CV-AFS, ambele fără preconcentrare, și în Tabelul 5.6 în probele de alimente de origine, vegetală, animală și de apă, cu preconcentrare.

În ceea ce privește precizia, metoda UV-PVG-μCCP-OES cu/fără preconcentrare, satisface atât cerința AOAC (RSD de 3–15%), cât și cea a Comisiei Europene, deoarece valorile RSD s-au încadrat între 1,2–12,8%, iar valorile indicelui HorRat au fost sub valoarea limită 2.

Comparația statistică obținută pe baza testului Bland și Altman pe rezultatele obținute în probele test, analizate prin metoda UV-PVG-μCCP-OES și metodele de referință (SnCl₂-CV-μCCP-OES, SnCl₂-CV-ICP-OES și SnCl₂-CV-AFS), sunt prezentate în Tabelul 5.7. S-a dovedit faptul că metoda UV-PVG-μCCP-OES asigură rezultate care nu diferă semnificativ, față de cele obținute cu metodele de referință, deoarece intervalul de încredere a abaterii medii conține valoarea zero. Rezultatele medii obținute pentru cele două metode se încadrează între limitele superioare și inferioare de încredere, respectiv intervalul de încredere al acestor limite este suficient de îngust în comparație cu nivelul concentrațiilor de Hg total, determinate în probele de mușchi de pește și ciuperci.

Tabelul 5.5. Concentrația (mg kg⁻¹) de Hg total în carnea de pește și ciuperci determinată prin metodele UV-PVG-μCCP-OES, SnCl₂-CV-μCCP-OES, SnCl₂-CV-ICP-OES și SnCl₂-CV-AFS fără preconcentrare⁷⁹

Proba	UV-PVG-μCCP-OES ^a			SnCl ₂ -CV-μCCP-OES ^a			SnCl ₂ -CV-ICP-OES ^a			SnCl ₂ -CV-AFS ^a		
	Medie ± C.I.	RSD ^b (%)	Indicele HorRat ^c	Medie ± C.I.	RSD ^b (%)	Indicele HorRat ^c	Medie ± C.I.	RSD ^b (%)	Indicele HorRat ^c	Medie ± C.I.	RSD ^b (%)	Indicele HorRat ^c
Ton	0,212 ± 0,017	6,4	0,34	0,191 ± 0,013	5,5	0,29	0,226 ± 0,008	2,8	0,15	0,211 ± 0,008	3,0	0,16
Păstrăv	0,110 ± 0,004	2,9	0,15	0,095 ± 0,010	8,5	0,45	0,094 ± 0,006	5,1	0,27	0,096 ± 0,006	5,0	0,26
Somon	0,108 ± 0,007	5,2	0,27	0,111 ± 0,005	3,6	0,19	0,109 ± 0,014	10,3	0,54	0,099 ± 0,007	5,7	0,30
Merluciu	0,216 ± 0,007	2,6	0,14	0,216 ± 0,080	3,0	0,16	0,219 ± 0,008	2,9	0,15	0,218 ± 0,009	3,3	0,17
Crap	0,089 ± 0,006	5,4	0,28	0,086 ± 0,004	3,7	0,20	0,100 ± 0,003	2,4	0,13	0,086 ± 0,004	3,7	0,20
Macrou	0,198 ± 0,025	10,2	0,53	0,211 ± 0,014	5,3	0,28	0,197 ± 0,009	3,7	0,19	0,206 ± 0,009	3,5	0,18
Cod	0,372 ± 0,014	3,0	0,16	0,368 ± 0,006	1,3	0,07	0,359 ± 0,007	1,6	0,08	0,387 ± 0,013	2,7	0,14
Cod	0,305 ± 0,048	12,7	0,67	0,317 ± 0,033	8,4	0,44	0,306 ± 0,031	8,2	0,43	0,309 ± 0,017	4,4	0,23
Ciuperci	0,268 ± 0,038	11,4	0,60	0,258 ± 0,021	6,6	0,34	0,254 ± 0,028	8,9	0,47	0,286 ± 0,018	5,1	0,27
Ciuperci	4,48 ± 0,25	4,5	0,24	4,26 ± 0,33	6,2	0,33	4,51 ± 0,40	7,1	0,38	4,33 ± 0,21	3,9	0,20
Minim	0,089	2,6	0,14	0,086	1,3	0,07	0,094	1,6	0,08	0,086	2,7	0,14
Maxim	4,48	12,7	0,67	4,26	8,5	0,45	4,51	10,3	0,54	4,33	5,7	0,30
Mediana	0,214	5,3	0,28	0,214	5,4	0,28	0,222	4,4	0,23	0,214	3,8	0,20

^a Rezultate pentru m=5 extracții și analize complete la un nivel de încredere de 95%;

^b RSD este deviația relativă standard procentuală;

^c Indicele HorRat calculat pentru o valoare PRSD de 19%.

Tabelul 5.6. Rezultatele obținute la determinarea Hg total în alimente de origine vegetală, animală, suplimente alimentare și probe de apă prin metoda UV-PVG- μ CCP-OES fără/cu preconcentrare⁷⁹

UV-PVG- μ CCP-OES fără preconcentrare				UV-PVG- μ CCP-OES cu preconcentrare			
Proba	Concentrație medie \pm CI ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD ^b (%)	Indicele HorRat ^c	Proba	Concentrație medie \pm CI ^a (ng L^{-1})	RSD ^b (%)	Indicele HorRat ^c
Măr	5,2 \pm 0,4	6,2	0,33	Apă de râu	10,0 \pm 0,8	6,4	0,34
Varză	11,6 \pm 0,8	5,6	0,29	Apă de râu	11,6 \pm 0,8	5,6	0,29
Cartofi	64,2 \pm 3,8	4,8	0,25	Apă de robinet	9,2 \pm 0,9	7,9	0,41
Morcov	54,0 \pm 5,9	8,8	0,46	Apă de robinet	5,7 \pm 0,9	12,4	0,65
Ceapă	89,4 \pm 10,0	9,0	0,47	Apă de fântână	68,7 \pm 2,6	3,0	0,16
Țelină- rădăcină	36,7 \pm 3,3	7,2	0,38	Apă de fântână	75,7 \pm 4,3	4,6	0,24
Pătrunjel - rădăcină	122 \pm 7	4,6	0,24	Apă de fântână	40,2 \pm 2,2	4,4	0,23
Orez	37,8 \pm 2,8	6,0	0,31	Apă îmbuteliată plată	13,8 \pm 1,2	7,0	0,37
Tărâțe de grâu	3,3 \pm 0,4	9,8	0,51	Apă îmbuteliată plată	1,2 \pm 0,2	12,4	0,65
Pâine neagră	1,0 \pm 0,1	8,0	0,42	Apă îmbuteliată plată	3,1 \pm 0,4	10,4	0,55
Porumb	52,1 \pm 3,6	5,6	0,29	Apă îmbuteliată plată	8,4 \pm 0,7	6,7	0,35
Carne de porc	46,4 \pm 3,6	6,2	0,33	Apă îmbuteliată plată	68,9 \pm 3,9	4,6	0,24
Carne de pui	59,8 \pm 5,7	7,7	0,40	Apă îmbuteliată carbogazoasă	24,6 \pm 2,7	8,8	0,46
Ficat de pui	123 \pm 9	5,9	0,31	Apă îmbuteliată carbogazoasă	26,1 \pm 2,3	7,1	0,37
Suplimente nutritive pentru sportivi	65,6 \pm 5,2	6,4	0,34	Apă îmbuteliată carbogazoasă	33,1 \pm 2,5	6,1	0,32
Supliment multimineral (tablete)	1,1 \pm 0,2	12,8	0,67	Apă îmbuteliată carbogazoasă	61,8 \pm 4,5	5,9	0,31
Minim	1,0	4,6	0,24		1,2	3,0	0,16
Maxim	123	12,8	0,67		75,7	12,4	0,65
Mediana	49,25	6,3	0,33		19,2	6,6	0,35

^a Rezultate pentru m=5 analize complete pentru un interval de încredere de 95%;

^b RSD este deviația relativă standard procentuală;

^c Indicele HorRat calculat pentru un PRSD de 19%.

Tabelul 5.7. Evaluarea statistică în urma aplicării testului Bland și Altman la compararea rezultatelor privind determinarea Hg total (mg kg^{-1} , $m=5$ măsurări pentru fiecare probă) și un eșantion de $n=8$ probe de mușchi de pește prin metoda UV-PVG- μ CCP-OES și cele de referință (SnCl₂-CV- μ CCP-OES, SnCl₂-CV-ICP-OES și SnCl₂-CV-AFS)

Metoda X	Metoda Y	s_x^a	s_y^a	$s_{B_{X-Y}}^b$	Bias ^c	Limitele de încredere ^d
UV-PVG- μ CCP-OES	SnCl ₂ -CV- μ CCP-OES	0,017	0,026	0,031	$0,002 \pm 0,015$	$0,063 \pm 0,015$ $-0,059 \pm 0,015$
UV-PVG- μ CCP-OES	SnCl ₂ -CV-ICP-OES	0,017	0,011	0,022	$0,000 \pm 0,013$	$0,042 \pm 0,011$ $-0,042 \pm 0,011$
UV-PVG- μ CCP-OES	SnCl ₂ -CV-AFS	0,017	0,008	0,020	$0,000 \pm 0,011$	$0,039 \pm 0,011$ $-0,039 \pm 0,011$

^a Deviația standard a mediei rezultatelor obținute în cadrul metodelor comparate; ^b Deviația standard a abaterii mediei între metodele comparate; ^c Bias-ul calculat ca $\bar{\Delta} \pm t \frac{s_{B_{X-Y}}}{\sqrt{n}}$ pentru un nivel de încredere de 95%; ^d Limitele de încredere au fost calculate ca $\bar{\Delta} \pm 1,96 \cdot s_{B_{X-Y}} \pm t \cdot s_{LL,UL}$ pentru un nivel de încredere de 95%.

5.6. Concluzii

În urma efectuării studiului privind determinarea Hg total prin metoda UV-PVG- μ CCP-OES, bazată pe extracția în HCOOH și determinarea prin derivatizare fotoindusă, cu sau fără preconcentrare *on-line* a vaporilor de Hg, au rezultat următoarele concluzii:

1. Metoda UV-PVG- μ CCP-OES cu derivatizare fotoindusă în mediu de HCOOH $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ a fost aplicată cu succes la determinarea Hg total, atât din alimente de origine marină (mușchi de pește), cât și din probe de alimente de origine animală, vegetală și suplimente alimentare, probe de apă de suprafață, apă potabilă de fântână și apă plată și carbogazoasă îmbuteliată. În cazul probelor de mușchi de pește și ciuperci a fost posibilă determinarea fără preconcentrare, pe când în cazul alimentelor de origine marină, animală, vegetală, suplimente alimentare și de apă, a fost necesară preconcentrarea *on-line* rapidă a vaporilor de Hg pe filamentul de aur în vederea atingerii performanțelor analitice la nivele de concentrații de ordinul $\mu\text{g kg}^{-1}$ și ng L^{-1} ;
2. Comparativ cu datele de literatură, procedura de extracție a Hg în HCOOH concentrat asistată de ultrasunete a fost extinsă de la alimentele de origine marină și la alimentele de origine animală, vegetală, suplimente alimentare, pentru care nu sunt semnalate aplicații în literatura de specialitate;
3. Metoda UV-PVG- μ CCP-OES s-a dovedit a fi una eco-scală generală, prin utilizarea numai a HCOOH biodegradabil, atât pentru extracție, cât și pentru derivatizare la vapori reci, foarte sensibilă, corectă și precisă. Astfel, procedura de extracție este una blândă, mult mai avantajoasă față de mineralizarea clasică, asistată de microunde, care utilizează HCl, HNO₃

și H_2O_2 , respectiv reactivi de derivatizare ($SnCl_2$, $NaBH_4$), care sunt mult mai scumpi, toxici și instabili;

4. Metoda UV-PVG- μ CCP-OES pentru determinarea Hg total, în care este utilizat numai HCOOH pentru extracție și derivatizare, s-a dovedit a fi o alternativă analitică viabilă cu grad ridicat de verde pe ierarhizarea eco-scală, la metodele bazate pe derivatizare clasică cu soluție de $SnCl_2$, și detecție prin emisie optică în microtorța de plasmă cuplată capacitiv ($SnCl_2$ -CV- μ CCP-OES), plasma cuplată inductiv ($SnCl_2$ -CV-ICP-OES) și spectrometria de fluorescență atomică ($SnCl_2$ -CV-AFS), fiind caracterizată de limite de detecție mai bune, acuratețe și precizie similare cu metodele de referință;
5. Metoda UV-PVG- μ CCP-OES pe lângă faptul că prezintă performanțe analitice deosebite, este una caracterizată printr-un preț de cost mult mai scăzut, ca urmare a eliminării reactivilor scumpi, și a utilizării unei microplazme de mică putere, cu consum redus de Ar, comparativ cu instrumentația de laborator, bazată pe ICP-OES;
6. Efectele non-spectrale datorate elementelor alcaline, alcalino-pământoase, metalelor tranziționale, anionilor și materiei organice, au putut fi depășite în metoda UV-PVG- μ CCP-OES la determinarea Hg total în alimente, prin aplicarea unei simple diluții a probelor. Astfel, metoda este una selectivă;
7. Trebuie evitată utilizarea HCl pentru conservarea probelor de apă, ca urmare a interferenței depresive non-spectrale cauzate de anionul Cl^- asupra procesului de derivatizare fotoindusă la vapori reci în mediu de HCOOH $0,6 \text{ mol L}^{-1}$;
8. Unul dintre punctele slabe ale extracției în HCOOH, care a fost semnalat și de către alți autori este timpul lung de extracție, chiar în cazul asistării de microunde, dar acest dezavantaj ar putea fi eliminat prin creșterea numărului de probe supuse extracției în același timp;
9. Un alt punct slab al metodei UV-PVG- μ CCP-OES, care nu se datorează de fapt calității instrumentației utilizate pentru extracție și derivatizării fotoinduse în mediu de HCOOH, este determinat de prezența Hg ca impuritate în HCOOH comercializat, la o concentrație mai mare, comparativ cu $SnCl_2$ și $NaBH_4$, care sunt reactivi sintetizați special pentru determinarea Hg. Acest impediment a fost depășit totuși, printr-o purificare suplimentară, prin ultrasonare și barbotare cu Ar a soluției concentrate de HCOOH;
10. Prezentul studiu a evidențiat printre altele, faptul că este necesară comercializarea acidului formic într-o calitate superioară, special sintetizat pentru determinarea Hg prin metode verzi de derivatizare fotoindusă. În acest mod, procedurile de determinare a Hg, bazate pe derivatizare fotoindusă și detecție spectrală, pot deveni mult mai sensibile.

6. Metodă eco-scală generală de speciere a Hg sub formă de Hg²⁺ și CH₃Hg⁺ în alimentația de origine marină prin generare fotoindusă UV/Vis a vaporilor reci și detecția prin spectrometria de emisie optică în microtorța de plasmă cuplată capacitiv

6.1. Situația la nivel internațional. Ipoteze de lucru și obiective.

Datorită toxicității ridicate a Hg, specierea în alimente de origine marină continuă să fie o provocare pentru comunitatea științifică, și în consecință au fost dezvoltate diverse metode necromatografice și cromatografice cuplate cu metode spectrale de detecție.^{65,82-87} Metodele de speciere necromatografice au la bază, fie separarea speciilor prin extracție selectivă, fie derivatizarea selectivă a speciilor de Hg și detecția spectrală prin AAS, ETAAS sau ICP-OES,⁶²⁻⁶⁴ în ambele cazuri fiind necesară o instrumentație sofisticată și scumpă, reactivi scumpi de înaltă puritate. În acord cu principiile GAC,² au fost dezvoltate metode eco-scală de determinare a Hg²⁺ din probe de apă prin derivatizare fotoindusă sub acțiunea radiațiilor Vis asistată de matricea probei,^{88,89} respectiv metode de speciere a Hg bazată pe derivatizare fotoindusă selectivă cu radiații UV pentru determinarea Hg total (suma CH₃Hg⁺ și Hg²⁺), respectiv radiații Vis pentru determinarea Hg²⁺ în mediu de 20% HCOOH.⁷³ Studiul diverselor medii LMWOC ca reactiv de derivatizare prin fotoreducere a Hg la vapori reci s-a dovedit a fi cel mai eficient HCOOH.^{42,90,91}

Extracția probelor biologice în acid formic concentrat, asistată de ultrasunete a fost evaluată pentru determinări multielementale prin ETAAS, LA-ICP-MS, ICP-OES, determinarea Hg total prin CV-AAS prin derivatizare cu KBH₄, după o oxidare suplimentară a probei, respectiv determinarea Hg total prin UV-PVG-AAS cu derivatizare fotoindusă în mediu de HCOOH.^{74,77,78,92} Nu au fost investigate însă metodele de extracție a probelor în HCOOH cuplate cu derivatizarea fotoindusă în același mediu, în prezența radiațiilor UV/Vis, cuplate cu tehnologia microplasmelor. Astfel, scopul acestui studiu a fost dezvoltarea unei metode simple de speciere a mercurului sub formă de CH₃Hg⁺ și Hg²⁺ în alimente de origine marină, folosind instrumentația miniaturizată UV/Vis-PVG-μCCP-OES, în care doar HCOOH este utilizat ca agent de extracție a speciilor de Hg din probe solide și ca mediu de derivatizare selectivă fotoindusă la vapori reci de Hg. Noutatea față de metodele de speciere raportate în literatură, constă în caracterul general eco-scală a metodei UV/Vis-PVG-μCCP-OES, determinat de utilizarea unei instrumentații complet miniaturizate bazată pe o microtorță de plasmă cu consum redus de Ar și putere mică, interfațată cu un microspectrometru de joasă rezoluție, procedura de extracție a probei și de derivatizare prin utilizarea unui singur reactiv (HCOOH).

6.2. Prepararea probelor pentru specierea Hg sub formă de CH_3Hg^+ și Hg^{2+}

Principiul de preparare a probelor și de speciere a Hg prin metoda eco-scală UV/Vis-PVG- μCCP -OES este prezentat în Figura 6.1.

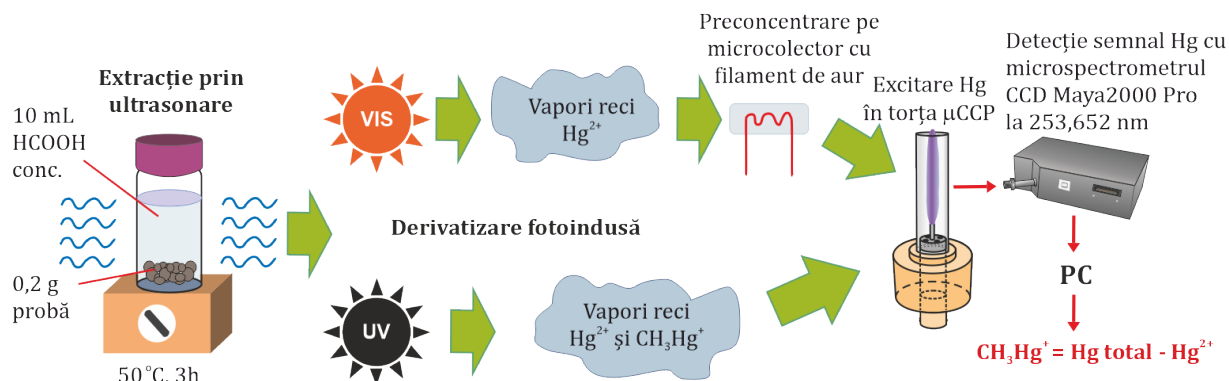


Figura 6.1. Schema de principiu a procedurii de speciere a mercurului sub formă de CH_3Hg^+ și Hg^{2+} din alimentația marină prin metoda eco-scală UV/Vis-PVG- μCCP -OES cu și fără preconcentrare⁹³

Procedura de speciere a Hg prin metoda UV/Vis-PVG- μCCP -OES a cuprins următoarele etape: (1) extracția speciilor de Hg din 0,2 g probă în 10 mL HCOOH 98–100% (m/m) prin ultrasonare timp de 3 h la 50 °C; (2) determinarea Hg^{2+} prin metoda Vis-PVG- μCCP -OES, prin derivatizare selectivă fotoindusă la vapori reci în prezența luminii ambiante (lampa UV oprită), în mediu de 0,6 mol L⁻¹ HCOOH și preconcentrarea vaporilor de Hg pe filamentul de aur, dintr-un volum alicot de 25 mL de probă; (3) determinarea Hg total (suma CH_3Hg^+ și Hg^{2+}) prin derivatizare fotoindusă în prezența radiației UV (lampa UV pornită), în mediu de 0,6 mol L⁻¹ HCOOH fără preconcentrare, (4) determinarea CH_3Hg^+ prin diferența între Hg total și Hg^{2+} .

Specierea Hg prin metoda de referință TD-AAS s-a bazat pe determinarea Hg total direct din proba solidă, și a CH_3Hg^+ , după extracția dublă lichid-lichid în sistemul HBr-toluen-soluție 1% L-cisteină (descrisă în Capitolul 3), și calculul concentrației de Hg^{2+} prin diferență.

6.3. Instrumentația UV/Vis-PVG- μCCP -OES pentru specierea Hg sub formă de Hg^{2+} și CH_3Hg^+

Montajul experimental pentru metoda UV/Vis-PVG- μCCP -OES, utilizat la specierea Hg sub formă de CH_3Hg^+ și Hg^{2+} din mușchiul de pește, este prezentat în Figura 6.2 (a,b). Pentru determinarea Hg total, extras în HCOOH concentrat s-a aplicat derivatizarea UV fotoindusă sub acțiunea radiației emise de o lampă de Hg cu puterea de 500 W, iar pentru determinarea selectivă a Hg^{2+} , lampa UV a fost oprită, și s-a aplicat preconcentrarea vaporilor de Hg pe un microcolector cu filament de aur, încălzit apoi de la o sursă prin aplicarea unui potențial de 5 V și 1,8 A, pentru desorbția vaporilor de Hg. Condițiile optime de lucru utilizate pentru determinarea Hg total și a Hg^{2+} sunt prezentate în Tabelul 6.1

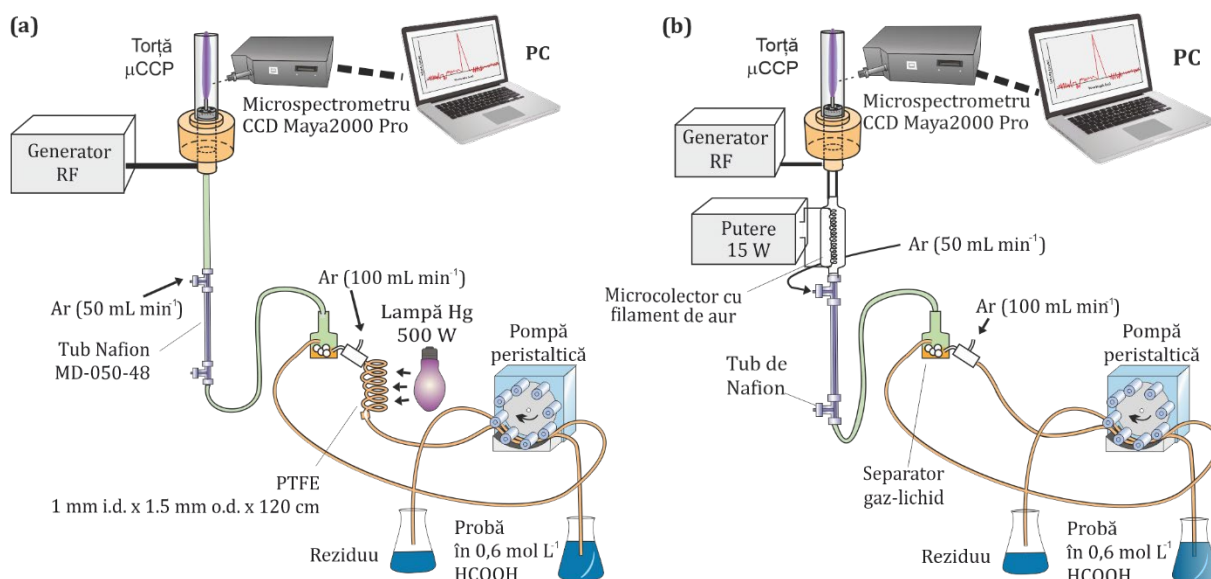


Figura 6.2. Schema montajului experimental UV-PVG- μ CCP-OES fără preconcentrare (a) pentru determinarea Hg total și Vis-PVG- μ CCP-OES cu preconcentrare (b) folosit la determinarea Hg²⁺ din mușchi de pește⁹⁴

Tabelul 6.1. Condițiile optime de lucru la specierea Hg prin metoda eco-scală UV/Vis-PVG- μ CCP-OES⁹⁴

	Hg total UV-PVG-μCCP-OES	Hg²⁺ Vis-PVG-μCCP-OES
Domeniu de etalonare ($\mu\text{g L}^{-1}$) cu standarde de Hg ²⁺ (n=7)	0-10	0-1
Preconcentrare	Nu	Da (25 mL soluție probă)
Reactiv de derivatizare	0,6 mol L ⁻¹ HCOOH	0,6 mol L ⁻¹ HCOOH
Lampă UV	Pornită	Oprită
Debit probă (mL min ⁻¹)	10	10
Timp de iradiere probă (s)	5	Semnalul nu variază semnificativ cu timpul
Putere plasmă (W)	15	15
Debit Ar (mL min ⁻¹)	100	100
Înălțime de observare (mm)	1,6	1,6
Integrare semnal	Înălțime pic cu 1 s timp de integrare; corecție de fond în două puncte	Modul High Speed Acquisition; 20 de spectre episod cu 1 s timp de integrare; corecție de fond în două puncte pentru fiecare episod.

6.4. Caracterizarea și validarea metodei UV/Vis-PVG- μ CCP-OES

Parametri curbelor de etalonare, LODs și LOQs a metodei de speciere a Hg prin metoda UV/Vis-PVG- μ CCP-OES sunt prezentate în Tabelul 6.2. Deoarece limitele de detecție pentru Hg total/CH₃Hg⁺/Hg²⁺ au fost de 56/104/250 ori, iar cele de determinare de 18/36/83 ori mai mici decât concentrația maximă admisă a Hg total în carnea de pește, metoda UV/Vis-PVG- μ CCP-OES

îndeplinește cerințele impuse de Comisia Europeană în Decizia 2007/333/EC⁵², și astfel, metoda este corespunzătoare pentru specierea mercurului în astfel de probe.^{52,95}

Tabelul 6.2. Limitele de detecție și de determinare pentru Hg total, Hg²⁺ și CH₃Hg⁺ în carnea de pește obținute prin metoda UV/Vis-PVG-μCCP-OES⁹⁴

Specie	Metodă	Sensibilitatea de etalonare ± C.I. ^a	s _{y/x}	LOD		LOQ	
				ng L ⁻¹	μg kg ⁻¹	ng L ⁻¹	μg kg ⁻¹
Hg total	UV-PVG-μCCP-OES fără preconcentrare	5905 ± 9	7	3,5	9	10,5	27
Hg ²⁺	Vis-PVG-μCCP-OES cu preconcentrare	17.430 ± 14	11	1,9	4,8	5,7	14
CH ₃ Hg ⁺	UV-PVG-μCCP-OES fără preconcentrare	2150 ± 10	6,2	7	2	21	6

^a C.I. este intervalul de încredere pentru n=7 soluții standard de Hg²⁺ și 95% nivel de încredere.

Acuratețea metodei de speciere a Hg prin UV/Vis-PVG-μCCP-OES, evaluată pe baza analizei a 5 probe de CRM de origine marină, a asigurat grade medii de regăsire de 99 ± 6% pentru Hg total, 99 ± 9% pentru Hg²⁺ și 99 ± 10% pentru CH₃Hg⁺ (Tabelul 6.3), valori similare cu cele obținute prin metoda de referință TD-AAS (Tabelul 6.4). Astfel, metoda UV/Vis-PVG-μCCP-OES satisface cerințele din Decizia 2007/333/EC⁵² și cele AOAC⁵⁴.

6.5. Aplicarea metodei de speciere la analiza de probe reale de mușchi de pește

Rezultatele obținute în urma specierii Hg în 7 soiuri de carne de pește prin metoda eco-scală UV/Vis-PVG-μCCP-OES, în comparație cu metoda de referință TD-AAS sunt prezentate în Tabelul 6.5, iar pentru metoda de referință în Tabelul 6.6. Precizia metodei UV/Vis-PVG-μCCP-OES, exprimată ca RSD pentru Hg total, CH₃Hg⁺ și Hg²⁺ în probele de mușchi de pește, s-a încadrat între 2,0–13,4% și astfel satisface recomandările AOAC,⁵⁴ care prevăd o precizie mai bună de 20%. De asemenea, metoda de speciere UV/Vis-PVG-μCCP-OES îndeplinește și cerința impusă de Comisia Europeană în Decizia 333/2007/EC,⁵² deoarece valorile indicelui HorRat au fost mai mici de 2, pentru o deviație relativă standard prezisă (PRSD) de 19%.

Rezultatele aplicării testului Bland și Altman pe concentrațiile de Hg total, CH₃Hg⁺ și Hg²⁺, determinate în probele de carne de pește prin metodele UV/Vis-PVG-μCCP-OES și TD-AAS sunt prezentate în Tabelul 6.7. Testul Bland și Altman a evidențiat faptul că nu există diferențe semnificative la specierea Hg între cele două metode, deoarece diferențele dintre rezultate s-au încadrat între limitele de încredere a Hg total, CH₃Hg⁺ și Hg²⁺. De asemenea, erorile sistematice pozitive pentru Hg²⁺ de 0,004, respectiv negative de (-0,004) pentru CH₃Hg⁺, sunt întâmplătoare, deoarece intervalul de încredere al acestora, conțin valoarea zero, iar abaterea medie este mică, în comparație cu valorile concentrațiilor determinate în analiza de speciere.

Tabelul 6.3. Acuratețea metodei UV/Vis-PVG-μCCP-OES de speciere a Hg sub formă de CH₃Hg⁺ și Hg²⁺ în alimentația de origine marină⁹⁴

CRM	Valoarea certificată ± U ^a (mg kg ⁻¹)			Valoarea găsită ± C.I. ^b (mg kg ⁻¹)		
	Hg total	Hg ²⁺	CH ₃ Hg ⁺	Hg total	Hg ²⁺	CH ₃ Hg ⁺
DOLT-4	2,58 ± 0,22	1,25 ± 0,16	1,33 ± 0,12	2,59 ± 0,24	1,23 ± 0,13 ^c	1,36 ± 0,18 ^c
BCR-463	2,85 ± 0,16	0,02 ± 0,002	3,04 ± 0,16	2,84 ± 0,18	0,02 ± 0,002 ^d	3,00 ± 0,33 ^d
ERM-CE-464	5,24 ± 0,10	0,12 ± 0,004	5,50 ± 0,17	5,25 ± 0,30	0,12 ± 0,02 ^d	5,46 ± 0,91 ^d
TORT-2	0,27 ± 0,06	0,118 ± 0,028	0,152 ± 0,013	0,25 ± 0,02	0,117 ± 0,011 ^c	0,133 ± 0,016 ^c
SRM 2976	0,0610 ± 0,0036	0,0329 ± 0,0020	0,0281 ± 0,0024	0,0627 ± 0,0046	0,0325 ± 0,0028 ^c	0,0302 ± 0,0033 ^c
Grad de regăsire cumulat ± C.I. (%)				99 ± 6	99 ± 9	99 ± 10

^a U este incertitudinea extinsă pentru un nivel de încredere de 95%; ^b m = 5 extracții/analize complete pentru fiecare probă; ^c Conținut exprimat ca Hg; ^d Conținut exprimat ca CH₃Hg⁺.

Tabelul 6.4. Acuratețea metodei TD-AAS de speciere a Hg sub formă de CH₃Hg⁺ și Hg²⁺ în alimentația de origine marină⁹⁴

CRM	Valoarea certificată ± U ^a (mg kg ⁻¹)			Valoarea găsită ± C.I. ^b (mg kg ⁻¹)		
	Hg total	Hg ²⁺	CH ₃ Hg ⁺	Hg total	Hg ²⁺	CH ₃ Hg ⁺
DOLT-4	2,58 ± 0,22	1,25 ± 0,16	1,33 ± 0,12	2,37 ± 0,29	1,03 ± 0,13	1,34 ± 0,14 ^c
BCR-463	2,85 ± 0,16	0,02 ± 0,002	3,04 ± 0,16	2,81 ± 0,18	0,02 ± 0,002	2,97 ± 0,26 ^d
ERM-CE-464	5,24 ± 0,10	0,12 ± 0,004	5,50 ± 0,17	5,11 ± 0,32	0,08 ± 0,01	5,36 ± 0,33 ^d
TORT-2	0,27 ± 0,06	0,118 ± 0,028	0,152 ± 0,013	0,28 ± 0,07	0,128 ± 0,015	0,152 ± 0,015 ^c
SRM 2976	0,0610 ± 0,0036	0,0329 ± 0,0020	0,0281 ± 0,0024	0,0630 ± 0,0060	0,0330 ± 0,0044	0,0300 ± 0,0041 ^c
Grad de regăsire cumulat ± C.I. (%)				99 ± 7	92 ± 10	96 ± 8

^a U este incertitudinea extinsă pentru un nivel de încredere de 95%; ^b m=5 extracții/analize complete pentru fiecare probă; ^c Conținut exprimat ca Hg; ^d Conținut exprimat ca CH₃Hg⁺.

Tabelul 6.5. Rezultatele specierii Hg în mușchiul de pește prin metoda UV/Vis-PVG-μCCP-OES⁹⁴

Probă	Hg total			Hg ²⁺			CH ₃ Hg ⁺		
	Concentrație medie ± C.I. ^a (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	Indicele HorRat	Concentrație medie ± C.I. ^a (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	Indicele HorRat	Concentrație medie ± C.I. ^a (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	Indicele HorRat
Ton	0,212 ± 0,017	6,4	0,34	0,022 ± 0,002	7,3	0,38	0,190 ± 0,023	9,7	0,51
Păstrăv	0,110 ± 0,004	2,9	0,15	0,079 ± 0,007	7,1	0,38	0,031 ± 0,003	7,8	0,41
Somon	0,126 ± 0,007	4,5	0,23	0,018 ± 0,003	13,4	0,71	0,108 ± 0,019	14,2	0,74
Merluciu	0,216 ± 0,007	2,6	0,14	0,035 ± 0,002	4,6	0,24	0,181 ± 0,012	5,3	0,28
Crap	0,089 ± 0,006	5,4	0,28	0,019 ± 0,002	8,5	0,45	0,070 ± 0,009	10,4	0,54
Macrou	0,198 ± 0,025	10,2	0,54	0,031 ± 0,004	10,4	0,55	0,167 ± 0,030	14,5	0,76
Cod	0,305 ± 0,032	8,4	0,44	0,120 ± 0,003	2,0	0,10	0,185 ± 0,020	8,7	0,46
Min.	0,089	2,6	0,14	0,018	2,0	0,10	0,031	5,3	0,28
Max.	0,305	10,2	0,54	0,120	13,4	0,71	0,190	14,5	0,76
Medie	0,198	5,4	0,28	0,031	7,3	0,38	0,167	9,7	0,51
Mediana	0,179	5,8	0,30	0,046	7,6	0,40	0,133	10,1	0,53

^a m = 5 extracții complete pentru fiecare probă și nivel de încredere de 95%

Tabelul 6.6. Rezultatele specierii Hg în mușchiul de pește prin metoda TD-AAS⁹⁴

Probă	Hg total			Hg ²⁺			CH ₃ Hg ⁺		
	Concentrație medie ± C.I. ^a (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	Indicele HorRat	Concentrație medie ± C.I. ^a (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	Indicele HorRat	Concentrație medie ± C.I. ^a (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	Indicele HorRat
Ton	0,215 ± 0,012	4,5	0,24	0,013 ± 0,002	8,9	0,47	0,202 ± 0,022	8,8	0,46
Păstrăv	0,104 ± 0,006	4,6	0,24	0,063 ± 0,008	9,5	0,50	0,041 ± 0,005	9,8	0,52
Somon	0,125 ± 0,004	2,6	0,14	0,028 ± 0,003	7,1	0,37	0,097 ± 0,008	6,6	0,35
Merluciu	0,216 ± 0,010	3,7	0,20	0,047 ± 0,007	11,2	0,59	0,169 ± 0,025	11,9	0,63
Crap	0,099 ± 0,008	6,5	0,34	0,010 ± 0,002	18,4	0,97	0,089 ± 0,019	17,0	0,89
Macrou	0,190 ± 0,019	8,1	0,43	0,025 ± 0,005	14,2	0,75	0,165 ± 0,025	12,2	0,64
Cod	0,308 ± 0,023	6,0	0,32	0,110 ± 0,014	9,4	0,50	0,198 ± 0,021	8,5	0,45
Min.	0,099	2,6	0,14	0,010	7,1	0,37	0,041	6,6	0,35
Max.	0,308	8,1	0,43	0,115	18,4	0,97	0,202	17	0,89
Medie	0,190	4,6	0,24	0,028	9,5	0,50	0,165	9,8	0,52
Mediana	0,180	5,2	0,27	0,043	11,3	0,59	0,137	10,7	0,56

^a m = 5 extracții complete pentru fiecare probă și un nivel de încredere de 95%

Tabelul 6.7. Rezultatele obținute (mg kg⁻¹) în urma aplicării testului statistic Bland și Altman la determinarea Hg total, Hg²⁺ și CH₃Hg⁺ (m = 5 măsurări pentru fiecare probă), obținute prin metodele UV/VIS-PVG-μCCP-OES și TD-AAS din 7 probe de mușchi de pește pentru un nivel de încredere de 95%

Specie	s _x ^a	s _y ^a	s _{B_{X-Y}} ^b	Bias ^c	Limite de încredere ^d
Hg total	0,014	0,011	0,017	0,000 ± 0,007	0,033 ± 0,008 -0,034 ± 0,008
Hg ²⁺	0,003	0,006	0,012	0,004 ± 0,013	0,028 ± 0,009 -0,020 ± 0,009
CH ₃ Hg ⁺	0,015	0,016	0,012	-0,004 ± 0,015	0,042 ± 0,012 -0,050 ± 0,012

^a Deviația standard medie a rezultatelor obținute în metoda UV/Vis-PVG-μCCP-OES (X), respectiv TD-AAS (Y); ^b Deviația standard medie a abaterii rezultatelor între metodele UV/Vis-PVG-μCCP-OES și TD-AAS; ^c Abaterea calculată ca $\bar{\Delta} \pm t \frac{s_{B_{X-Y}}}{\sqrt{n}}$, pentru un nivel de încredere de 95%; ^d Limitele de încredere calculate ca $\bar{\Delta} \pm 1,96 \cdot s_{B_{X-Y}} \pm t \cdot s_{LL,UL}$, pentru un nivel de încredere de 95%.

6.6. Concluzii

Concluziile, care au rezultat în urma acestui studiu au fost următoarele:

1. A fost demonstrat că este posibilă specierea Hg sub formă de CH₃Hg⁺ și Hg²⁺ în mușchiul de pește, printr-o metodă generală eco-scală UV/Vis-PVG-μCCP-OES, bazată pe o instrumentație complet miniaturizată de mică putere și consum redus de Ar, în care se utilizează o metodă simplă și ieftină de prelucrare a probei și de derivatizare fotoindusă, prin utilizarea unui singur reactiv (HCOOH), respectiv prin utilizarea unor metode verzi de extracție și de derivatizare, asistate de ultrasunete și radiații UV/Vis. Astfel, a fost evitată utilizarea reactivilor toxici (HBr, toluen) necesari pentru dubla extracție lichid-lichid, utilizată la extracția CH₃Hg⁺.
2. Metoda de speciere a Hg prin UV/Vis-PVG-μCCP-OES satisface cerințele Comisiei Europene și recomandările AOAC în ceea ce privește performanțele analitice, fiind astfel o alternativă viabilă la metodele sofisticate cuplate, sau chiar la cele necromatografice bazate pe detecție ICP-OES sau ICP-MS;
3. A fost demonstrat că este posibilă determinarea selectivă a Hg²⁺ prin metoda eco-scală Vis-PVG-μCCP-OES, dacă se aplică derivatizarea fotoindusă în absența radiației UV. Impedimentul vitezei de derivatizare mult mai mică a Hg²⁺ fără iradiere UV, a fost depășit foarte ușor prin cuplajul derivatizării fotoinduse cu preconcentrarea *on-line* pe un microcolector cu filament de aur, obținându-se o sensibilitate bună, necesară determinării concentrațiilor foarte mici de Hg²⁺ în mușchiul de pește;
4. Testul statistic Bland și Altman a demonstrat faptul că metoda dezvoltată este una viabilă la TD-AAS, recomandată de Comisia Europeană;

7. Evaluarea gradului de verde și de alb a metodelor UV/Vis-PVG- μ CCP-OES pentru determinarea și specierea mercurului

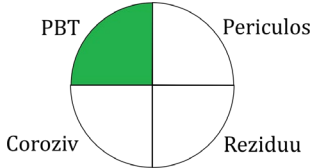
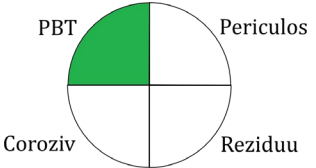
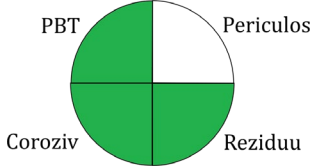
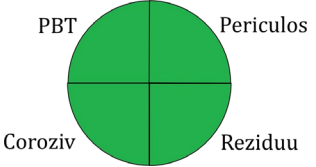
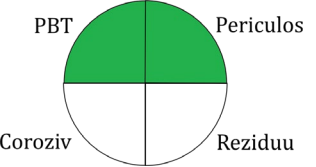
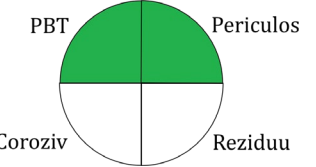
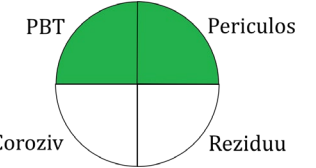
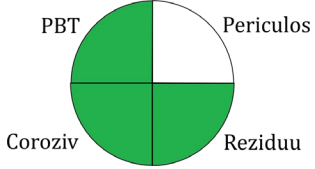
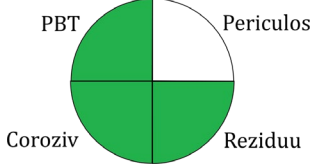
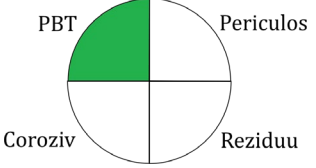
7.1. Situația la nivel internațional. Ipoteze de lucru și obiective.

Evaluarea gradului de verde și de alb a noilor metode analitice dezvoltate, pe diferite etape de preparare a probei și de analiză, comparativ cu cele tradiționale este necesară pentru a stabili care etapă este răspunzătoare de scăderea gradului de verde sau de alb, în așa fel încât să fie avută în vedere în cercetări ulterioare pentru îmbunătățirea acesteia. Așa cum a fost arătat în Capitolul 1, din păcate evaluarea gradului de verde până nu demult era unul subiectiv, lăsat la latitudinea operatorului, care duce de regulă la evaluări supraestimate, dacă nu se iau în vedere criteriile obiective.^{96,97} În schimb, evaluarea gradului de alb se bazează pe criterii mult mai versatile și flexibile, în care se consideră, pe lângă gradul de verde și gradul de roșu prin performanțele analitice obținute, respectiv gradul de albastru prin aplicabilitatea practică a metodei.⁷ Astfel, scopul acestui studiu a fost evaluarea gradului de verde și de alb a noilor metode UV/Vis-PVG- μ CCP-OES de determinare a Hg total, CH₃Hg⁺ și Hg²⁺, comparativ cu metodele tradiționale TD-AAS, SnCl₂-CV-AFS și SnCl₂-CV-ICP-OES, printr-o evaluare integrată pe baza celor 4 proceduri prezentate în primul capitol al tezei, și anume procedura NEMI³, ESA⁴, GAPI⁵ și AGREE⁶. Evaluarea gradului de alb a fost realizată pe baza procedurii RGB-12⁷, care s-a dovedit a fi foarte utilă în evaluarea noilor metode analitice, deoarece în această procedură pot fi considerate toate aspectele analitice și cele legate de aplicabilitatea metodei, față de evaluarea gradului de verde, care uneori este foarte restrictiv, considerând doar cele 12 principii GAC. În acest fel a putut fi realizat o comparare mult mai exhaustivă a noilor metode comparativ cu metodele tradiționale, utilizate în mod curent în laborator.

7.2. Rezultatele evaluării gradului de verde și de alb al metodelor UV/Vis-PVG- μ CCP-OES de determinare și speciere a Hg

Tabelele 7.1–7.4 prezintă gradul de verde a noilor metode UV/Vis-PVG- μ CCP-OES de determinare și speciere a Hg sub formă de CH₃Hg⁺ și Hg²⁺, comparativ cu metodele tradiționale TD-AAS, SnCl₂-CV-ICP-OES și SnCl₂-CV-AFS, prin procedurile NEMI, ESA, GAPI și AGREE, iar Figura 7.1 prezintă centralizat rezultatele evaluării gradului de alb, obținute pe baza analizei RGB-12 din procedura WAC, a metodei UV/Vis-PVG- μ CCP-OES, comparativ cu metodele tradiționale.⁹⁸

Tabelul 7.1. Gradul de verde a noilor metode UV/Vis-PVG- μ CCP-OES de determinare și speciere a Hg prin procedura NEMI³ comparativ cu metodele tradiționale⁹⁸

Procedură determinare specie Hg	UV-PVG- μ CCP-OES	TD-AAS	SnCl ₂ -CV-ICP-OES	SnCl ₂ -CV-AFS	SnCl ₂ -CV- μ CCP-OES
CH₃Hg⁺			-	-	-
Hg total - alimente					
Hg total - apă		-	-	-	-
Speciere Hg sub formă de CH₃Hg⁺ și Hg²⁺*			-	-	-

* Specierea Hg sub formă de CH₃Hg⁺ și Hg²⁺ s-a realizat prin metoda UV/Vis-PVG- μ CCP-OES

Tablelul 7.2. Gradul de verde a noilor metode UV/Vis-PVG- μ CCP-OES de determinare și speciere a Hg prin procedura Eco-Scala Analitică (ESA)⁴ comparativ cu metodele tradiționale⁹⁸

Procedură determinare specie Hg	Puncte penalizare metode/Scor ESA				
	UV-PVG- μ CCP-OES	TD-AAS	SnCl ₂ -CV-ICP-OES	SnCl ₂ -CV-AFS	SnCl ₂ -CV- μ CCP-OES
CH₃Hg⁺					
Reactivi	27 ¹	28 ¹	-	-	-
Instrumentație, risc profesional, reziduu	12	12	-	-	-
<i>Scor ESA</i>	61	62	-	-	-
Hg total -alimente					
Reactivi	13 ²	8 ³	23 ⁴	22 ⁴	21 ⁴
Instrumentație, risc profesional, reziduu	9	1	11	10	10
<i>Scor ESA</i>	78	91	66	68	69
Hg total - apă					
Reactivi	7 ⁵	-	-	-	-
Instrumentație, risc profesional, reziduu	8	-	-	-	-
<i>Scor ESA</i>	85	-	-	-	-
Speciere Hg sub formă de CH₃Hg⁺ și Hg²⁺					
Reactivi	13 ⁶	28 ⁷	-	-	-
Instrumentație, risc profesional, reziduu	9	12	-	-	-
<i>Scor ESA</i>	78	62	-	-	-

¹ extracție dublă lichid-lichid în sistemul HBr-toluen-L-cisteină și derivatizare fotoindusă în HCOOH;

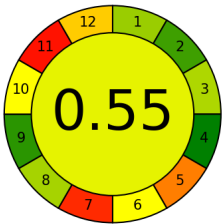
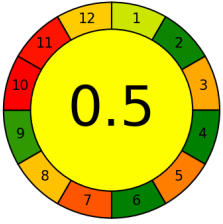
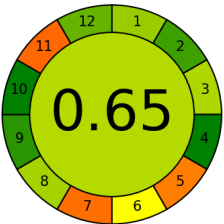

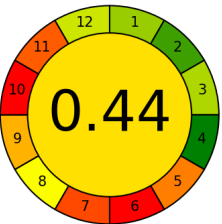
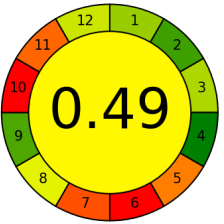
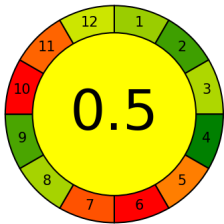

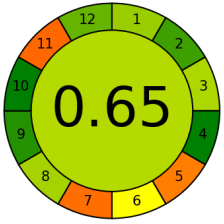
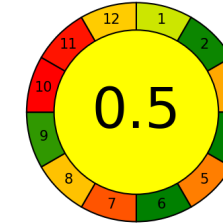
² extracție Hg total în HCOOH și derivatizare fotoindusă în HCOOH; ³ determinare directă din solid; ⁴ mineralizare cu HNO₃ și H₂O₂ și derivatizare cu SnCl₂ în HCl; ⁵ acidulare la 0,6 mol L⁻¹ HCOOH și derivatizare fotoindusă în HCOOH; ⁶ extracție în HCOOH și derivatizare fotoindusă UV pentru determinarea Hg total, respectiv derivatizare Vis pentru determinare Hg²⁺; ⁷ extracție dublă lichid-lichid în sistemul HBr-toluen-L-cisteină pentru determinarea CH₃Hg⁺, respectiv determinarea directă a Hg total din proba solidă

Tabelul 7.3. Gradul de verde prin procedura GAPI⁵ a noilor metode UV/Vis-PVG- μ CCP-OES de determinare și speciere a Hg comparativ cu metodele tradiționale⁹⁸

Procedură determinare specie Hg	UV-PVG- μ CCP-OES	TD-AAS	SnCl ₂ -CV-ICP-OES	SnCl ₂ -CV-AFS	SnCl ₂ -CV- μ CCP-OES
CH ₃ Hg ⁺			-	-	-
Hg total -alimente					
Hg total - apă		-	-	-	-
Speciere Hg sub formă de CH ₃ Hg ⁺ și Hg ²⁺ *			-	-	-

* Specierea Hg sub formă de CH₃Hg⁺ și Hg²⁺ s-a realizat prin metoda UV/Vis-PVG- μ CCP-OES

Tabelul 7.4. Gradul de verde prin procedura AGREE⁶ a noilor metode UV/Vis-PVG- μ CCP-OES de determinare și speciere a Hg comparativ cu metodele tradiționale⁹⁸

Procedură determinare specie Hg	UV-PVG- μ CCP-OES	TD-AAS	SnCl ₂ -CV-ICP-OES	SnCl ₂ -CV-AFS	SnCl ₂ -CV- μ CCP-OES
CH ₃ Hg ⁺			-	-	-
Hg total - alimente					
Hg total - apă		-	-	-	-
Speciere Hg sub formă de CH ₃ Hg ⁺ și Hg ²⁺ *			-	-	-

* Specierea Hg sub formă de CH₃Hg⁺ și Hg²⁺ s-a realizat prin metoda UV/Vis-PVG- μ CCP-OES

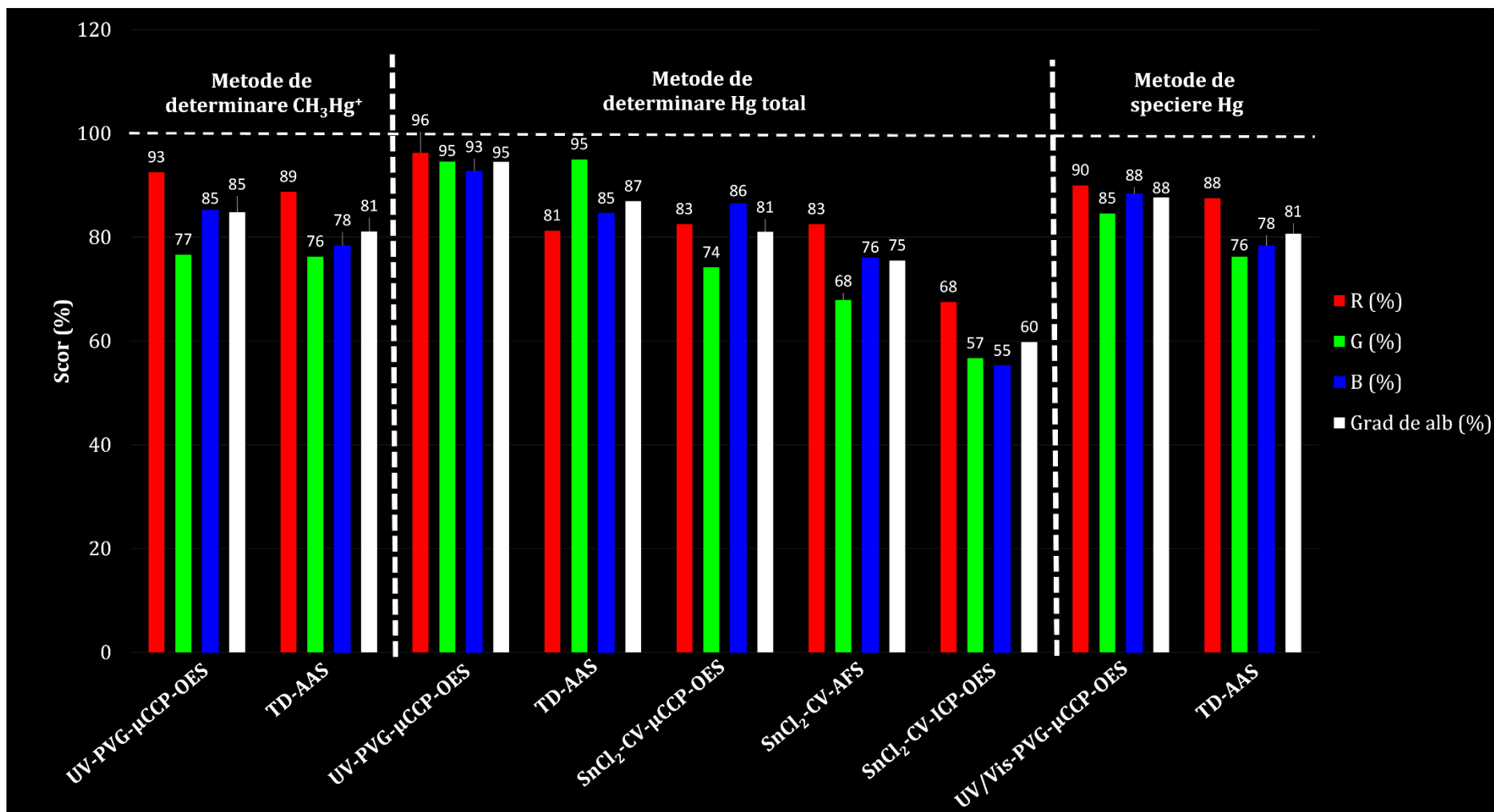


Figura 7.1. Compararea rezultatelor finale prin coloane a gradului de alb, obținute pe baza analizei RGB-12 din procedura WAC ^{7,98}

7.3. Concluzii

Rezultatele obținute au condus la următoarele concluzii:

1. Metoda UV-PVG- μ CCP-OES prezintă un grad de verde la determinarea Hg total și speciere între 25–75%, conform procedurii NEMI, între 61–85% în conformitate cu procedura ESA, respectiv 55–65% în conformitate cu procedura AGREE, comparativ cu 25–50% în metodele tradiționale SnCl₂-CV-AFS și SnCl₂-CV-ICP-OES (NEMI), 66–68% în metodele SnCl₂-CV-ICP-OES și SnCl₂-CV-AFS (ESA), respectiv 44 % SnCl₂-CV-ICP-OES și 49% pentru SnCl₂-CV-AFS (AGREE). Astfel, comparativ cu metodele tradiționale SnCl₂-CV-AFS și SnCl₂-CV-ICP-OES, metoda UV/Vis-PVG- μ CCP-OES prezintă un grad foarte bun sau excelent, comparativ cu un grad de verde slab, sub 50%, în cazul metodei ICP-OES.
2. Dintre metodele dezvoltate, metoda de determinare a CH₃Hg⁺ prin UV-PVG- μ CCP-OES prezintă cel mai mic grad de verde, ca urmare a utilizării a dublei extracții lichid-lichid în sistemul HBr-toluen-L-cisteină, respectiv utilizării unor reactivi corozivi și periculoși.
3. Gradul de verde al metodei UV-PVG- μ CCP-OES se îmbunătățește substanțial la determinarea Hg total din alimente marine și alimente de origine vegetală și animală, ca urmare a utilizării numai a HCOOH pentru extracție și derivatizare fotoindusă în locul mineralizării clasice cu reactivi corozivi (amestecul HNO₃-H₂O₂) și utilizării SnCl₂ în mediu de HCl pentru derivatizarea clasică. Față de metoda SnCl₂-CV-ICP-OES, metoda UV-PVG- μ CCP-OES prezintă un grad de verde mult mai ridicat ca urmare a unui consum mult mai mic de energie și Ar a instrumentației miniaturizate, comparativ cu ICP-OES.
4. Metoda UV/Vis-PVG- μ CCP-OES de speciere a Hg se caracterizează prin grade excelente de verde, și anume 75% prin metoda NEMI, 78% (ESA), și un grad foarte bun de verde 65% (procedura AGREE).
5. Metoda UV-PVG- μ CCP-OES prezintă un grad de verde foarte scăzut de 25% (NEMI), la determinarea CH₃Hg⁺, dar similar cu metoda TD-AAS, ca urmare a aceleași proceduri de separare în sistemul HBr-toluen-L-cisteină. Metoda TD-AAS prezintă grade de verde mai bune la determinarea Hg total din alimente de origine marină direct din proba solidă fără prelucrare cu reactivi, și anume, 100% (NEMI), 91% (ESA), 79% (AGREE), dar nu are o sensibilitate la fel de bună ca metoda UV-PVG- μ CCP-OES bazată pe extracție și derivatizare în HCOOH, și astfel nu a putut fi utilizată ca referință la analiza din alimente de origine animală și vegetală, respectiv probe de apă.
6. Dintre cele 4 proceduri de evaluare, procedura GAPI s-a dovedit a fi cea mai dificilă și cea mai subiectivă, deoarece se bazează doar pe o pictogramă subiectivă, fără valori numerice. Astfel, evaluarea obiectivă a gradului de verde într-o ordine descrescătoare a unei metode analitice prin cele 4 proceduri este următoarea: ESA > AGREE > GAPI > NEMI.

7. Au fost observate, de asemenea, unele deficiențe pentru procedurile de evaluare a gradului de verde, și anume: procedura NEMI consideră numai reactivii utilizați la prepararea probei și neglijează etapele de analiză propriu-zisă (instrumentația). Procedura AGREE, deși a fost dezvoltată foarte recent, ea a fost configurată pe baza celor 12 principii GAC cu precădere pentru metodele cromatografice, și mai puțin pentru cele spectrometrice, și astfel, unele aspecte nu sunt considerate în softul AGREE. Se consideră doar dacă instrumentația este automatizată sau nu, metoda fiind penalizată doar la consumul general de energie, și nu pe etape de analiză. Procedura ESA s-a dovedit a fi cea mai potrivită, deoarece se bazează pe puncte de penalizare bine stabilite pentru fiecare dintre etapele de analiză, preparare probă, instrumentație, reziduu, condiții de lucru, etc.
8. Pe baza procedurii RGB-12 a fost evaluat în premieră gradul de alb a noilor metode dezvoltate pe baza gradului de roșu (performanțe analitice), de verde (toxicitate și reactivi utilizați), respectiv albastru (aplicabilitate practică). Metodele UV/Vis-PVG- μ CCP-OES se caracterizează printr-un grad de alb între 81–95%, mult superior metodelor tradiționale SnCl₂-CV-AFS (75%), dar mai ales SnCl₂-CV-ICP-OES (60%), dar similar cu TD-AAS (81–88%). A fost evidențiat rolul important a instrumentației miniaturizate prin avantajele economice deosebite aduse de consumul mult mai redus de energie și Ar, și metodelor mai verzi de extracție și derivatizare fotoindusă, care utilizează numai HCOOH.
9. Principala contribuție a prezentului studiu o reprezintă evaluarea pentru prima dată a gradului de verde, dar și de alb a unor metode de determinare și speciere a Hg, comparativ cu metodele tradiționale printr-o abordare integrată, care a permis o încadrare obiectivă în ceea ce privește nivelul de roșu, verde, albastru și alb prin performanțele analitice, reactivii utilizați, prepararea probei, instrumentația utilizată, avantajele economice, consumul de energie și Ar, consumul de reactivi, cantitatea de reziduu, respectiv instrumentația utilizată prin gradul de miniaturizare, automatizare și portabilitate, respectiv aplicabilitatea metodei la diverse probe. Astfel, a fost evidențiat în mod obiectiv avantajul metodelor mai verzi la extracție și derivatizare asistate de ultrasunete și derivatizare fotoindusă, respectiv avantajul economic major al unei instrumentații complet miniaturizate cu o sursă de microplasmă, ca urmare a unui consum mult mai redus de energie și Ar, comparativ cu instrumentația larg utilizată în laboratoarele de analiză (ICP-OES).

8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei. Concluzii generale

În cadrul programului de doctorat, au fost obținute următoarele rezultate originale și contribuții proprii inovative:

1. Au fost dezvoltate 4 metode de determinare a CH_3Hg^+ , Hg total și de speciere a Hg sub formă de CH_3Hg^+ și Hg^{2+} în alimente de origine marină, animală, vegetală și în probe de mediu, bazate pe spectrometria de emisie optică în microtorța de plasmă cuplată capacitiv ($\mu\text{CCP-OES}$), interfațată cu microspectrometre de joasă rezoluție, cu grad mediu de verde pentru determinarea CH_3Hg^+ (1 procedură), respectiv excelent verde pentru determinarea Hg total și specierea acestuia sub formă de CH_3Hg^+ și Hg^{2+} (3 proceduri).
2. A fost interfațat, pentru prima dată, un fotoreactor cu construcție simplă pentru derivatizarea fotoindusă la vapori reci a CH_3Hg^+ , Hg total și Hg^{2+} în prezența și absența unei radiații UV, obținută de la o lampă de Hg cu puterea de 500 W, cu o microplasmă cuplată capacitiv cu consum redus de energie și Ar. Fotoreactorul a fost operat rapid, în flux continuu, cu sau fără preconcentrarea *on-line* a vaporilor de Hg pe un microcolector cu filament de Au, pentru a crește sensibilitatea metodei. Preconcentrarea *on-line* nu a complicat metodele analitice dezvoltate, deoarece cuplajul dintre fotoreactor și microcolectorul cu filament de Au a fost *on-line*, cu înregistrarea spectrelor episod de emisie a Hg.
3. A fost demonstrat că derivatizarea fotoindusă în prezența radiației UV, decurge instantaneu cu aceeași eficiență și aceeași viteză, atât pentru CH_3Hg^+ , cât și pentru Hg^{2+} , ceea ce a făcut posibilă utilizarea calibrării externe în cazul ambelor specii de Hg. Astfel, procedura de determinare și speciere a Hg a fost simplificată.
4. A fost dezvoltată o metodă de speciere a CH_3Hg^+ și Hg^{2+} , folosind doar HCOOH , atât pentru extracția probelor, cât și pentru derivatizarea fotoindusă UV/Vis, fiind astfel eliminată utilizarea reactivilor toxici și instabili. Viteza mică de derivatizare a Hg^{2+} în absența radiațiilor UV, și astfel, sensibilitatea mică, au fost compensate simplu, prin preconcentrarea *on-line* a vaporilor de Hg pe microcolectorul cu filament de Au.
5. A fost propusă o procedură de determinare a CH_3Hg^+ și a Hg total în alimentația marină, folosind doar HCOOH pentru extracție și derivatizare la vapori reci, ca alternativă la procedura recomandată de Comisia Europeană pentru determinarea CH_3Hg^+ , bazată pe dubla extracție HBr 47%-toluen-soluție 1% L-cisteină și determinare prin TD-AAS.
6. Au fost extinse metodele de determinare a Hg de la alimentația marină și la alimente de origine animală și vegetală, chiar dacă concentrația Hg în astfel de alimente este mult mai mică, datorită faptului că cantitatea consumată este mult mai mare, față de cele de origine marină, și astfel pot contribui la o expunere semnificativă la Hg.

7. Toate metodele de determinare a Hg total și de speciere, bazate pe μ CCP-OES cu derivatizare chimică clasică sau fotoindusă în mediu de HCOOH, au fost validate în concordanță cu cerințele impuse de legislația Europeană în Deciziile 2007/333/CE și 2002/657/CE, privind determinarea Hg în alimentația marină. Respectiv au fost comparate statistic, pe baza testului Bland și Altman cu metodele tradiționale, utilizate la determinarea Hg (TD-AAS, SnCl₂-CV-AFS și SnCl₂-CV-ICP-OES).
8. Testul statistic Bland și Altman, și performanțele analitice obținute, au demonstrat faptul că metodele de determinare a CH₃Hg⁺, Hg total și de speciere a Hg sub formă de CH₃Hg⁺ și Hg²⁺ în alimentație, sunt alternative viabile la metodele TD-AAS, SnCl₂-CV-AFS și SnCl₂-CV-ICP-OES.
9. Prin trei proceduri integrate (2 recomandate de EFSA și 1 de USEPA) s-a concluzionat că nu există nici un risc de expunere a populației la consumul de carne de pește, fiind evidențiat faptul că pot fi consumate 2-3 porții a câte 150 grame pe săptămână din peștii de origine oceanică, și practic o cantitate nelimitată (zilnic) din peștii de acvacultură, pentru un adult de 60 kg, respectiv nu există nici un risc în ceea ce privește consumul din soiurile de pește analizate pentru copii de 15 kg în cazul unui consum de 20 g pe porție.
10. Studiile au evidențiat faptul că, este absolut necesară specierea Hg în carnea de pește, sub formă de CH₃Hg⁺ și Hg²⁺ pentru o evaluare corectă a riscului de expunere diferit, având în vedere toxicitatea mult mai mare a CH₃Hg⁺ (PTWI 1,3 μ g kg⁻¹/pe masă corp), față de cea a Hg²⁺ (PTWI 4 μ g kg⁻¹/pe masă corp).
11. Rezultatele evaluării gradului de verde a metodelor UV/Vis-PVG- μ CCP-OES pe baza a 4 proceduri integrate NEMI, ESA, GAPI și AGREE, respectiv cel de alb pe baza procedurii RGB-12, au evidențiat că noile metode dezvoltate UV/Vis-PVG- μ CCP-OES prezintă grade de verde și de alb mai mari în cazul utilizării numai HCOOH pentru extracției și derivatizare, decât CV-AFS, și în special CV-ICP-OES, bazată pe mineralizarea clasică în microunde cu HNO₃ și H₂O₂ urmată de derivatizarea clasică cu SnCl₂ în mediu de HCl. Un rol important asupra îmbunătățirii gradului de verde a fost observat datorită miniaturizării instrumentației, și a costurilor mult mai mici, respectiv a unor LODs mult mai mici în cazul utilizării preconcentrării vaporilor de Hg.
12. A fost evidențiat clar în cadrul tezei de doctorat viabilitatea și fiabilitatea metodelor UV/Vis-PVG- μ CCP-OES la determinarea și specierea Hg din alimente ca alternative la metodele tradiționale bazate pe CV-ICP-OES, CV-AFS și TD-AAS.
13. Rezultatele obținute în prezenta teză de doctorat au fost publicate în 5 articole ISI, cu suma factorilor de impact 20,896, din care 4 ca prim autor în reviste Q1. Rezultatele au fost prezentate la 9 conferințe internaționale, din care 2 sub formă de publicații în proceedings, 2 prezentări orale și 5 prezentări sub formă de postere.

Bibliografie

1. P. T. Anastas și J. C. Warner, *Green chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York, 1998.
2. A. Gałuszka, Z. Migaszewski și J. Namieśnik, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2013, **50**, 78-84.
3. L. H. Keith, L. U. Gron și J. L. Young, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 2695-2708.
4. A. Gałuszka, Z. M. Migaszewski, P. Konieczka și J. Namieśnik, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2012, **37**, 61-72.
5. J. Płotka-Wasyłka, *Talanta*, 2018, **181**, 204-209.
6. F. Pena-Pereira, W. Wojnowski și M. Tobiszewski, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 10076-10082.
7. P. M. Nowak, R. Wietecha-Posłuszny și J. Pawliszyn, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2021, **138**, număr articol 116223.
8. P. M. Nowak și P. Kościelniak, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 10343-10352.
9. C. Bendicho, I. Lavilla, F. Pena-Pereira și V. Romero, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, **27**, 1831-1857.
10. X. Yuan, J. Tang și Y. Duan, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2011, **46**, 581-605.
11. R. Foest, M. Schmidt și K. Becker, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2006, **248**, 87-102.
12. F. Meng, X. Yuan, X. Li, Y. Liu și Y. Duan, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2014, **49**, 533-549.
13. P. Pohl, K. Greda, A. Dzimitrowicz, M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, A. Lesniewicz și P. Jamroz, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2019, **113**, 234-245.
14. European Food Safety Authority (EFSA), Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA J.* 2012, **10**(12):2985, 1-241, <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2012.2985>, (accesat 15.11.2016).
15. N. Pirrone, S. Cinnirella, X. Feng, R. B. Finkelman, H. R. Friedli, J. Leaner, R. Mason, A. B. Mukherjee, G. Stracher, D. G. Streets și K. Telmer, in *Mercury Fate and Transport in the Global Atmosphere: Emissions, Measurements and Models*, eds. R. Mason and N. Pirrone, Springer US, Boston, MA, 2009, DOI: 10.1007/978-0-387-93958-2_1, pp. 1-47.
16. D. Mergler, H. A. Anderson, L. H. Chan, K. R. Mahaffey, M. Murray, M. Sakamoto și A. H. Stern, *Ambio*, 2007, **36**, 3-11.
17. *National Research Council Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury. Toxicological Effects of Methylmercury*, National Academies Press (US), Washington D.C., USA, 2000.
18. Regulamentul Comisiei Europene nr. 1881/2006 din 1819 decembrie 2006 de stabilire a nivelurilor maxime pentru anumiți contaminanți din produsele alimentare, Jurnalul Oficial al Uniunii Europene, 2006, L1364/1885.
19. Regulamentul Comisiei Europene (CE) nr. 629/2008 din 2 iulie 2008 de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1881/2006 de stabilire a nivelurilor maxime pentru anumiți contaminanți din produsele alimentare, Jurnalul Oficial al Uniunii Europene, 2008, L173/6.
20. EFSA, *EFSA J.*, 2015, **13**, număr articol 3982.
21. K. B. S. Perelonia, K. C. D. Benitez, R. J. S. Banicod, G. C. Tadifa, F. D. Cambia și U. M. Montojo, *Food Control*, 2021, **130**, număr articol 108363.
22. D. Kozaki, M. Mori, S. Hamasaki, T. Doi, S. Tanihata, A. Yamamoto, T. Takahashi, K. Sakamoto și S. Funado, *Anal. Methods*, 2021, **13**, 1106-1109.
23. Y. C. Liu, J. Zou, B. Luo, H. R. Yu, Z. G. Zhao și H. Xia, *Microchem. J.*, 2021, **169**, număr articol 106547.

24. M. T. Shi, X. A. Yang și W. B. Zhang, *Anal Chim Acta*, 2019, **1074**, 33-42.
25. X. Zhu și S. D. Alexandratos, *Microchem. J.*, 2007, **86**, 37-41.
26. S. Kulomäki, S. Perämäki și A. Väisänen, *Talanta*, 2020, **218**, număr articol 121125.
27. M. Senila, O. Cadar, A. Drolc, A. Pintar, L. Senila și T. Frentiu, *Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Chem.*, 2016, **61**, 321-332.
28. P. Pohl, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2004, **23**, 87-101.
29. Y. Gao, R. Liu și L. Yang, *Chin. Sci. Bull.*, 2013, **58**, 1980-1991.
30. P. Hu, X. Wang, Z. Wang, R. Dai, W. Deng, H. Yu și K. Huang, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2019, **119**, număr articol 115617.
31. K. Anderson, *Mercury Analysis in Environmental Samples by Cold Vapor Techniques*, in *Encyclopedia of analytical chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, United Kingdom, 2006.
32. P. J. Craig, R. O. Jenkins și G. H. Stojak, *Chemosphere*, 1999, **39**, 1181-1197.
33. E. Kenduzler, M. Ates, Z. Arslan, M. McHenry și P. B. Tchounwou, *Talanta*, 2012, **93**, 404-410.
34. R. E. Sturgeon, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 2319-2340.
35. Y. Yin, J. Liu și G. Jiang, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2011, **30**, 1672-1684.
36. M. Ślachciński, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 257-273.
37. R. Cornelis, J. Caruso, H. Crews și K. Heumann, *Handbook of Elemental Speciation II: Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, United Kingdom, 2005.
38. CODEX STAN 193-1995, Codex General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed, 2009, pp. 1991-1944.
39. A. S. Ribeiro, M. A. Vieira, S. Willie și R. E. Sturgeon, *Anal Bioanal Chem*, 2007, **388**, 849-857.
40. G. Chen, B. Lai, N. Mei, J. Liu și X. Mao, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2017, **137**, 1-7.
41. L. Wu, Z. Long, L. Liu, Q. Zhou, Y.-I. Lee și C. Zheng, *Talanta*, 2012, **94**, 146-151.
42. C. Han, C. Zheng, J. Wang, G. Cheng, Y. Lv și X. Hou, *Anal. Bioanal. Chem*, 2007, **388**, 825-830.
43. S. Zhang, H. Luo, M. Peng, Y. Tian, X. Hou, X. Jiang și C. Zheng, *Anal Chem*, 2015, **87**, 10712-10718.
44. H. Matusiewicz și M. Ślachciński, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2017, **133**, 52-59.
45. I. Baer, M. Baxter, V. Devesa, D. Vélez, G. Raber, R. Rubio, T. Llorente-Mirandes, J. J. Sloth, P. Robouch și B. de la Calle, *Food Control*, 2011, **22**, 1928-1934.
46. S. G. J. Calderon, F. Cordeiro, B. de la Calle, Determination of methylmercury in seafood by direct mercury analysis: Standard operating procedure. JRC Technical Reports, European Commission, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium, <https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/Full%20JRC%20Tecnical%20report%20SOP.pdf>, (accessed 15.11.2016).
47. E. Covaci, M. Senila, M. Ponta, E. Darvasi, D. Petreus, M. Frentiu și T. Frentiu, *Talanta*, 2017, **170**, 464-472.
48. R. E. Sturgeon și P. Grinberg, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, **27**, 222-231.
49. D. Leonori și R. E. Sturgeon, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 636-654.
50. P. Blanc, A. Burnol, N. Marty, J. Hellal, V. Guérin și V. Laperche, *Sci. Total Environ.*, 2018, **621**, 368-375.
51. J. N. Miller și J. Charlotte Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson Education Ltd, Edinburgh Gate, England, 2005.

52. Regulamentul Comisiei Europene nr. 333/2007 din 28 martie 2007 de stabilire a metodelor de prelevare a probelor și de analiză pentru controlul oficial al nivelurilor de plumb, cadmiu, mercur, staniu anorganic, 3-MCPD și benzo(e)piren din produsele alimentare, Jurnalul Oficial al Uniunii Europene, 2007, L 88/29.
53. Decizia Comisiei Europene 2002/657/EC din 14 august 2002 de stabilire a normelor de aplicare a Directivei 96/23/CE a Consiliului privind funcționarea metodelor de analiză și interpretarea rezultatelor, Jurnalul Oficial al Comunităților Europene, 2002, L 221/8.
54. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), AOAC Official Methods of Analysis, http://www.eoma.aoac.org/app_k.pdf (accesat 16.12.2019).
55. SR ISO 1443:2008 Meat and meat products - determination of total fat content.
56. E. Covaci, M. Senila, M. Ponta, E. Darvasi, M. Frentiu și T. Frentiu, *Food Control*, 2017, **82**, 266-273.
57. S. Díez și J. M. Bayona, *Talanta*, 2008, **77**, 21-27.
58. A. Gonzalez, M. L. Cervera, S. Armenta și M. de la Guardia, *Anal Chim Acta*, 2009, **636**, 129-157.
59. K. Leopold, M. Foulkes și P. Worsfold, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **663**, 127-138.
60. Y. Gao, Z. Shi, Z. Long, P. Wu, C. Zheng și X. Hou, *Microchem. J.*, 2012, **103**, 1-14.
61. Z. H. Fernández, L. A. Valcárcel Rojas, A. M. Álvarez, J. R. Estevez Álvarez, J. Araújo dos Santos, I. P. González, M. R. González, N. A. Macias, D. L. Sánchez și D. H. Torres, *Food Control*, 2015, **48**, 37-42.
62. C. Galimberti, I. Corti, M. Cressoni, V. Moretti, S. Menotta, U. Galli și D. Cambiaghi, *Food Control*, 2016, **60**, 329-337.
63. F. A. Duarte, C. A. Bizzi, F. G. Antes, V. L. Dressler și E. M. M. de Flores, 2009, **64**, 513-519.
64. I. Serafimovski, I. Karadjova, T. Stafilov și J. Cvetković, *Microchem. J.*, 2008, **89**, 42-47.
65. T. Frentiu, S. Butaciu, M. Ponta, M. Senila, E. Darvasi, M. Frentiu și D. Petreus, *Food Anal. Methods*, 2015, **8**, 643-648.
66. L. E. Kaercher, F. Goldschmidt, J. N. G. Paniz, É. M. de Moraes Flores și V. L. Dressler, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2005, **60**, 705-710.
67. S. Molaei, S. Seidi, A. Saleh și V. Ghoulipour, *Anal. Methods*, 2017, **9**, 5189-5197.
68. S. Seidi și M. Fotouhi, *Anal. Methods*, 2017, **9**, 803-813.
69. H. Shirkhanloo, A. Khaligh, H. Z. Mousavi și A. Rashidi, *Microchem. J.*, 2017, **130**, 245-254.
70. I. Lavilla, V. Romero, I. Costas și C. Bendicho, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2014, **61**, 1-10.
71. D. Qin, F. Gao, Z. Zhang, L. Zhao, J. Liu, J. Ye, J. Li și F. Zheng, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2013, **88**, 10-14.
72. R. Liu, M. Xu, Z. Shi, J. Zhang, Y. Gao și L. Yang, *Talanta*, 2013, **117**, 371-375.
73. R. Zhang, M. Peng, C. Zheng, K. Xu și X. Hou, *Microchem. J.*, 2016, **127**, 62-67.
74. M. A. Vieira, A. S. Ribeiro, A. J. Curtius și R. E. Sturgeon, *Anal. Bioanal. Chem*, 2007, **388**, 837-847.
75. A. V. Zmozinski, S. Carneado, C. Ibáñez-Palomino, À. Sahuquillo, J. F. López-Sánchez și M. M. da Silva, *Food Control*, 2014, **46**, 351-359.
76. H. Li, Z. Xu, L. Yang și Q. Wang, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2015, **30**, 916-921.
77. M. Kan, S. N. Willie, C. Scriver și R. E. Sturgeon, *Talanta*, 2006, **68**, 1259-1263.
78. C. Scriver, M. Kan, S. Willie, C. Soo și H. Birnboim, *Anal. Bioanal. Chem*, 2005, **381**, 1460-1466.
79. E. Covaci, M. Senila, C. Tanaselia, S. B. Angyus, M. Ponta, E. Darvasi, M. Frentiu și T. Frentiu, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 799-808.

80. T. Frențiu, S. Butaciu, E. Darvasi, M. Ponta, M. Senila, D. Petreus și M. Frențiu, *Anal. Methods*, 2015, **7**, 747-752.
81. T. Frențiu, E. Darvasi, S. Butaciu, S. Cadar, M. Șenilă, A. Mathe, M. Frențiu, D. Petreus, R. Etz, F. Puskas, D. Șulea, Analizor automatizat pentru determinarea simultană a elementelor din microprobe lichide prin spectrometria de emisie optică, număr înregistrare RO131066 B1 30.07.2020.
82. A. Kabata-Pendias, *Trace elements in soils and plants*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, 4th edn., 2011.
83. Y. C. Guangliang Liu, Nelson O'Driscoll, *Environmental chemistry and toxicology of mercury*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2012.
84. Mercury Statistics and Information. United States Geological Survey (USGS), 2020, <https://pubs.usgs.gov/periodicals/mcs2020/mcs2020-mercury.pdf>, (accessed 27.08.2020).
85. E. Garcia-Ordiales, S. Covelli, J. M. Rico, N. Roqueñí, G. Fontolan, G. Flor-Blanco, P. Cienfuegos și J. Loredó, *Chemosphere*, 2018, **198**, 281-289.
86. L. Zhao, G. Qiu, C. W. N. Anderson, B. Meng, D. Wang, L. Shang, H. Yan și X. Feng, *Environ. Pollut.*, 2016, **215**, 1-9.
87. Hydra IIc Mercury Analyzer Brochure, Teledyne Leeman Labs, Hudson, USA, <http://www.teledyneleemanlabs.com/resource/Documents/Hydra%20II%20C%20Brochure.pdf>, (accessed 15.01.2019).
88. H. Xia, X. Liu, K. Huang, Y. Gao, L. Gan, C. He și X. Hou, *Spectrosc. Lett.*, 2010, **43**, 550-554.
89. L. Liu, H. Zheng, C. Yang, L. Xiao, Y. Zhangluo și J. Ma, *Spectrosc. Lett.*, 2014, **47**, 604-610.
90. R. Zhang, B. Shen, C. Li, C. Zheng și X. Hou, *Microchem. J.*, 2016, **129**, 98-103.
91. J. Hu, E. Pagliano, X. Hou, C. Zheng, L. Yang și Z. Mester, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 2447-2454.
92. T. Narukawa și S. Willie, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, **25**, 1145-1148.
93. Proiect de cercetare - Metode analitice eco-scală de determinare și speciere a Hg prin derivatizare UV fotoindusă și detecție cu un sistem spectrometric experimental complet miniaturizat (ECOSPEC), număr proiect PN-III-P2-2.1-PED-2016-0135, număr contract 93PED/2017, <http://www.chem.ubbcluj.ro/~edarvasi/Proiect2012/documente/Romana/Proceduri%2020analitice%2020de%2020determinare%2020si%2020speciere%2020a%2020mercurului.pdf>, (accesat 20.06.2020).
94. E. Covaci, S. B. Angyus, M. Senila, M. Ponta, E. Darvasi, M. Frențiu și T. Frențiu, *Microchem. J.*, 2018, **141**, 155-162.
95. Regulamentul (UE) nr. 836/2011 al Comisiei din 19 august 2011 de modificare a Regulamentului (CE) nr. 333/2007 de stabilire a metodelor de prelevare a probelor și de analiză pentru controlul oficial al nivelurilor de plumb, cadmiu, mercur, staniu anorganic, 2013-MCPD și benzo(a)piren din produsele alimentare, Jurnalul Oficial al Uniunii Europene, 2011, L215/9.
96. M. de la Guardia și S. Garrigues, *Challenges in Green Analytical Chemistry* The Royal Society of Chemistry, Cambridge England, 2nd edn., 2020.
97. J. A. Tickner și M. Becker, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, 2016, **1**, 1-4.
98. E. Covaci și T. Frențiu, *Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Chem.*, 2022, **67**, DOI: 10.24193/subbchem.22022.24191.24101.

Lista de articole publicate în reviste ISI în cadrul programului de doctorat

Nr. Articol		Factor de impact	Factor relativ de influență
1	E. Covaci , M. Șenilă, M. Ponta, E. Darvasi, D. Petreuş, M. Frențiu, T. Frențiu. Methylmercury determination in seafood by photochemical vapor generation capacitively coupled plasma microtorch optical emission spectrometry <i>Talanta</i> , 2017 , 170, 464–472	6,057 (Q1)	1,581
2	E. Covaci , M. Șenilă, M. Ponta, E. Darvasi, M. Frențiu, T. Frențiu. Mercury speciation using non-chromatographic chemical vapor generation capacitively coupled plasma microtorch optical emission spectrometry method – Evaluation of methylmercury exposure <i>Food Control</i> , 2017, 82 , 266–273	5,548 (Q1)	1,889
3	E. Covaci , M. Șenilă, C. Tănăselia, S.B. Angyus, M. Ponta, E. Darvasi, M. Frențiu, T. Frențiu. Highly sensitive eco-scale method for mercury determination in water and food using photochemical vapor generation and miniaturized instrumentation for capacitively coupled plasma microtorch optical emission spectrometry <i>Journal of Analytical Atomic Spectrometry</i> , 2018, 33 , 799–808	4,023 (Q1)	1,572
4	E. Covaci , S.B. Angyus, M. Șenilă, M. Ponta, E. Darvasi, M. Frențiu, T. Frențiu. Eco-scale non-chromatographic method for mercury speciation in fish using formic acid extraction and UV/Vis photochemical vapor generation capacitively coupled plasma microtorch optical emission spectrometry <i>Microchemical Journal</i> , 2018, 141 , 155-162	4,821 (Q1)	1,170
5	E. Covaci , T. Frențiu Greenness and whiteness profiles of UV/Vis photochemical vapor generation capacitively coupled plasma microtorch optical emission spectrometry method for mercury determination and speciation in food and water <i>Studia Universitatis Babeș-Bolyai Chemia</i> , 2022, 67 , DOI: 10.24193/subbchem.2022.1.01 (acceptat spre publicare)	0,447 (Q4)	0,097
Suma Factorilor de impact și a Factorilor relative de influență		20,896	6,309

Lista de articole publicate în volumele unor conferințe internaționale

Nr.	Articol
1	M. Șenilă, E. Covaci, O. Cadar, M. Ponta, M. Frențiu, T. Frențiu. Mercury speciation in fish tissue by thermal decomposition atomic absorption spectrometry: method validation and risk assessment to methylmercury exposure. Proceedings 44th International Conference of the Slovak Society of Chemical Engineering, Demanovska Dolina, 22-26 mai 2017, Pe-We-4, 006.pdf, pp. 520-528
2	E. Covaci, M. Șenilă, E. Darvasi, M. Ponta, M. Frențiu, C. Tănăsolia, T. Frențiu. A non-chromatographic method for the determination of methylmercury in fish fillet using optical emission spectrometry in a capacitively coupled plasma microtorch after UV photo-induced derivatization. Proceedings 44th International Conference of the Slovak Society of Chemical Engineering, Demanovska Dolina, Slovacia, 22-26 mai 2017, Pe-We-4, 007.pdf, pp. 529-536

Lista de comunicări științifice în care au fost diseminate rezultatele tezei de doctorat

Nr. Conferințe	Mod de diseminare
1 E. Covaci, T. Frențiu, M. Șenilă, M. Ponta, E. Darvasi Green analytical methods for mercury determination and speciation using capacitively coupled microplasma optical emission spectrometry. Greenness assessment using the AGREE calculator. Young Researchers International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (YRICCCE III), Cluj-Napoca, România, 4-5 iunie 2021	Prezentare orală
2 E. Covaci, M. Șenilă, M. Ponta, E. Darvasi, M. Frențiu, T. Frențiu. Specierea eco-scală a Hg ²⁺ și CH ₃ Hg ⁺ prin spectrometria de emisie optică în microplasma cuplată capacitiv și generarea vaporilor reci prin derivatizare fotoindusă UV/Vis (UV-Vis-PVG-μCCP-OES) Conferința Națională a Școlilor Doctorale din Consorțiul Universitaria, ediția a II-a, Timișoara, România, 11-14 noiembrie 2019	Prezentare orală

- 3 E. Covaci** **Prezentare**
Determination and speciation of Hg in seafood using eco-scale methods: **orală**
principle of the methods and dedicated miniaturized spectral
instrumentation.
A XXIII-a Conferință Internațională de Chimie, Deva, România, octombrie
2017
- 4 T. Frențiu, E. Covaci, E. Darvasi, M. Ponta.** **Poster**
Total mercury determination in water using on-line UV photochemical vapor
generation capacitively coupled plasma microtorch optical emission
spectrometry
The 45th International Conference of the Slovak Society of Chemical
Engineering, Tatranske Matliare, Slovacia, 21-25 mai **2018**
- 5 E. Darvasi, E. Covaci, M. Șenilă, M. Ponta, L.D. Pop, M. Frențiu, T. Frențiu.** **Poster**
Determination of total Hg in fish using photo-induced cold vapor generation
capacitively coupled plasma microtorch optical emission spectrometry.
Comparison to classical approaches.
A XXIII-a Conferință Internațională de Chimie, Deva, România, octombrie
2017
- 6 E. Covaci, E. Darvasi, M. Șenilă, M. Ponta, I. Băbuțan, M. Frențiu, T. Frențiu.** **Poster**
Evaluation of human risk exposure to methylmercury via fish consumption.
A XXIII-a Conferință Internațională de Chimie, Deva, România, octombrie
2017
- 7 E. Covaci, M. Șenilă, E. Darvasi, M. Ponta, M. Frențiu, C. Tănăsolia, T. Frențiu.** **Poster**
A non-chromatographic method for the determination of methylmercury in
fish fillet using optical emission spectrometry in a capacitively coupled
plasma microtorch after UV photo-induced derivatization
The 44th International Conference of the Slovak Society of Chemical
Engineering, Demanovska Dolina, Slovacia, 22-26 mai **2017**
- 8 M. Șenilă, E. Covaci, O. Cadar, M. Frențiu, T. Frențiu.** **Poster**
Mercury speciation in fish tissue by thermal decomposition atomic
absorption spectrometry: method validation and risk assessment to
methylmercury exposure
The 44th International Conference of the Slovak Society of Chemical
Engineering, Demanovska Dolina, Slovacia, 22-26 mai **2017**
-

Alte articole publicate în perioada programului de doctorat, care nu au fost invocate în prezenta teză de doctorat

Nr. Articol	Factor de impact	Factor relativ de influență
1 M. Șenilă, E. Covaci , O. Cadar, M. Ponta, M. Frențiu, T. Frențiu. Mercury speciation in fish tissue by eco-scale thermal (Q3) decomposition atomic absorption spectrometry: method validation and risk exposure to methylmercury <i>Chemical Papers</i> , 2018 , 72, 441–448	2,097	0,460