

ANALÝZA KATIONTOVÝCH SPECIÍ ARSENU V POTRAVINÁCH MOŘSKÉHO PŮVODU

ANTONÍN KAŇA, ZUZANA KLIMŠOVÁ, LUCIE SEDLECKÁ a OTO MESTEK

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

Došlo 22.11.17, přijato 1.2.18.

Klíčová slova: arsen, speciace, potraviny, HPLC-ICP-MS

Obsah

1. Úvod
2. Kationtové specie
3. Stabilita specií
4. Příprava vzorků
5. Stanovení specií
5.1. HPLC-ICP-MS
6. Závěr

1. Úvod

Arsen se dostává do lidské stravy prostřednictvím potravin rostlinného i živočišného původu. Významný zdroj arsenu ve stravě jsou pak potraviny mořského původu: ryby, řasy, mlži, atd. Zjištění, že arsen se v mořských organismech nachází ve velkých množstvích, avšak akutní otravy arsenem po požití mořských plodů jsou pozorovány jen vzácně, vedlo již před mnoha lety k uvědomění si důležitosti speciální analýzy arsenu¹. Z toxikologického hlediska hraje totiž významnou roli to, v jaké chemické formě (neboli specii) je arsen vázán². V mořských živočiších se obsah As v sušině pohybuje až okolo stovek $\mu\text{g g}^{-1}$ a z převážné části je vázán ve formě netoxického arsenobetainu (AB). V mořských řasách se obsah As v sušině pohybuje v množství až desítek $\mu\text{g g}^{-1}$ a je přítomen především ve formě netoxických arsenocukrů^{3,4}. Existují však i výjimky, např. u řasy *Hijiki* bylo nalezeno až $60 \mu\text{g g}^{-1}$ As ve formě toxických anorganických specií. V současnosti je už v tkáních mořských živočichů identifikováno několik desítek minoritních specií arsenu, jejichž toxicita je neznámá⁵. Nejtoxičtějším aniontovým speciím (arseničnany, arsenitany, dimethylarseničnany a monomethylarseničnany), které představují významné zdravotní riziko při nadměrné konzumaci, bylo již věnováno mnoho publikací^{6–8}. Kationtové specie, z nichž některé vykazují

také nezanedbatelnou toxicitu a možné karcinogenní účinky, jsou však v literatuře často opomíjeny. Pokud bude v budoucnu karcinogenita těchto specií prokázána, bude stanovení kationtových specií tvořit důležitou součást analýzy potravin obsahujících vyšší množství As.

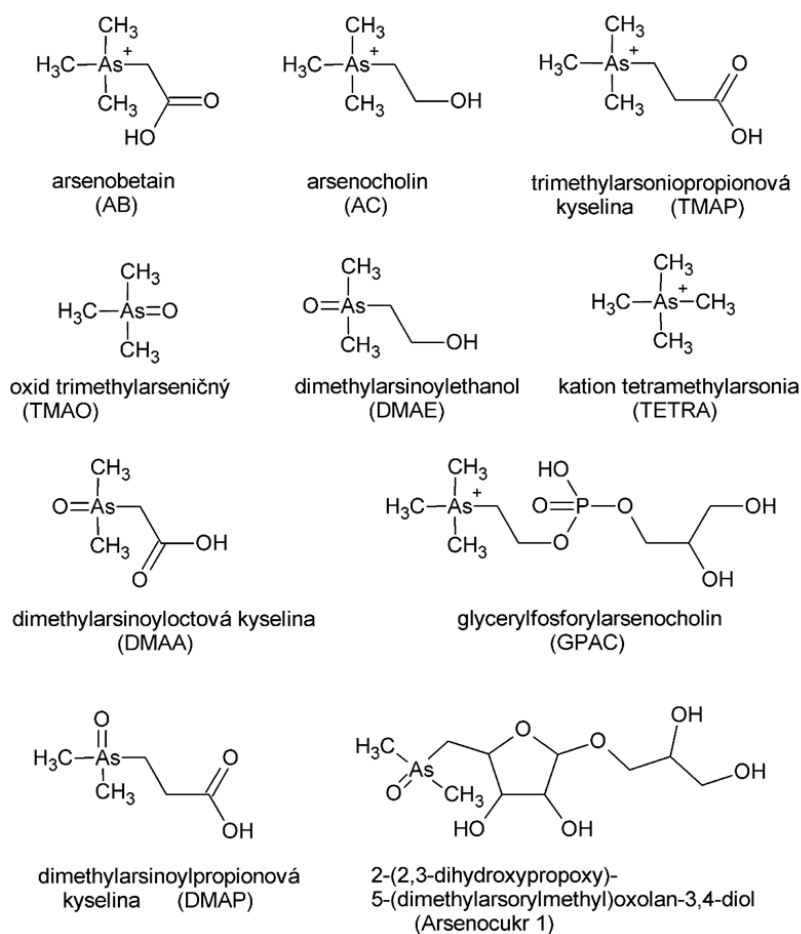
2. Kationtové specie

Do skupiny kationtových specií se zařazují sloučeniny As nesoucí kladný náboj, ale i amfionty a látky za běžných podmínek elektroneutrální, které však za specifických podmínek kladný náboj mohou nést. Nejvýznamnějším zástupcem kationtových specií (obr. 1) arsenu je arsenobetain (AB), který se v těle vyšších mořských živočichů akumuluje preferenčně³. AB mořští živočichové přijímají potravou, v níž se AB vyskytuje jako metabolický produkt odbourávání sloučenin arsenu z nižších trofických úrovní (mikrobiální rozklad arsenocukrů na AB)⁹ nebo jako produkt reakce dimethylarsenitanu s glyoxylátem¹⁰, jelikož vyšší organismy nejsou syntézy této specie schopny¹¹. Vysoká koncentrace AB v mořských živočiších v porovnání se sladkovodními je způsobena chemickou podobností mezi AB a (glycin)betainem, pro mořské organismy důležitým osmolytem¹². S vyšším množstvím (glycin)betainu, který je organismu dostupný, klesá jeho schopnost akumulovat AB, což naznačuje kompetitivní mechanismus^{13,14}.

Strukturně podobná k AB je minoritní specie trimethylarsoniopropionová kyselina (TMAP), již je strukturně podobný i arsenocholin (AC). AC je prekurzorem AB, na který se AC rychle biotransformuje¹⁵, avšak díky podobnosti s cholinem se také inkorporuje do fosfolipidů membrán buněk, kde se zadržuje¹⁶. AC a TMAP byl nalezeny např. v rybě *Odax cyanomelas* nebo měkkýši *Haliotis rubra* v množství 0,03–0,12 resp. 0,03–0,40 $\mu\text{g g}^{-1}$ As v sušině¹⁷.

Významnou skupinu specií arsenu v mořských řasách tvoří arsenocukry, z nichž lze mezi kationtové specie zařadit 2-(2,3-dihydroxypropoxy)-5-(dimethylarsorylmethyl)oxolan-3,4-diol, nazývaný též zkráceně arsenocukr 1 (AsCukr1).¹⁸ Arsenocukry jsou pravděpodobně produktem biotransformace anorganických forem arsenu, které řasy přijímají z mořské vody¹⁹. Leffers a spol.²⁰ pak poukazují na možnou toxicitu uvedeného arsenocukru, jejíž potvrzení však vyžaduje další studie.

Dalšími kationtovými speciemi jsou např. oxid trimethylarseničný (TMAO), kation tetramethylarsonia (TETRA), dimethylarsinoyloctová kyselina (DMAA), dimethylarsinoylpropionová kyselina (DMAP), dimethylarsinoylethanol (DMAE) či glycerylfosforylarsonocholin (GPAC).



Obr. 1. Kationtové specie arsenu

TMAO u ryb je produktem metabolismu anorganických sloučenin arsenu (arsenitany, arseničnany), za anaerobních podmínek vzniká také ve střevních bakteriích mořských měkkýšů z AB, což představuje alternativní cestu tvorby TMAO²¹. TETRA je hlavním produktem metabolismu As u drobných kroužkoců žijících na mořském dně²². Odtud se dostává dále do potravního řetězce a v některých druzích měkkýšů, žijících se potravou z mořského dna, může být i majoritní specíí²³. TMAO a TETRA vykazují určitý karcinogenní potenciál. TMAO zvyšuje přítomnost markerů oxidativního stresu v jaterních buňkách a také snižuje hladinu enzymu glutathionu, který jaterní buňky před oxidativním stresem chrání^{24–26}. Byla pozorována také tvorba papylomů a karcinomu v parenchymu močového měchýře v důsledku působení TMAO²⁷. Uvedené studie tak TMAO ukazují jako možný promotor vzniku rakoviny, jsou však nutné další studie pro zařazení mezi prokázané karcinogeny²⁸. TETRA pravděpodobně indukuje poškození DNA²⁹. Kvůli pravděpodobnému vlivu těchto specíí As na vznik rakoviny jsou jejich zdroje a denní příjem důležitou informací doplňující hod-

nocení rizik spojených s konzumací mořských plodů vyplývajících zejména z obsahu toxických anorganických specíí As a jejich methylovaných forem³⁰.

Kromě již zmíněných specíí byly ve vzorcích mořských řas, koryšů, mlžů a ryb, nalezeny také DMAA, DMAE a DMAP v množství řádově $\mu\text{g g}^{-1}$ As (cit.³¹). Specie DMAA a DMAE byly identifikovány jako kandidáti na meziproducty při biosyntéze AB v řase *Fucus distichus*¹⁵. GPAC byl poprvé nalezen v sasance *Anemonia sulcata*³².

3. Stabilita specíí

Experimenty prováděné na modelových roztocích ukazují, že specie TETRA, TMAO a AC jsou na rozdíl od AB termálně stabilní. AB vykazuje stabilitu pouze do 150 °C, při vyšších teplotách se rozkládá na TMAO a TETRA. Výsledky modelových pokusů ukazují, že teplotní přeměna nastává na základě dvou kompetitivních reakcí, ve kterých AB figuruje jako substrát pro obě: proces dekarboxylace generující TETRA, anebo oxidace vaz-

by As-CH₂ vedoucí ke vzniku TMAO (cit.³³). Tyto informace potvrzuje i studie Garcia-Salgada a spol.³⁴, která prokazuje stabilitu specií AB, AC, TETRA a TMAO během extrakce (trojnásobná extrakce vodou při 90 °C po dobu 5 min) i během skladování vodného extraktu po dobu 24 hodin. Foster a spol.³⁵ pak potvrdili stabilitu TMAO, DMAE, TMAP, AB, AC a TETRA během extrakce 2% HNO₃ po dobu 6 min při 95 °C.

K poněkud odlišným výsledkům dospěly studie stability při uchovávání vzorků při nízkých teplotách. Že dochází k přeměně AB na TMAO při skladování zmrazených mořských ryb naznačují Norin a spol.³⁶ již v roce 1985, ačkoliv neposkytují přímý důkaz. K podobnému zjištění dospěli Veléz a spol.³⁷, kteří ve vzorcích čerstvých mořských ryb našli podíl AB na celkovém obsahu As 81–94 % (86±9 %), zatímco ve zmrazených rybách pouze 31–82 % (49±23 %). V případě mlže Slávky jedlé byl ve zmrazených vzorcích v porovnání s čerstvými pozorován pokles obsahu TMAO a AC, avšak zvýšený obsah dimethylarseničnanu³⁸. Jedním z vysvětlení může být působení mikroorganismů přítomných v mořských sedimentech³⁹, mořské vodě⁴⁰, mořských řasách⁴¹ nebo tkáních mořských živočichů^{42,43}, které jsou schopny přeměny AB na TMAO a následně TMAO na dimethylarseničnan, případně až arseničnan.

Podrobněji se tímto jevem zabývali Devesa a spol.⁴⁴, avšak pouze při teplotách odpovídajících chlazení (8 °C), nikoliv zmrazení. Důvodem přeměny uvedených specií během skladování tak není primárně teplota, ale přítomnost mikrobů. Teplota skladování pak zřejmě pouze určuje rychlost přeměny.

Stabilita arsenocukru 1 byla testována na suchém vzorku řasy *Hijiki*, v něm byla tato specie stabilní nejméně po dobu jednoho roku při skladování při teplotě 20 °C, a ve vodném extraktu této řasy, v němž byl arsenocukr 1 stabilní po dobu nejméně 15 dnů při teplotě –18 °C i 4 °C (cit.⁴⁵).

4. Příprava vzorků

Kvantitativní a reprodukovatelná extrakce specií As je zatím nejslabším článkem sekvence analytických operací⁴⁶. Při výběru extrakčního činidla je třeba se pozastavit nad aplikací pro konkrétní typ vzorku. Extrakční účinnosti se liší v závislosti na použitém extrakčním systému, extrakčním činidlo a typu vzorku. Nejenže se mezi sebou velmi liší jednotlivé typy potravin, ale i vlastní specie nemají stejné vlastnosti. Část tvoří polární kationtové a aniontové specie, další částí jsou arsenolipidy extrahovatelné organickými rozpouštědly a nakonec také As vázaný na proteiny. Je tak zřejmé, že neexistuje vhodný postup pro současnou extrakci všech typů specií.

Běžně se k extrakci kationtových specií používá voda nebo její směs s methanolem. Ač jsou kationtové specie velmi dobře rozpustné ve vodě, voda samotná v případě tkání s vyšším obsahem lipidů nedokáže efektivně proniknout do vzorku, proto je vyšších extrakčních účinností

dosahováno ve směsi s methanolem⁴⁷. Zajímavé pozorování učinili navíc Whaley-Martin a spol.⁴⁸, kteří doložili na příkladu analýzy plžů z oblasti vysoce kontaminované anorganickým As, že ač vodou se podařilo dosáhnout nejvyšší celkové účinnosti v prvním kroku extrakce, na rozdíl od směsi methanol-voda nebyla schopna vyextrahovat TETRA. Kdyby hledání optimální extrakční metody zohledňovalo pouze nejvyšší celkovou účinnost, nebyly by správně identifikovány všechny specie přítomné ve vzorku. Na vzorcích mušlí byla testována účinnost extrakce různými extrakčními činidly: chloroform-methanol (1 : 1), voda-methanol (1 : 1) nebo methanol⁴⁹. V případě chloroformu s methanolem bylo dosaženo nejnižší extrakční účinnosti a významná část As zůstala v chloroformové fázi. Směs vody a methanolu v porovnání s methanolem samotným dosahovala podobných výsledků (cca 80 %). Nakonec byla zvolena směs methanolu s vodou, jelikož zbytek po odpaření byl kompletně ve vodě rozpustný. Extrakcí hydroxidem tetramethylamonným bylo sice dosaženo vysokých výtěžků (95 %), ale při následné analýze extraktu kapalinovou chromatografií byly pozorovány nevratné změny stacionární fáze kolony způsobující posun retenčních časů analytů⁵⁰.

Zvýšení extrakční účinnosti může pomoci předběžné odtučnění¹¹. Vysoký obsah lipidů může nejen snižovat účinnost extrakce, matrice vzorku může zhoršit separaci a v extrémním případě poškodit chromatografickou kolonu^{49,51}. K odstranění lipidického podílu je možné použít fázové dělení pomocí diethyletheru, chloroformu nebo acetonu^{52,53}. Vysokých extrakčních účinností je dosaženo právě pečlivou přípravou vzorku (tedy jemné mletí a přečištění acetonem)¹⁷. Z obavy o selektivní ztrátu či zakoncentrování některých specií bývá tendence se přečišťování vzorku před samotnou analýzou spíše vyhýbat⁴⁷. Např. diethylether uvolnil ze vzorku tkáň kraba 10–17 % celkového As a otázkou zůstává, zda se jedná pouze o arsenolipidy, či zda mohlo dojít k určitým ztrátám specií, které jsou předmětem zájmu¹¹. Zakoncentrování konkrétních specií může být ale i užitečné a bylo úspěšně použito pro analýzu toxických metabolitů As v moči, které by v jiném případě zůstávaly pod limitem detekce⁴⁷.

Francesconi a spol. upozorňují na zbytečnost mnohonásobných extrakcí, jedná se údajně pouze o „carry-over effect“, kdy se zbytek prvního podílu extrakčního činidla pouze promíchá s druhým podílem a může budít dojem dodatečné extrakce⁵⁴. Příkladem tohoto vlivu je publikace⁴⁹ demonstrující efekt opakované extrakce a doby sonikace. Působení ultrazvuku delší než 20 min významně nepřispělo ke zvýšení extrakční účinnosti, oproti tomu extrakční účinnost trojnásobné extrakce (80 %) v porovnání s jednonásobnou (60 %) v případě aplikace směsi methanol-voda (1 : 1) na tkáň slávek jedlých byla vyšší.

Mezi extrakčními metodami, k nimž se řadí třepání⁵⁵, sonikace²¹, extrakce subkritickou kapalinou, Soxhletova extrakce⁵¹ či mikrovlnně asistovaná extrakce (MAE)^{46,56}, je poslední zmiňovaná vyzdvihována pro vysokou účinnost, časovou nenáročnost a šetrnost vůči speciím^{47,53}.

Pomocí MAE bylo možné s vysokým výtěžkem vyextrahovat arsen z tkání ryb pomocí směsi methanol-voda (8 : 2) či tkání plžů pomocí 2% HNO₃ (cit.^{35,50}) a také z hepatopankreatu humra pomocí 2% HNO₃ s i bez přidavku 3% H₂O₂, 0,06 mol l⁻¹ HCl s 3% H₂O₂ nebo 50% methanolu⁵⁷. Obecně se také vysoké účinnosti extrakce dosahuje nejnázve u svaloviny ryb, kde je As přítomný v některých případech i prakticky ze 100 % ve formě dobře rozpustného AB. U měkkýšů nebo např. žraločích jater se již vodou extrahovatelný podíl pohybuje pouze okolo 60 resp. 40 % (cit.¹¹).

Kvantitativní extrakce u reálných vzorků nebývá často tak snadné dosáhnout jako v případě certifikovaných referenčních materiálů, které jsou většinou zbaveny tuků, opakovaně lyofilizovány a mlety, čímž jsou buněčné membrány velmi dobře rozrušeny a již nebrání průniku extrakčního činidla⁵⁸.

5. Stanovení specií

Vzhledem k specifickým nárokům pro konkrétní analýzy nacházejí uplatnění různé separační metody. Kapilární elektroforéza zajišťuje dobrou separační účinnost, ale dávkování malých objemů vzorků zvyšující výsledné limity detekce a obtížnost spojení s prvkově selektivními detektory jsou důvodem upřednostňování jiných metod⁵⁹. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a plynová chromatografie (GC) nachází své uplatnění mnohem častěji. Jelikož většina specií As se nachází v netěkavé formě, GC navíc oproti HPLC vyžaduje derivatizační krok, který zatím není ve všech případech realizovatelný, v čemž HPLC skýtá oproti GC výhodu. Uplatnění GC se tak nachází např. v kombinaci s generováním hydridů, které poskytuje nízké detekční limity díky eliminaci vlivu matrice a zakoncentrování vzorku, kationtové specíe však těkavé hydridy tvoří omezeně⁶⁰.

V analýze kationtových specií je nejvýhodnější HPLC nabízející několik separačních módů, zejména iontově-párovou a iontově-výměnnou chromatografii. Iontově-párová chromatografie pracuje s využitím reverzní stacionární fáze a přidavkem vhodného iontově-párového činidla do mobilní fáze. Tento typ chromatografie je však náchylný k matricovým efektům a je citlivý na změny pH mobilní fáze. Obecně je tak tendence přiklonit se ke kationtově-výměnné chromatografii, která je mnohem méně citlivá k nežádoucím matričním vlivům^{52,59}.

Ze struktur kationtových specií (obr. 1) je patrné, že jako kationty se často chovají pouze za určitých podmínek. AB má kladný náboj při pH < 2,18, při vyšším pH se stává amfiontem. AC a TETRA nesou kladný náboj nezávisle na pH mobilní fáze, z čehož vyplývá, že vzájemné separace těchto specií může být dosaženo pouze vlivem neiontových interakcí s materiálem kolony (hydrofobních, sterických, atp.)⁶¹. Specie jako např. TMAO obsahující As=O skupinu mohou tvořit vodíkovou vazbu s molekulou vody, kdy na As vzniká parciální kladný náboj. TMAO tak s vodou tvoří trimethyldihydroxyarsan (CH₃)₃As(OH)₂,

který může být v roztoku v neutrální podobě nebo jako trimethylhydroxyarsonium hydroxid [(CH₃)₃AsOH]⁺OH⁻ (cit.⁶²).

Detekce a kvantitativní stanovení specií As je realizováno prvkově selektivními detektory. Atomová absorpční a fluorescenční spektrometrie (AAS, AFS) jsou finančně nenáročnými detekčními technikami kompatibilními s GC i HPLC. AAS a AFS je aplikovatelná na reálné vzorky spíše v kombinaci s metodou generování hydridů (HG), která v případě AFS eliminuje rušivé vlivy rozptylu světla a matrice a stejně jako u AAS se výrazně sníží detekční limity. HG-AFS se pak co do citlivosti vyrovná i mnohem finančně nákladnějším hmotnostnímu spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), ovšem za cenu omezené aplikace pouze na hydridotvorné specíe. Toto omezení lze překonat přidáním online mineralizačního kroku mezi HPLC a generátor hydridů, čímž se eluované specíe převedou na specíe hydridotvorné⁶³. ICP-MS je robustní a citlivou detekční technikou kombinovatelnou jak s GC, tak HPLC. V porovnání s jinými technikami je v HPLC-ICP-MS vliv matrice podstatně snížen, a co do univerzálnosti použití je v kvantitativní analýze specií As zatím nepřekonanou metodou. Ke kvalitativnímu vyhodnocení je možno použít srovnání retenčních času specií se standardy (jsou-li k dispozici) nebo doplněním informace s použitím hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI-MS). ESI-MS je zatíženo velkými matricovými vlivy, a proto samo o sobě ke kvantifikaci není vhodné, avšak v kombinaci s ICP-MS bývá stále častěji používáno pro potvrzení identity specií As a k poskytnutí strukturní informace k identifikaci nových specií^{47,59}.

5.1. HPLC-ICP-MS

I přes nesporné výhody HPLC-ICP-MS se tato technika potýká s výzvami, kterým je třeba věnovat pozornost. Limitací mohou být spektrální a nespektrální interference⁶⁴. Spektrální interference rušící stanovení arsenu tvoří polyatomické ionty (cit.⁴⁰) Ar³⁵Cl⁺. Novější generace ICP-MS přístrojů bývají již vybaveny reakční/kolizní celou, umožňující snadné odstranění těchto interferencí s použitím kolizních (He)^{65,66} nebo reakčních plynů (O₂, NH₃, CH₃F)^{67,68}. Při použití reakční/kolizní cely dochází sice ke snížení citlivosti stanovení, ale ve své podstatě jde o velice snadné a efektivní řešení⁶⁹.

Eliminace nespektrálních interferencí v současnosti představuje větší výzvu. Hlavní nespektrální interference se projevují v plazmatu vlivem matrice vzorku a jsou způsobeny prvky, které mají výrazně vyšší nebo nižší ionizační potenciál než arsen. Tyto prvky s výrazně odlišnými ionizačními potenciály ovlivňují ionizaci As a oba efekty působí navzájem proti sobě. Prvky s velmi nízkým ionizačním potenciálem, mezi něž patří převážně alkalické kovy a kovy alkalických zemin, se v plazmatu ionizují přednostně a potlačují tak ionizaci arsenu, čímž snižují citlivost stanovení i domnělou koncentraci As ve vzorku. Jako jedno z řešení se nabízí naředění vzorku, tato alternativa však není vhodná zejména při stanovení stopových

Tabulka I
Souhrn údajů o kationtově-výměnné chromatografii specií arsenu v potravinách mořského původu

Analyzované kationtové specie	Vzorky	Extrakční čimadlo	Mobilní fáze	Průtok mob. fáze	Kolona (teplota)	Lit.
AB, AC, TMAO, TETRA	kreveta, krab, ryba, humr, koryši	CHCl ₃ : CH ₃ OH : H ₂ O	20 mmol l ⁻¹ pyridin, pH 2,65 (HCOOH)	1 ml min ⁻¹	Ionosphere-C	82
AB, AsCuKrl	ústřice, mušle, řasy, krabi	CH ₃ OH : H ₂ O (1 : 1)	5 mmol l ⁻¹ pyridin, pH 2,0 (HNO ₃)	1 ml min ⁻¹	Ionpac CS-10	83
AB, AC, TMAO, TETRA, AsCuKrl	ústřice	CH ₃ OH : H ₂ O (9 : 1)	20 mmol l ⁻¹ pyridin, pH 2,5 (HCOOH)	1,5 ml min ⁻¹	Supelcosil LC-SCX	84
AB, TMAO, TETRA, AsCuKrl	jedlí šneci	CH ₃ OH : H ₂ O (1 : 1) a 2% HNO ₃	20 mmol l ⁻¹ pyridin, pH 2,7 (HCOOH)	1 ml min ⁻¹	Hamilton PRP-X200	85
AB, AC, TMAO	ryby, mušle	0,2% HNO ₃ s 1% H ₂ O ₂	20 mmol l ⁻¹ pyridin, pH 2,6 (HCOOH)	1,5 ml min ⁻¹	Zorbax 300-SCX	86
AB	ryby	H ₂ O	10 mmol l ⁻¹ pyridin v 5% (v/v) CH ₃ OH, pH 2,05	1,5 ml min ⁻¹	Spheris S5 SCX	87
AB, TETRA, TMAO, AC, sasanka GPAC		CH ₃ OH : H ₂ O (1 : 1)	20 mmol l ⁻¹ pyridin, pH 2,5 (HCOOH)	1 ml min ⁻¹	Supelcosil LC-SCX	88
DMAA, AB, TMAO, TMAP, AC, TETRA	mušle a krunýřovky	CH ₃ OH : H ₂ O (1 : 1)	gradientová eluce, pyridin v 3% CH ₃ OH, pH 2,7 (HCOOH)	1 ml min ⁻¹	Chrompack IonoSpher-5C	89
AB, AC, TMAO, TMAP	rybí omáčka	CH ₃ OH : H ₂ O (1 : 1)	10 mmol l ⁻¹ pyridin, pH 2,3 (HCOOH)	1,5 ml min ⁻¹	Zorbax 300-SCX (30 °C)	90
AB, AC, TETRA, TMAP, AsCuKrl	ryby, mlži, řasy, ostnokožci	CH ₃ OH : H ₂ O (1 : 1)	20 mmol l ⁻¹ pyridin, pH 2,2 (HCOOH)	1,5 ml min ⁻¹	Supelcosil LC-SCX (40 °C)	17
AB, AC, TMAO, TETRA, AsCuKrl	mušle	CH ₃ OH : H ₂ O (1 : 1) a 2% HNO ₃	20 mmol l ⁻¹ pyridin, pH 2,7 (HCOOH)	1 ml min ⁻¹	Hamilton PRP-X200	91
AB, AC, TMAO, TETRA, AsCuKrl	řasy	H ₂ O	2,5 mmol l ⁻¹ pyridin, pH 2,65 (HCl)	1 ml min ⁻¹	Hamilton PRP-X200	34
AB, AC, TMAO, TETRA, DMAE, TMAP, AsCuKrl	mořské rostliny a organismy	CH ₃ OH : H ₂ O (1 : 1) a 2% HNO ₃	20 mmol l ⁻¹ pyridin, pH 2,6 (HCOOH)	1,5 ml min ⁻¹	Supelcosil LC-SCX (40 °C)	35
AB, AC, TMAO, TETRA	ústřice, ryby, krevety, řasy	CH ₃ OH : H ₂ O (1 : 1)	gradientová eluce: 0,4 mmol l ⁻¹ HNO ₃ (pH 3,3) a 50 mmol l ⁻¹ HNO ₃ (pH 1,3)	1,2 ml min ⁻¹	IonPak AS4A	92

koncentrací⁷⁰. Opačným efektem působí na ionizaci arse-
nu těžce ionizovatelné prvky, k nimž patří např. uhlík, ale
i fosfor nebo síra, které zvyšují citlivost stanovení přeno-
sem náboje na atomy arsenu⁷¹. Tento efekt má u vzorků
s vysokým podílem sloučenin uhlíku nebo u vzorků extra-
hovaných organickými činidly za následek domnělou vyšší
koncentraci arsenu⁷². Problém pak nastává také u gradien-
tových elucí, při nichž se v průběhu analýzy mění složení
mobilní fáze, např. obsah methanolu⁷³, a s tím i citlivost
stanovení.

Nespektrální interference v ICP-MS tvoří nezanedba-
telný faktor ovlivňující kvantitativní stanovení, zejména
v kombinaci s HPLC, kde úroveň uvedených interferencí
není v průběhu celé analýzy nutně konstantní a mění se
v závislosti na aktuálním eluovaném množství interferentu.
Obecně je možno nespektrální interference eliminovat
např. metodou standardního přídatku, nutné jsou však
standarty specií, jejichž dostupnost je v případě kationto-
vých specií omezená⁶⁴. Dále je možné nespektrální interfe-
rence korigovat matematicky⁷⁴ nebo prostřednictvím vhod-
ného vnitřního standardu (IS). Přidávání IS se nejčastěji
realizuje prostřednictvím T-kusu umístěného za kolonou,
aby nedocházelo k interakci IS se stacionární fází ko-
lony^{75,76}. Při tomto způsobu přídatku však bylo
v některých případech pozorováno nežádoucí nařazení
eluentu doprovázené chvostováním píků, způsobené prav-
děpodobně velkým vnitřním objemem T-kusu⁷⁷. Toto lze
vyřešit použitím T-kusu s malým vnitřním objemem, jak
popisují Chen a spol.⁷⁸, kteří pro analýzu specií arsenu
v moči mísili výstup z kolony s vnitřním standardem ¹²⁸Te
(20 µg l⁻¹) prostřednictvím T-kusu s nulovým mrtvým
objemem. Další možností potlačení nežádoucích jevů spo-
jených s mísením eluentu a IS je spojení toků těsně před
zmlžovačem. Takto bylo použito ⁷²Ge (5 µg l⁻¹) jako vnitř-
ní standard pro speciaci As v mořských plodech⁷⁹.
V literatuře se můžeme setkat také s použitím vnitřního
standardu ¹⁰³Rh (10 µg l⁻¹) při analýze mořských ryb,
mušlí, ústřic a řas⁸⁰.

Poslední možností je přidavek IS přímo do mobilní
fáze, čímž je také možno eliminovat interference
v průběhu celé analýzy bez nežádoucí deformace píků.
V tomto případě je však nutné zajistit, aby IS neinterago-
val se stacionární fází a s analyty. Často se v kationtově-
výměnné chromatografii můžeme setkat s použitím kation-
tu trimethylselenonia jako IS, který je ovšem separován
spolu s analyty a slouží tak pouze kvalitativně ke korekci
retenčních časů eluovaných specií, avšak neumožňuje eli-
minaci nespektrálních interferencí⁸¹.

Kationtově-výměnná chromatografie byla pro analýzu
kationtových specií As použita v řadě studií. Z tab. I je
patrné, že v naprosté většině analýz je jako mobilní fáze
použit pyridin o koncentraci 2,5–20 mmol l⁻¹ o pH
2,0–2,7. pH je pak nejčastěji upravováno kyselinou mra-
venčí. V případě vyšších průtoků mobilní fáze (> 1 ml min⁻¹)
dochází ke zkrácení retenčních časů, ale je zpravidla nutné
použít vyšší teplotu kolony (30–40 °C). Uvedené chroma-
tografické postupy pak byly použity ve spojení s různými
prvkově selektivními detektory.

6. Závěr

Z dosavadních literárních zdrojů vyplývá, že je zatím
nutné pro každý typ vzorku a také pro jednotlivé specie
hledat specifické extrakční postupy, avšak začínají se ob-
jevovat metody extrakce, které mají potenciál dosáhnout
určení celkového obrazu specií přítomných ve vzorcích.
Pro extrakci kationtových specií arsenu ze vzorků potravin
mořského původu se osvědčila zejména směs metha-
nol:voda. Kationtové specie jsou separovány téměř vý-
hradně kationtově-výměnnou kapalinovou chromatografií,
při níž je nejčastěji jako mobilní fáze použit pyridin o kon-
centraci 20 mmol l⁻¹ okyselený na pH 2,0–2,7 kyselinou
mravenčí. Pro detekci a kvantitativní stanovení jednotli-
vých specií jsou používány prvkově selektivní metody
jako AAS, AFS nebo nejčastěji ICP-MS, které mohou být
doplňeny měkkými ionizačními technikami jako ESI-MS
pro identifikaci neznámých specií.

*Vznik práce byl podpořen Operačním programem
Praha – konkurenceschopnost (CZ.2.16/3.1.00/24501)
a Národním programem udržitelnosti (NPU I LO1613)
MSMT-43760/2015.*

LITERATURA

1. Chapman A. C.: *Analyst* 51, 548 (1926).
2. Francesconi K. A., Sperling M.: *Analyst* 130, 998 (2005).
3. Neff J. M.: *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 917 (1997).
4. Niege, C., Matysik F. M.: *Anal. Chim. Acta* 65, 83 (2010).
5. Nischwitz V., Pergantis S. A.: *J. Anal. At. Spectrom.* 21, 1277 (2006).
6. Lynch H. N., Greenberg G. I., Pollock M. C., Lewis A. S.: *Sci. Total Environ.* 496, 299 (2014).
7. Sadee B., Foulkes M. E., Hill S. J.: *J. Anal. At. Spectrom.* 30, 102 (2015).
8. Maher W. A., Ellwood M. J., Krikowa F., Raber G., Foster S.: *J. Anal. At. Spectrom.* 30, 2129 (2015).
9. Edmonds J., Francesconi K.: *Appl. Organomet. Chem.* 2, 297 (1988).
10. Caumette G., Koch I., Reimer K. J.: *J. Environ. Monit.* 14, 2841 (2012).
11. Cullen W. R., Reimer K. J.: *Chem. Rev.* 89, 713 (1989).
12. Clowes L. A., Francesconi K. A.: *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 137, 35 (2004).
13. Gailer J., Francesconi K. A., Edmonds J. S., Irgolic K. J.: *Appl. Organomet. Chem.* 9, 341 (1995).
14. Stiboller M., Raber G., Francesconi K. A.: *Microchem. J.* 122, 172 (2015).
15. Ojo A. A., Onasanya A.: *ISRN Spectrosc.* 2013, 1 (2013).
16. Vahter M.: *Appl. Organomet. Chem.* 8, 175 (1994).
17. Kirby J., Maher W., Spooner D.: *Environ. Sci. Technol.* 39, 5999 (2005).
18. Šlejkovec Z., Kápolna E., Ipolyi I., van Elteren J. T.:

- Chemosphere 63, 1098 (2006).
19. Molin M., Ulven S. M., Meltzer H. M., Alexander J.: *J. Trace Elem. Med. Biol.* 31, 249 (2015).
 20. Leffers L., Ebert F., Taleshi M. S., Francesconi K. A., Schwerdtle T.: *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 1270 (2013).
 21. Larsen E. H., Pritzl G., Hansen S. H.: *J. Anal. At. Spectrom.* 8, 1075 (1993).
 22. Geiszinger A. E., Goessler W., Francesconi K. A.: *Environ. Sci. Technol.* 36, 2905 (2002).
 23. Flora S. J. S.: *Handbook of arsenic toxicology*. Academic Press, New York 2014.
 24. Li C.-S., Wu K.-Y., Chang-Chien G.-P., Chou C.-C.: *Environ. Sci. Technol.* 39, 2455 (2005).
 25. Shen J., Wanibuchi H., Salim E. I., Wei M., Kinoshita A., Yoshida K., Endo G., Fukushima S.: *Carcinogenesis* 24, 1827 (2003).
 26. Oya-Ohta Y., Kaise T., Ochi T.: *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 357, 123 (1996).
 27. Wanibuchi H., Salim E. I., Kinoshita A., Shen J., Wei M., Morimura K., Yoshida K., Kuroda K., Endo G., Fukushima S.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 366 (2004).
 28. Nishikawa T., Wanibuchi H., Ogawa M., Kinoshita A., Morimura K., Hiroi T., Funae Y., Kishida H., Nakae D., Fukushima S.: *Int. J. Cancer* 100, 136 (2002).
 29. Guillamet E., Creus A., Ponti J., Sabbioni E., Fortaner S., Marcos R.: *Mutagenesis* 19, 129 (2004).
 30. Oguri T., Yoshinaga J., Tao H., Nakazato T.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 100 (2014).
 31. Sloth J. J., Larsen E. H., Julshamn K.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 227 (2005).
 32. Contreras-Acuna M., Garcia-Barrera T., Garcia-Sevillano M. A., Gomez-Ariza J. L.: *J. Chromatogr. A* 1282, 133 (2013).
 33. Devesa V., Martínez A., Suner M., Benito V., Vélez D., Montoro R.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 2267 (2001).
 34. Garcia-Salgado S., Quijano M. A., Bonilla M. M.: *Anal. Chim. Acta* 714, 38 (2012).
 35. Foster S., Maher W., Krikowa F., Apte S.: *Talanta* 71, 537 (2007).
 36. Norin H., Christakopoulos A., Sandström M., Ryhage R.: *Chemosphere* 14, 313 (1985).
 37. Veléz D., Ybáñez N., Montoro R.: *J. Agric. Food Chem.* 43, 1289 (1995).
 38. Dahl L., Molin M., Amlund H., Meltzer H. M., Julshamn K., Alexander J., Sloth J. J.: *Food Chem.* 123, 720 (2010).
 39. Hanaoka K., Tagawa S., Kaise T.: *Appl. Organomet. Chem.* 5, 435 (1991).
 40. Hanaoka K., Nakamura O., Ohno H., Tagawa S., Kaise T.: *Hydrobiologia* 316, 75 (1995).
 41. Hanaoka K., Ueno K., Tagawa S., Kaise T.: *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 94, 379 (1989).
 42. Hanaoka K., Motoya T., Tagawa S., Kaise T.: *Appl. Organomet. Chem.* 5, 427 (1991).
 43. Hanaoka K., Kogure T., Miura Y., Tagawa S., Kaise T.: *Chemosphere* 27, 2163 (1993).
 44. Devesa V., Loos A., Súner M. A., Vélez D., Fera A., Martínez A., Montoro R., Sanz Y.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 10297 (2005).
 45. García-Salgado S., Quijano M. A.: *Talanta* 128, 83 (2014).
 46. Chatterjee A.: *Talanta* 51, 303 (2000).
 47. Francesconi K. A., Kuehnelt D.: *Analyst* 129, 373 (2004).
 48. Whaley-Martin K., Koch I., Reimer K.: *Talanta* 88, 187 (2012).
 49. Alberti J., Rubio R., Rauret G.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 351, 420 (1995).
 50. Ackley K. L., B'Hymer C., Sutton K. L., Caruso J. A.: *J. Anal. At. Spectrom.* 14, 845 (1999).
 51. Gomez-Ariza J., Sanchez-Rodas D., Giraldez I., Morales E.: *Analyst* 125, 401 (2000).
 52. Karthikeyan S., Hirata S.: *Anal. Lett.* 36, 2355 (2003).
 53. Dietz C., Sanz J., Sanz E., Munoz-Olivas R., Cámara C.: *J. Chromatogr. A* 1153, 114 (2007).
 54. Francesconi K. A.: *Appl. Organomet. Chem.* 17, 682 (2003).
 55. Llorente-Mirandes T., Ruiz-Chancho M. J., Barbero M., Rubio R., López-Sánchez J. F.: *J. Agric. Food Chem.* 59, 12963 (2011).
 56. Brisbin J. A., B'Hymer C., Caruso J. A.: *Talanta* 58, 133 (2002).
 57. Pétursdóttir Á. H., Gunnlaugsdóttir H., Krupp E. M., Feldmann J.: *Food Chem.* 150, 353 (2014).
 58. Beauchemin D., Bednas M., Berman S. S., McLaren J., Siu K., Sturgeon R.: *Anal. Chem.* 60, 2209 (1988).
 59. Terlecka E.: *Environ. Monit. Assess.* 107, 259 (2005).
 60. Regmi R., Milne B. F., Feldmann J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 775 (2007).
 61. van Elteren J. T., Šlejkovec Z.: *J. Chromatogr. A* 789, 339 (1997).
 62. Gailer J., Irgolic K. J.: *J. Chromatogr. A* 730, 219 (1996).
 63. Villa-Lojo M. C., Alonso-Rodríguez E., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D.: *Talanta* 57, 741 (2002).
 64. Pettine M., Casentini B., Mastroianni D., Capri S.: *Anal. Chim. Acta* 599, 191 (2007).
 65. Feldmann I., Jakubowski N., Stuewer D.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 365, 415 (1999).
 66. Cotta A. J. B., Enzweiler J.: *J. Anal. At. Spectrom.* 24, 1406 (2009).
 67. Bolea-Fernandez E., Balcaen L., Resano M., Vanhaecke F.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 919 (2015).
 68. Gürleyük H., Brunette R. C., Howard C. R., Schneider C., Thomas R.: *Spectroscopy* 20, 24 (2005).
 69. Amr M. A.: *Adv. Appl. Sci. Res.* 3, 2179 (2012).
 70. Evans E. H., Giglio J. J.: *J. Anal. At. Spectrom.* 8, 1 (1993).
 71. Grindlay G., Mora J., de Loos-Vollebregt M., Vanhaecke F.: *Spectrochim. Acta, Part B* 86, 42 (2013).

72. Wahlen R.: *J. Chromatogr. Sci.* **42**, 217 (2004).
73. Raber G., Raml R., Goessler W., Francesconi K. A.: *J. Anal. At. Spectrom.* **25**, 570 (2010).
74. Amayo K. O., Petursdottir A., Newcombe C., Gunnlaugsdottir H., Raab A., Krupp E. M., Feldmann, J.: *Anal. Chem.* **83**, 3589 (2011).
75. Moreda-Pineiro A., Moreda-Pineiro J., Herbelo-Hermelo P., Bermejo-Barrera P., Muniategui-Lorenzo S., López-Mahía P., Prada-Rodríguez D.: *J. Chromatogr. A* **1218**, 6970 (2011).
76. Dufailly V., Nicolas M., Payot J. R., Poitevin E.: *J. AOAC Int.* **94**, 947 (2011).
77. Gorny J., Dumoulin D., Lesven L., Noiriel C., Madé B., Billon G.: *J. Anal. At. Spectrom.* **30**, 1562 (2015).
78. Chen Y. C., Amarasiriwardena C. J., Hsueh Y. M., Christiani D. C.: *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* **11**, 1427 (2002).
79. Moreda-Pineiro A., Moreda-Pineiro J., Herbelo-Hermelo P., Bermejo-Barrera P., Muniategui-Lorenzo S., Lopez-Mahia P., Prada-Rodríguez D.: *J. Chromatogr. A* **1218**, 6970 (2011).
80. Kohlmeyer U., Kuballa J., Jantzen E.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 965 (2002).
81. Larsen E. H., Stürup S.: *J. Anal. At. Spectrom.* **9**, 1099 (1994).
82. Larsen E. H., Pritzl G., Hansen S. H.: *J. Anal. At. Spectrom.* **8**, 1075 (1993).
83. Li W., Wei C., Zhang C., Van Hulle M., Cornelis R., Zhang X.: *Food Chem. Toxicol.* **41**, 1103 (2003).
84. Chatterjee A.: *Talanta* **51**, 303 (2000).
85. Whaley-Martin K. J., Koch I., Reimer K. J.: *Sci. Total. Environ.* **456-457**, 148 (2013).
86. Zmozinski A. V., Llorente-Mirandes T., Lopez-Sanchez J. F., da Silva M. M.: *Food Chem.* **173**, 1073 (2015).
87. Özcan Ş., Bakirdere S., Ataman O. Y.: *Anal. Lett.* **49**, 2501 (2016).
88. Contreras-Acuna M., Garcia-Barrera T., Garcia-Sevillano M. A., Gomez-Ariza J. L.: *J. Chromatogr. A* **1282**, 133 (2013).
89. Sloth J. J., Larsen E. H., Julshamn K.: *J. Anal. At. Spectrom.* **18**, 452 (2003).
90. Rodriguez I. B., Raber G., Goessler W.: *Food Chem.* **112**, 1084 (2009).
91. Whaley-Martin K. J., Koch I., Moriarty M., Reimer K. J.: *Environ. Sci. Technol.* **46**, 3110 (2012).
92. Karthikeyan S., Hirata S.: *Appl. Organomet. Chem.* **18**, 323 (2004).

A. Kaňa, Z. Klimšová, L. Sedlecká, and O. Mestek
(*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology Prague*): **Analysis of Cationic Species of Arsenic in Seafood**

Arsenic is one of the most dangerous environmental pollutants. Its toxicity depends on the arsenic species present. Cationic species of As, some of which show significant toxicity and carcinogenic effects, may be present in seafood at sub $\mu\text{g g}^{-1}$ to high mg g^{-1} levels. In this review, the origin of cationic As species in seafood, their stability during extraction and storage, methods of extraction and analysis are described and discussed. Special attention is paid to speciation analysis using HPLC coupled to ICP-MS.

Keywords: arsenic, speciation, foodstuff, HPLC-ICP-MS