

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Nikola Pokorná

SPECIAČNÍ ANALÝZA ANORGANICKÉHO ARSENU  
V MATERIÁLECH MOŘSKÉHO PŮVODU

Speciation Analysis of Inorganic Arsenic In Seafood Material

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Matoušek, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Praha 2016

Tato bakalářská práce vznikla ve spolupráci s Oddělením stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. jako součást výzkumného záměru RVO: 68081715 a s podporou programu MŠMT Kontakt II, č. projektu LH 15174.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 23. května 2016

.....

Nikola Pokorná

## Abstrakt a klíčová slova

Abstrakt:

Tato práce se zaměřila na extrakci jednotlivých specií arsenu v referenčních materiálech rybiho proteinu DORM-3 a DORM-4. Následně byly extrakty analyzovány pomocí metody generování hydridů s detekcí hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem.

Materiály byly extrahovány dvěma způsoby, a to v mikrovlnném zařízení a v topném bloku. Bylo zjištěno, že extrakce s použitím 2% kyseliny dusičné je neúčinná. Extrakce provedena s 2% kyselinou dusičnou s pomocným extrakčním činidlem peroxidem vodíku v různých koncentracích byla účinnější, avšak způsobovala přeměnu methylovaných specií arsenu. Tato přeměna má za následek nadhodnocení obsahu anorganického arsenu.

Klíčová slova: speciální analýza, arsen, generování hydridů, mořské potraviny, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Abstract:

This thesis was focused on extraction of individual arsenic species from reference materials of fish protein DORM-3 and DORM-4. Extracts were then analyzed by a hydride generation method with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry.

Materials were extracted in two ways – in a microwave device and in a heating block. It was found that extraction with 2% nitric acid is not efficient. Extraction performed in 2% nitric acid with addition of hydrogen peroxide at various concentrations increased the extraction yield, but it caused conversion of arsenic species. This conversion would mean the overestimation of inorganic arsenic content.

Key words: speciation analysis, arsenic, hydride generation, seafood, inductively coupled plasma mass spectrometry

## Poděkování

Chci poděkovat RNDr. Tomáši Matouškovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a za pomoc při zpracování této práce.

Dále chci poděkovat RNDr. Jakubu Hraníčkoví, Ph.D. za všestrannou pomoc. Mé poděkování také patří vědeckému týmu z Oddělení stopové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. za umožnění spolupráce, ochotu a vstřícný přístup.

Velké díky patří taktéž mé rodině za jejich podporu a možnosti studia na vysoké škole.

# Obsah

Seznam zkratk a symbolů .....	8
1 ÚVOD.....	9
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1 Arsen .....	10
2.1.1 Toxicita významných specií arsenu.....	11
2.2 SPECIAČNÍ ANALÝZA ARSENU.....	13
2.2.1 Nejběžněji používané metody .....	13
2.2.2 Speciační analýza arsenu pomocí generování hydridů.....	13
2.2.3 Arsen v materiálech mořského původu .....	15
2.2.4 Certifikované referenční materiály DORM-3 a DORM-4.....	15
2.2.5 Extrakce referenčních materiálů DORM-3 a DORM-4.....	16
3 Experimentální část .....	19
3.1 Použité chemikálie .....	19
3.2 Příprava standardních roztoků arsenu .....	20
3.3 Příprava reakčních činidel a pufru .....	20
3.4 Extrakční procedura .....	21
3.5 Přístrojové vybavení .....	22
3.6 Experimentální uspořádání.....	22
3.7 Zpracování dat .....	25
4 Výsledky a diskuze.....	26
4.1 Analytické parametry metody .....	26
4.2 Ověřování extrakční procedury .....	30
4.2.1 Analýzy materiálu DORM-3 po mikrovlnné extrakci.....	30

4.2.2	Analýzy materiálů DORM-3 a DORM-4 po extrakci v topném bloku .....	32
4.3	Ověřování demethylace specií během mikrovlnné extrakce .....	34
5	Závěr .....	36
	Seznam použité literatury .....	37

## Seznam zkratek a symbolů

AsB	arsenobetain
cps	signál (counts per second)
CRM	certifikovaný referenční materiál
CT	vymrazování
DMAs	dimethylarsen (DMAs <sup>III</sup> + DMAs <sup>V</sup> )
DMAs <sup>III</sup>	dimethylarsenitan
DMAs <sup>V</sup>	dimethylarseničnan
HG	generování hydridů
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
iAs	anorganický arsen (iAs <sup>III</sup> + iAs <sup>V</sup> )
iAs <sup>III</sup>	anorganický arsenitan
iAs <sup>V</sup>	anorganický arseničnan
ICP-MS	hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MAs	monomethylarsen (MAs <sup>III</sup> + MAs <sup>V</sup> )
MAs <sup>III</sup>	monomethylarsenitan
MAs <sup>V</sup>	monomethylarseničnan
M <sub>r</sub>	relativní molekulová hmotnost
t <sub>r</sub>	retenční čas
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
WHO	světová zdravotní organizace (World Health Organization)



# 1 ÚVOD

Arsen je prvek, který je známý díky své toxicitě. Významným zdrojem arsenu jsou obecně pro lidstvo potraviny živočišného, ale i rostlinného původu. Pro zjištění toxicity arsenu v potravinách, ale i obecně, nestačí znát, jakou koncentraci má celkový arsen, ale je nutno zjistit, v jakém zastoupení jednotlivých forem, nebo-li specií, se nachází, jelikož toxicita různých specií je různá.

Tato práce je součástí širšího projektu, zabývajícího se vývojem metodik pro speciální analýzu arsenu. Jde o spolupráci analytické laboratoře Ústavu analytické chemie, v.v.i., s toxikologickou laboratoří na University of North Carolina v Chapel Hill (UNC) a producentem certifikovaných referenčních materiálů National Research Council Canada. Konkrétně se tato práce týká části zaměřené na speciální analýzu arsenu v potravinách mořského původu.

Cílem této bakalářské práce bylo ověření publikované extrakční procedury pro použití s analytickou metodou založenou na generování hydridů s vymrazováním a detekcí hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem. Sledovány byly toxikologicky významné specie, především anorganický arsen (iAs) a mono- a dimethylarsen (MAs a DMAs). Jako vzorová matrice byly zvoleny referenční materiály rybího proteinu DORM-3 a DORM-4 s certifikovaným celkovým obsahem arsenu a v případě DORM-4 i arsenobetainu.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Arsen

Arsen se v přírodě běžně vyskytuje v horninách, půdách i vodách<sup>1</sup>. Jeho zastoupení zde může být v organické nebo anorganické formě a vyskytuje se ve čtyřech různých oxidačních stavech, a to  $\text{As}^{-\text{III}}$ ,  $\text{As}^0$ ,  $\text{As}^{\text{III}}$  a  $\text{As}^{\text{V}}$  (cit. <sup>2</sup>).

Příznaky akutní otravy arsenem jsou nejčastěji bolesti břicha, průjem, či zvracení<sup>2</sup>. Chronické účinky arsenu bývají zaznamenány již při relativně nízkých dávkách. Je dokázáno, že chronická expozice může způsobit několik vážných onemocnění, jimiž mohou být například rakovina, diabetes nebo kardiovaskulární choroby.

Ačkoli je arsen proslulý spíše svou toxicitou, používá se i jako léčivo. Oxid arsenitý je používán k léčení leukémie a do nedávna se s ním léčilo onemocnění syfilis.

Toxicita arsenu velmi závisí na tom, v jaké chemické formě se nachází. Anorganické specie arsenu, jako jsou arsenitan a arseničnan, mají zastoupení v podzemních a povrchových vodách, což může ohrozit zdraví mnoha lidí<sup>3</sup>. Sloučeniny trojmocného arsenu jsou mnohem toxičtější než sloučeniny pětímocného arsenu, jsou to významné mutageny, karcinogeny a teratogeny. Naopak některé formy arsenu, například arsenobetain, který převládá ve složení v potravinách mořského původu, je téměř netoxický<sup>4,5</sup>.

Nejčastější výskyt arsenu v lidském těle zapříčiňuje pitná voda<sup>1</sup>. Nejvyšší povolená koncentrace arsenu v pitné vodě doporučená WHO, a zároveň i česká norma, je  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (cit. <sup>6</sup>). Ve světě je stále mnoho oblastí, kde je v pitné vodě arsen obsažen v nebezpečných koncentracích .

### 2.1.1 Toxicita významných specií arsenu

Arsen je typickým příkladem prvku, u kterého je velmi důležité, v jaké chemické formě se nachází. Daná forma totiž ovlivňuje nejen toxicitu, ale i transportní procesy v životním prostředí. V biologických materiálech je arsen přítomen v různých sloučeninách, ale toxicita každé z nich je různorodá<sup>2</sup>. V materiálech biologického původu se může vyskytovat více jak dvacet specií arsenu<sup>7</sup> a většina z nich je ve formě iontů<sup>8</sup>.

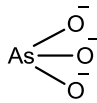
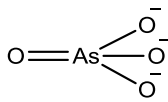
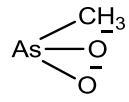
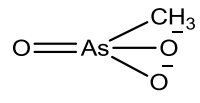
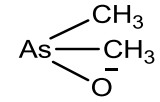
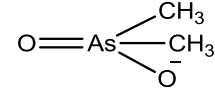
Nejvíce toxikologicky významné jsou formy anorganického arsenu, a to arsenitany ( $iAs^{III}$ ) a arseničnany ( $iAs^V$ )<sup>2</sup>. Anorganické formy arsenu jsou nejvíce toxikologicky významnou složkou arsenu v potravinách.

Monomethylované formy arsenu, do kterých patří methylarsenitan ( $MAs^{III}$ ) a methylarseničnan ( $MAs^V$ ), jsou méně toxické pro člověka. Totéž platí i pro dimethylované specie, a to dimethylarsenitan ( $DMAs^{III}$ ) a dimethylarseničnan ( $DMAs^V$ )<sup>9</sup>.

Různé toxicity těchto specií arsenu jsou důležité a významné, jelikož celkové množství arsenu jako takového neposkytuje dostatek informací o toxicitě daného vzorku<sup>8</sup>.

Strukturní vzorce toxických specií arsenu jsou zobrazeny v tabulce 2.1.

**Tab. 2.1:** Toxikologicky významné specie arsenu<sup>8</sup>.

název sloučeniny	strukturní vzorec
anorganický arsenitan	 iAs <sup>III</sup>
anorganický arseničnan	 iAs <sup>V</sup>
monomethylarsenitan	 MAs <sup>III</sup>
monomethylarseničnan	 MAs <sup>V</sup>
dimethylarsenitan	 DMAs <sup>III</sup>
dimethylarseničnan	 DMAs <sup>V</sup>

## 2.2 SPECIAČNÍ ANALÝZA ARSENU

### 2.2.1 Nejběžněji používané metody

Nejběžněji se jako kvantitativní analytické metody pro speciační analýzu arsenu používají separační metody s velmi citlivou prvkově specifickou detekcí, nejčastěji pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Nejvíce využívanými separačními metodami pro speciační analýzu arsenu jsou iontově výměnná a ion-párová vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)<sup>1,10,11</sup>, jejichž výhodou je možnost identifikovat široké spektrum specií arsenu a jsou vysoce specifické<sup>12</sup>.

V případě získávání specií arsenu z biologických materiálů je nutnost provedení extrakce, kterou doprovází rizika spojené s rozkladem či přeměnou specií arsenu na jiné nebo nebezpečí nedokonalé účinnosti extrakce<sup>12,13</sup>. Je zde striktně omezen objem vzorku, což je velkou nevýhodou. Malý objem dávkovaného vzorku limituje citlivost a meze detekce stanovení. Pro analýzu biologických materiálů metodou HPLC je také nutná dokonalá filtrace vzorku, aby nedošlo k poškození kolony. Dalším problémem bývá nedokonalá separace specií, například iAs a arsenobetainu u nejběžnější aniontově výměnné chromatografie.

Alternativou jsou postupy, které jsou založeny na generování těkavých hydridů, v tomto případě tedy arsenovodíku (arsanu) a methyl substituovaných arsanů<sup>8,14</sup> a jsou popsány v podkapitole níže.

### 2.2.2 Speciační analýza arsenu pomocí generování hydridů

HG-CT-ICP-MS je velmi citlivá metoda založená na selektivním generování hydridů (HG) s jejich prekoncentrací ve vymrazovací trubici chlazené kapalným dusíkem (CT) s detekcí pomocí atomové absorpční spektrometrie (AAS) nebo citlivější ICP-MS<sup>15</sup>.

Stanovení anorganického arsenu technikou HG je vhodnou srovnávací analytickou metodou ke stanovení HPLC-ICP-MS.

Je založeno na jiném principu a oproti HPLC stanovení má některé výhody, například specíe arsenobetain netvoří arsenovodík, a tedy neruší stanovení.

Principem metody je přeměna specií na příslušné těkavé methylsubstituované arsany pomocí redukce tetrahydridoboritanem, jejich oddělení od kapalně fáze, zachycení a prekoncentrace ve vymrazovací trubici za teploty kapalného dusíku. Poté jsou jednotlivé arsany při zahřívání odděleny a podle svého bodu varu postupně odcházejí do detektoru.

Obecně hlavní nevýhodou techniky generování hydridů je velmi omezená selektivita, jelikož specíe ve vzorku tvoří pouze čtyři těkavé sloučeniny arsenu, a to arsan, monomethylarsan, dimethylarsan a trimethylarsan<sup>16</sup>. Rozlišení specií o stejné methylaci podle mocenství je možné dosáhnout pomocí selektivního generování hydridů. Při pH 6 jsou trojmocné arsenitany ( $iAs^{III}$ ,  $MAs^{III}$ ,  $DMAs^{III}$ ) na hydridy převedeny kvantitativně, ale pětímocné arseničnany ( $iAs^V$ ,  $MAs^V$ ) netvoří hydridy vůbec, v případě  $DMAs^V$  tvoří pouze v 5 – 8 %<sup>15</sup>. V jednom alikvótu vzorku se tedy stanoví pouze trojmocné specíe, ve druhém alikvótu se pak stanoví suma troj- a pětímocných specií reakcí při pH 1 nebo po předredukci pětímocných specií na trojmocné. Z rozdílu hodnot se pak vypočte obsah pětímocných specií.

Proces HG je prováděn v kontrolovaném režimu a optimálně všechny arsenové specíe dosahují účinnosti kolem 100 %.

Naopak výhodou je, že není třeba provádět filtraci vzorků, CT systém dovoluje mít vzorek ve formě suspenze<sup>17</sup>. Postup HG-CT je tak vhodný i pro analýzu vysoce nestabilních trojmocných specií arsenu. Velkou výhodou jsou též nízké hodnoty meze stanovitelnosti a již zmíněné meze detekce<sup>15</sup>, protože analyt z relativně velkého objemu vzorku je zakoncentrován do úzkého píku.

### 2.2.3 Arsen v materiálech mořského původu

V potravinách mořského původu se může vyskytovat více jak padesát specií arsenu a je prokázáno, že obsahují větší množství celkového arsenu než potraviny suchozemské<sup>18</sup>. Uvádí se, že zastoupení anorganických specií arsenu z celkového množství arsenu, se pohybuje v relativně nízkých procentech<sup>19</sup>. Existují však některé druhy mořských ryb, ve kterých byly nalezeny koncentrace anorganického arsenu až  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , což je 42 % z celkového množství arsenu. Jedná se o jednu z nejvyšších koncentrací anorganického arsenu, která je přítomná u mořských živočichů<sup>20</sup>.

U většiny ryb, ale i jiných mořských materiálů, se arsen nachází převážně ve formě organického arsenobetainu, který se nemetabolizuje a je považován za netoxický<sup>4</sup>. Proto je třeba stanovovat toxikologicky významné specie, zejména iAs, jelikož je pokládán za nejvíce toxickou formu arsenu, která je obsažena v mořských potravinách<sup>21</sup>.

### 2.2.4 Certifikované referenční materiály DORM-3 a DORM-4

Certifikované referenční materiály rybího proteinu DORM-3 a DORM-4 z National Research Council Canada jsou určeny především k vývoji metod analýz materiálů podobné matrice a kontrole správnosti analýz. Byly připraveny z lyofilizovaného a rozemletého homogenátu rybího proteinu.

Certifikované hodnoty celkového obsahu arsenu pro DORM-3 a DORM-4 jsou v tabulce 2.2. Pro DORM-4 je navíc certifikovaná hodnota arsenobetainu. Jiné specie, tj. především anorganický arsen, v těchto materiálech nejsou certifikovány, a pokud je nám známo, ani v žádném jiném materiálu s obdobnou matricí.

**Tab.2.2:** Certifikované hodnoty referenčních materiálů DORM-3 a DORM-4. Hodnoty jsou uvedeny  $\text{mg kg}^{-1}$ .

CRM	celkový obsah arsenu	AsB
DORM-3	$6,88 \pm 0,30$	–
DORM-4	$6,87 \pm 0,40$	$3,95 \pm 0,36$

### 2.2.5 Extrakce referenčních materiálů DORM-3 a DORM-4

Pro většinu postupů speciální analýzy je nutné převést specie analytu do roztoku, extrakce vzorků je tedy nutností. Zásadním požadavkem je co nejvyšší účinnost, resp. pokud možno kompletní uvolnění všech specií do roztoku. Účinnost extrakce se obvykle odhaduje porovnáním celkového obsahu arsenu po extrakci a po mineralizaci. Zároveň nesmí docházet k rozkladu a přeměně mezi speciemi, proto je nutné používat šetrné metody extrakce. Bohužel zatím neexistuje univerzálně vhodná metoda pro extrakci specií arsenu v tkáních ryb a mořských živočichů.

Extrakční metody pro speciální analýzu arsenu byly publikovány a ověřovány pro některé referenční materiály – TORT-2, DOLT-3, DOLT-4 a DORM-3. Extrakční účinnost specií arsenu v pevných vzorcích velmi záleží na použitém extrakčním činidle<sup>22</sup>.

V práci Rasmussen et. al.<sup>23</sup> byla provedena extrakce s 0,06M kyselinou chlorovodíkovou smíchanou s 3% peroxidem vodíku v mikrovlnném zařízení. Peroxid vodíku byl přidán pro snadnější oxidaci  $\text{As}^{\text{III}}$  na  $\text{As}^{\text{V}}$  a účinnost oxidace byla ověřena následnou analýzou pomocí HPLC s ICP-MS detekcí. Extrakce byla prováděna pro referenční materiály TORT-2 a DORM-3 a extrakční účinnost se pohybovala mezi 101 – 104 %.

Extrakce celkového arsenu i jeho specií ve vzorcích TORT-2 a DOLT-4 je popsána v publikaci Zmozinski et. al.<sup>24</sup>. Vzorky byly extrahovány pomocí mikrovlnného zařízení a extrakčním činidlem byla 0,2% kyselina dusičná smíchaná s 1% peroxidem vodíku.



Při této extrakci kompletně proběhla oxidace  $\text{As}^{\text{III}}$  na  $\text{As}^{\text{V}}$ . Účinnost extrakce byla vyhodnocena jako poměr celkového arsenu v extraktech a celkového arsenu ve vzorcích. Stanovená účinnost pro TORT-2 byla 98 % a pro DOLT-4 byla 77 %, což se shoduje s publikací Pétursdóttir et. al.<sup>25</sup>. Bylo tedy zjištěno, že extrakce při těchto podmínkách s danými extrakčními činidly je pro arsenové specie v mořských materiálech relativně účinná.

Extrakce vzorku DOLT-3 pomocí kyseliny dusičné, která byla vyzkoušena v různých koncentracích, smíchaná s 10% methanolem v ultrazvukovém zařízení, je popsána v práci Batista et. al.<sup>22</sup>. Bylo zjištěno, že koncentrace kyseliny dusičné ovlivňuje extrakční účinnost a tedy nejlepší účinnosti (71 %) bylo dosaženo pomocí 2% kyseliny dusičné s 10% methanolem.

Extrakce v ultrazvukovém zařízení a analýza elektroforetickou metodou s detekcí ICP-MS je popsána v práci Liu et. al.<sup>26</sup> pro vzorek DORM-3. Jako extrakční činidlo byla použita deionizovaná voda a extrakční účinnost dosahovala hodnoty 85 %. Tyto výsledky ukázaly, že extrakce proběhla účinně, jelikož nedošlo k rozkladu žádné arsenové specie na jiné a je vhodná pro vzorky biologického materiálu.

V publikaci Pétursdóttir et. al.<sup>25</sup> bylo studováno osm extrakčních metod s použitím mikrovlnného zařízení pro stanovení iAs v certifikovaných referenčních materiálech TORT-2, DOLT-4 a DORM-3. Obecně nejnižších hodnot extrakční účinnosti bylo stanoveno pro vzorek DOLT-4, které se pohybovaly v rozmezí 62 – 78 %. Nejvyšších extrakčních účinností pro všechny tři referenční materiály bylo dosaženo pomocí kyseliny dusičné s přídavkem peroxidu vodíku. Ve výsledku byla jako doporučené extrakční činidlo zvolena 0,06M kyselina chlorovodíková nebo 2% kyselina dusičná, v obou případech s 3% peroxidem vodíku přidaným před mikrovlnnou extrakcí.

Publikované hodnoty pro iAs a další arsenové specie v referenčním materiálu DORM-3 jsou zobrazeny v tabulce 2.3. Z tabulky je zřejmé, že publikované výsledky se navzájem dobře neshodují. Referenční materiál DORM-4 je k dispozici teprve od roku 2015 a výsledky speciálních analýz arsenu v tomto materiálu dosud nebyly publikovány.

**Tab. 2.3:** Publikované hodnoty jednotlivých specií arsenu v referenčním materiálu DORM-3 pro různá extrakční činidla a různé extrakční metody.

publikace	iAs, ng g <sup>-1</sup>	MAs, ng g <sup>-1</sup>	DMAs, ng g <sup>-1</sup>	AsB, ng g <sup>-1</sup>	extrakční procedura	extrakční činidlo
Pétursdóttir et. al. <sup>25</sup>	160 ± 10				mikrovlnné zařízení	2% HNO <sub>3</sub> + 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Leufroy et. al. <sup>27</sup>	397 ± 12	71 ± 3	423 ± 9	3880 ± 16	mikrovlnné zařízení	deionizovaná voda
Rasmussen et. al. <sup>23</sup>	190 ± 10				mikrovlnné zařízení	0,06 M HCl + 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Battista et. al. <sup>22</sup>	400 ± 60	300 ± 40	600 ± 70	5000 ± 70	ultrazvukové zařízení	10% MeOH + 2% HNO <sub>3</sub>
Liu et. al. <sup>26</sup>	1400 ± 40	400 ± 10	540 ± 20	3510 ± 20	ultrazvukové zařízení	deionizovaná voda
Liu et. al. <sup>28</sup>	320 ± 20	450 ± 60	430 ± 10	5110 ± 90	ultrazvukové zařízení	deionizovaná voda

## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie

- deionizovaná voda získaná ze zařízení ULTRAPUR (Watrex, USA)
- certifikovaný referenční materiál – rybí protein DORM-3 (National Research Council Canada)
- certifikovaný referenční materiál – rybí protein DORM-4 (National Research Council Canada)
- kyselina dusičná, Suprapur, 65% ( $\text{HNO}_3$ ;  $M_r = 63,01$ ; Merck, Německo)
- peroxid vodíku, p.a.,  $\geq 30\%$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ;  $M_r = 34,01$ ; Sigma-Aldrich, Německo)
- L-cystein hydrochlorid monohydrát pro biochemii ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{ClNO}_2\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ;  $M_r = 175,64$ ; Merck, Německo)
- hydroxid draselný, chemicky čistý (KOH;  $M_r = 56,11$ ; Lachner, ČR)
- hydroxid sodný, chemicky čistý (NaOH;  $M_r = 39,99$ ; Lachner, ČR)
- tetrahydridoboritan sodný, peletky, p.a.,  $\geq 97,0\%$  ( $\text{NaBH}_4$ ;  $M_r = 37,83$ ; Sigma-Aldrich, Německo)
- Trizma<sup>®</sup> hydrochlorid, p.a.,  $\geq 99,0\%$  ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3\cdot\text{HCl}$ ;  $M_r = 157,6$ ; Sigma-Aldrich, Německo)
- Antifoam B (Sigma-Aldrich, Německo)
- Triton<sup>®</sup> X 100 (Sigma-Aldrich, Německo)
- argon v kapalném stavu, 99,996% (SIAD, ČR)
- helium, 99,998% (SIAD, ČR)

### 3.2 Příprava standardních roztoků arsenu

Zásobní roztok  $iAs^{III}$  o koncentraci  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním oxidu arsenitého ( $As_2O_3$ ;  $M_r = 197,84$ ; Lachema, ČR) v 1 ml 10% roztoku hydroxidu draselném v deionizované vodě.

Zásobní roztok  $MAs^V$  o koncentraci  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním hexahydrátu metylarseničnanu disodného ( $Na_2CH_3AsO_3 \cdot 6 H_2O$ ;  $M_r = 291,99$ ; Chem Service, USA) v deionizované vodě.

Zásobní roztok  $DMAs^V$  o koncentraci  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  byl připraven z kyseliny dimethylarseničné ( $H(CH_3)_2AsO_2$ ;  $M_r = 137,99$ ; Stream Chemicals, USA) v deionizované vodě.

Tyto zásobní standardní roztoky byly dále přesně zředěny deionizovanou vodou na koncentraci  $10 \text{ mg L}^{-1}$

Směsný standardní roztok  $iAs^{III}$ ,  $MAs^V$  a  $DMAs^V$  byl připraven z těchto tří standardních roztoků, které byly následně přesně ředěny, smíchány a doplněny 0,2% kyselinou dusičnou na koncentraci  $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

Z tohoto směsného arsenového standardu byly připraveny přesným ředěním kalibrační standardy o koncentracích  $iAs^{III}$ ,  $MAs^V$  a  $DMAs^V$   $500 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $1000 \text{ ng L}^{-1}$  a  $2000 \text{ ng L}^{-1}$ . Tyto standardní roztoky byly připravovány denně čerstvé.

Roztok telluru o koncentraci  $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , který byl použit jako vnitřní standard pro ICP-MS, byl připraven sériovým přesným ředěním v 0,2% kyselině dusičné ze zásobního standardního roztoku telluru (Te;  $M_r = 127,60$ ; BHD Prolabo, Anglie) o koncentraci  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 3.3 Příprava reakčních činidel a pufry

Redukční roztok obsahující 1% tetrahydridoboritan sodný (m/v) v 0,1% hydroxidu draselném (m/v) se ředěním pomocí deionizované vody též připravoval denně čerstvý. Do tohoto roztoku byl přidán Antifoam B (250  $\mu\text{l}$  10% (v/v) na 100 ml roztoku) pro zamezení účinku pění.

Tris-HCl pufr, jehož koncentrace byla  $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ , byl upraven na hodnotu pH 6 pomocí 10% hydroxidu draselného (m/v).

Roztok 4% (m/v) L-cysteinu, obsahující Triton<sup>®</sup> X 100 (5 ml 10% (v/v) na 25 ml roztoku) a Antifoam B (2,5 ml 10% (v/v) na 25 ml roztoku), doplněn deionizovanou vodou, byl použit jako preredukční činidlo standardních roztoků a blanku. Preredukční roztok se připravoval vždy před analýzou čerstvý a standardy s ním reagovaly po smíchání v poměru 1:1 minimálně šedesát minut při pokojové teplotě.

Při předredukci vzorků extraktů referenčních materiálů obsahující iAs<sup>V</sup>, MAs<sup>V</sup> a DMAs<sup>V</sup> byl použit preredukční roztok L-cysteinu zředěný deionizovanou vodou v poměru 1:1. Vzorky extraktů byly smíchány s tímto roztokem L-cysteinu v poměru 1:9 a ponechány reagovat minimálně šedesát minut při pokojové teplotě.

### 3.4 Extrakční procedura

Do skleněných extrakčních zkumavek bylo přesně naváženo asi 0,2 g vzorků DORM-3 a DORM-4, ke kterým bylo přidáno 5 ml extrakčního činidla. Jako extrakční činidlo byla použita 2% kyselina dusičná s případným přídavkem peroxidu vodíku o koncentraci 1 – 4 %.

Takto připravené vzorky byly následně extrahovány dvěma způsoby. Prvním způsobem byla mikrovlnná extrakce v zařízení UltraWAVE. Zařízení bylo natlakováno na hodnotu 25 bar. Následoval postupný mikrovlnný ohřev po dobu deseti minut na teplotu 90 °C, poté bylo deset minut konstantně drženo na teplotě 90 °C a nakonec proběhlo postupné zchladnutí zpět na teplotu 21 °C též po dobu deseti minut. Celková doba extrakce tedy trvala třicet minut. Po ukončení extrakce byly vzorky kvantitativně převedeny do polypropylenových centrifugačních vialek, zředěny na 10 ml a uchovávány v lednici.

Druhým způsobem byla extrakce provedena v topném bloku, do kterého se již předehřátého na 90 °C vložily obdobně připravené vzorky a při této teplotě byly extrahovány po dobu třiceti minut.

Před analýzou byla provedena předredukce pomocí roztoku L-cysteinu s přidanými protipěnicími činidly (viz. Kap. 3.3)

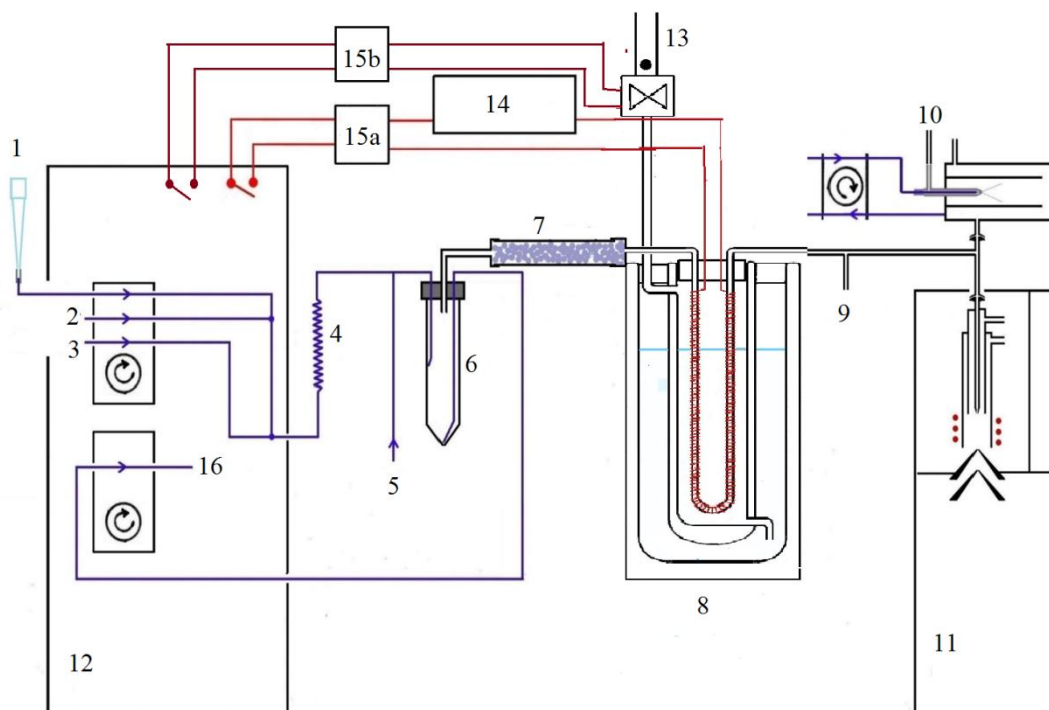
### **3.5 Přístrojové vybavení**

- předvážky 600-2r s přesností 0,01 g (Kern, Německo)
- analytické váhy ABT 220-5DM s přesností 0,00001 g (Kern, Německo)
- automatické pipety (Biohit, Finsko)
- hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem 7700 Series (Agilent Technologies, USA)
- zařízení na čištění vody ULTRAPUR (Watrex, USA)
- extrakční zařízení topný blok (Keison Products, Anglie)
- extrakční zařízení UltraWAVE (Milestone, Itálie)
- hmotnostní průtokoměry – zařízení na sledování průtoku nosného plynu (Omega Engineering, Inc., USA)
- laboratorní zdroj napětí (Electro-Automatik GmbH & Co. KG, Německo)

### **3.6 Experimentální uspořádání**

Použitý systém HG-CT ve spojení s ICP-MS byl podrobně popsán v cit.<sup>15,16</sup>.

Schématické znázornění experimentálního uspořádání je na obrázku 3.1.



**Obr. 3.1:** Schématické experimentální uspořádání systému HG-CT-ICP-MS.

(1 – dávkování vzorku, 2 – čerpání Tris-HCl pufru pomocí peristaltického čerpadla, 3 – čerpání tetrahydridoboritanu sodného pomocí peristaltického čerpadla, 4 – reakční cívka, 5 – přívod helia, 6 – separátor fází, 7 – sušící trubice s hydroxidem sodným, 8 – vymrazovací zařízení s kapalným dusíkem, 9 – přívod ředícího plynu, 10 – zmlžování roztoku vnitřního standardu, 11 – ICP-MS, 12 – ISIS, 13 – solenoidový ventil, 14 – laboratorní zdroj napětí, 15a,15b – spínací relé, 16 – odčerpávání reakční směsi peristaltickým čerpadlem)

Procedura: Vzorek byl nadávkován pomocí automatické pipety do pipetovací špičky připojené k peristaltické pumpě. Proud vzorku byl on-line míchán s proudem Tris-HCl pufru o pH 6 a redukčním činidlem, roztokem tetrahydridoboritanu. Arsenové specie se přeměnily na plynné arsany, které byly odděleny od kapaliny v separátoru fází.

Plynná fáze byla sušena hydroxidem sodným v uzavřené polyethylenové trubici. Vymrazovací zařízení bylo složeno z dlouhé křemenné U-trubice, která byla uzavřena v evakuované dvouplášťové nádobě s vývody nahoře a dole, ponořené do Dewarovy nádoby s kapalným dusíkem.

Horní vývod byl uzavíratelný solenoidovým ventilem ovládaným modulem ISIS, kterým je vybaven ICP-MS spektrometr. Pokud byl vývod otevřen, kapalný dusík mohl do nádoby a U-trubice byla chlazená. Po ukončení generování hydridů a po uzavření horního vývodu byl kapalný dusík vytlačen vznikajícím plynem ven z nádoby. U-trubice byla postupně zahřívána napětím 25 V regulovaným pomocí laboratorního zdroje. Zahřívání se spínalo pomocí ISIS modulu přes relé.

Výstup nosného plynu helia z U-trubice byl zaveden do proudu ředícího plynu vstupujícího mezi mlžnou komoru a plazmový hořák. Zároveň byl zmlžován roztok vnitřního standardu, což zajišťuje robustnější podmínky vlhkého plazmatu.

Experimentální nastavení HG-CT a ICP-MS spektrometru, které byly při analýze použity, jsou zobrazeny v tabulce 3.1. Pro prevenci izobarických interferencí iontů  $\text{ArCl}^+$  byla použita při měření kolizní ceta s průtokem helia  $3,5 \text{ mL min}^{-1}$ .

**Tab. 3.1:** Použité podmínky měření při analýze.

ICP-MS	Agilent 7700x
Výkon, W	1600
Průtok zmlžovače Ar, $\text{L min}^{-1}$	0,6
Průtok ředícího plynu Ar, $\text{L min}^{-1}$	0,5
Zmlžovací pumpa, rps	0,1
Průtok vnitřního standardu, $\text{mL min}^{-1}$	0,3
Vnitřní standard	Te $100 \text{ ng mL}^{-1}$ v 0,2% $\text{HNO}_3$
Průtok kolizního plynu He, $\text{mL min}^{-1}$	3,5
Dávkovaný objem vzorku, $\mu\text{L}$	350
Průtok činidel, $\text{mL min}^{-1}$	1
Průtok nosného plynu, He, $\text{mL min}^{-1}$	75



### **3.7 Zpracování dat**

Signály detektoru byly zaznamenány pomocí programu MassHunter workstation (Agilent Technologies). Integrace naměřených signálů a výpočet koncentrací byly též provedeny v tomto programu. Získaná data byla dále exportovaná do programu MS Excel, kde byly zpracovávány. Pro vyhodnocení byly použity vždy plochy píku jednotlivých specií.

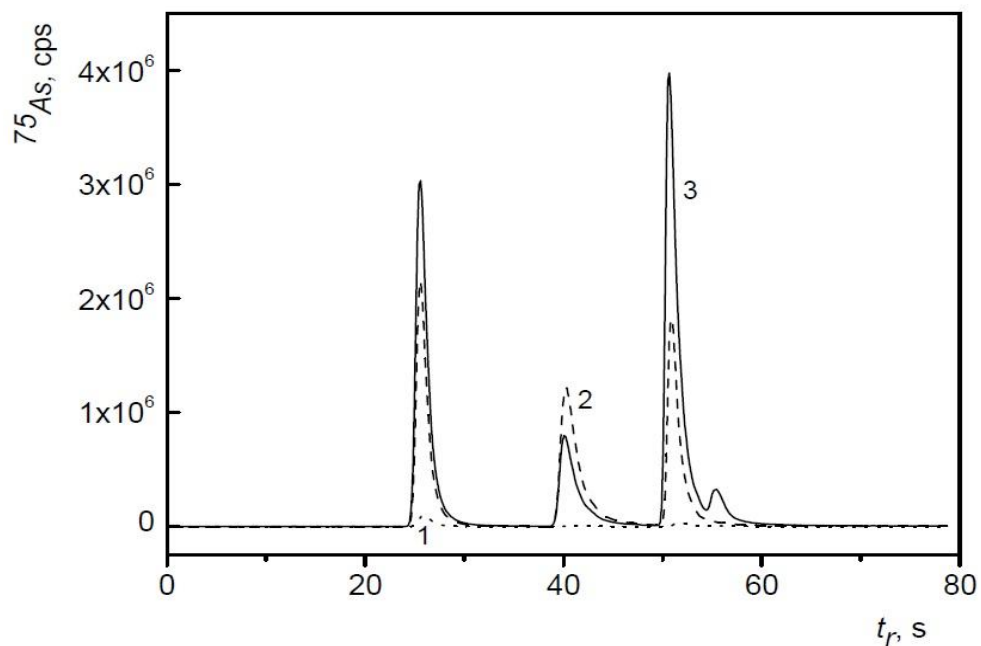
Byla prováděna vždy minimálně dvě měření pro standardy a blanky a dvě měření vždy dvou paralelně připravených vzorků pro extrakce.

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Analytické parametry metody

Analytický systém pro HG-CT-ICP-MS analýzy byl vyvinutý a zavedený na pracovišti REFS. Pro potřeby této práce byla semiautomatická verze HG-CT, dosud používaná jen pro AAS, adaptována pro ISIS modul a spojena s ICP-MS spektrometrem. Signály jednotlivých arsanů, detekovány pomocí ICP-MS, byly zaznamenány ve formě chromatogramů. Typické chromatogramy jsou na obr. 4.1. Po každé analýze byly zobrazeny tři chromatografické píky, které odpovídaly speciím iAs, MAs a DMAs. První pík vždy příslušel arsanu, druhý pík methylarsanu a třetí pík byl pro dimethylarsan. Na chromatogramu je dále vidět čtvrtý pík odpovídající trimethylarsanu, který však nebyl kvantifikován, protože během předredukce L-cysteinem dochází k jeho ztrátám, a jeho obsahy v referenčních materiálech byly zanedbatelné.

Na chromatogramu (Obr. 4.1) jsou znázorněny signály pro jednotlivé specie v blanku, standardu a vzorku DORM-3 po extrakci. Při každém měření standardu nebo vzorku byla vždy dávkovací špička promyta deionizovanou vodou a mezi měřeními jednotlivých vzorků bylo provedeno proměření blanku.

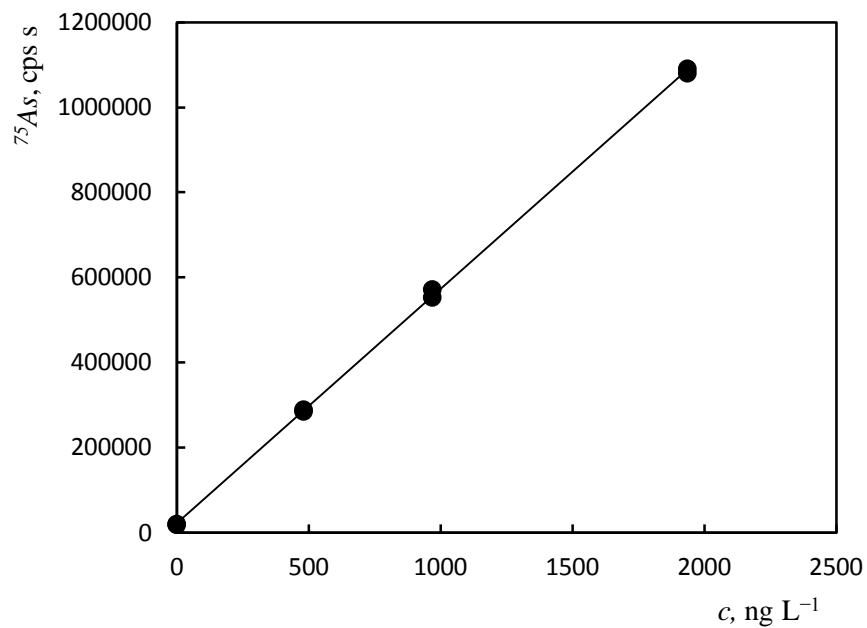


**Obr. 4.1:** Signály předredukovaných iAs, MAs, DMAs získané pomocí HG-CT-ICP-MS.

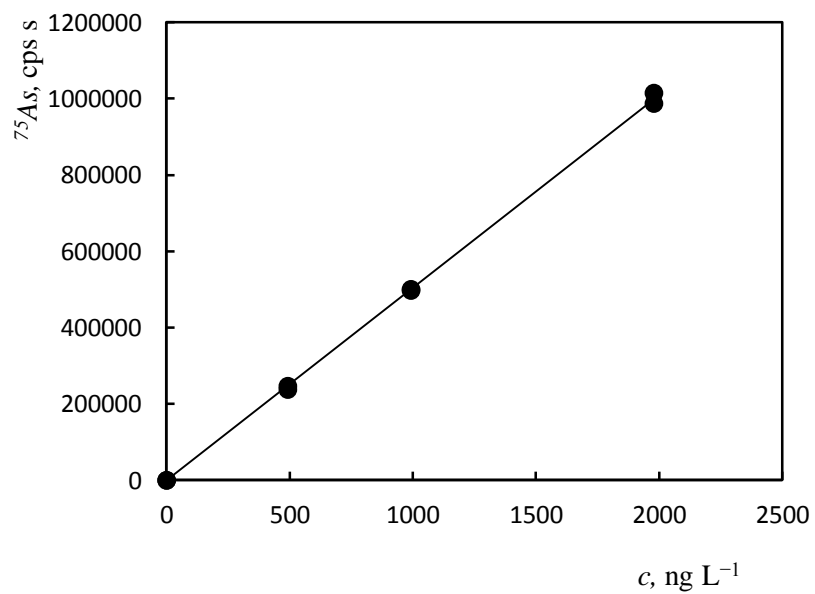
(1 – blank, 2 – kalibrační standard o koncentraci  $500 \text{ ng L}^{-1}$ , 3 – DORM-3 s 2% kyselinou dusičnou a 1% peroxidem vodíku)

Měření standardů bylo prováděno před každou sérií analýz a citlivost byla průběžně kontrolována pomocí kontrolního měření standardu mezi vzorky. Kalibrační grafy byly sestaveny pomocí kalibračního blanku a tří směsných standardů o koncentracích  $500 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $1000 \text{ ng L}^{-1}$  a  $2000 \text{ ng L}^{-1}$ .

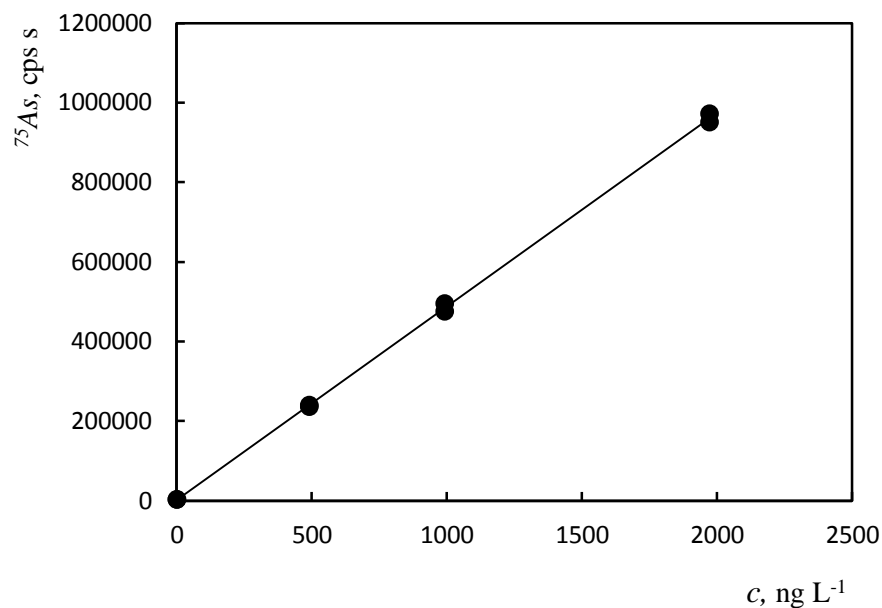
Typické kalibrační funkce pro jednotlivé arsenové specie jsou znázorněny na obr. 4.2a, b, c.



**Obr. 4.2a:** Kalibrační graf závislosti plochy píku pro specii  $\text{iAs}^{\text{III}}$  na koncentraci jednotlivých standardů.



**Obr. 4.2b:** Kalibrační graf závislosti plochy píku pro specii  $\text{MAs}^{\text{V}}$  na koncentraci jednotlivých standardů.



**Obr. 4.2c:** Kalibrační graf závislosti plochy píku pro specii DMAs<sup>V</sup> na koncentraci jednotlivých standardů.

V kalibračních grafech byly znázorněny obě měření standardů, nikoli jejich průměry. Kalibrační závislosti jsou lineární, směrnice přímek jednotlivých specií se lišily o méně než 12 %, tj. citlivost byla prakticky shodná pro všechny stanovované specie. Proměřením extrakčních blanků bylo možno odhadnout mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ), které jsou uvedeny v tabulce 4.1.

**Tab. 4.1:** Hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti.

jednotlivé specie	LOD, ng L <sup>-1</sup>	LOQ, ng L <sup>-1</sup>
iAs <sup>III</sup>	9	30
MAs <sup>V</sup>	3	11
DMAs <sup>V</sup>	7	24

Hodnoty meze detekce (LOD) pro jednotlivé specie byly spočítány jako tři směrodatné odchylky blanku a mez stanovitelnosti (LOQ) jako deset směrodatných odchylek blanku. Hodnoty v tabulce jsou uvedeny pro naředěný vzorek po předredukci.

Je třeba zdůraznit, že blanky pro zjištění mezí detekce zahrnovaly celou extrakční proceduru, a jsou tedy horší než meze detekce získané pro blanky deionizované vody. Přepočteno na původní vzorek jsou hodnoty následující : mez detekce pro iAs byl  $5 \text{ ng g}^{-1}$ , pro MAs byl  $2 \text{ ng g}^{-1}$  a pro DMAs byl  $4 \text{ ng g}^{-1}$ . Mez stanovitelnosti pro iAs byla  $15 \text{ ng g}^{-1}$ , pro MAs byla  $6 \text{ ng g}^{-1}$  a pro DMAs byla  $12 \text{ ng g}^{-1}$ .

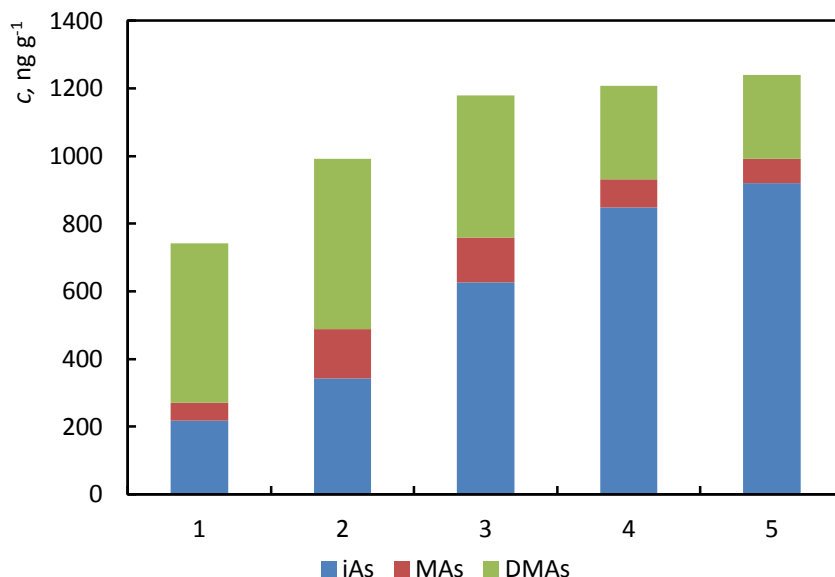
## **4.2 Ověřování extrakční procedury**

Testovaná procedura vychází z procedury publikované a doporučované v práci Pétursdóttir et. al.<sup>25</sup>. Extrakce byly prováděny jednak v mikrovlnném rozkladném zařízení za zvýšeného tlaku, jednak se stejnými extrakčními roztoky v topném bloku. V předběžných experimentech bez a s použitím peroxidu vodíku se ukázaly významné rozdíly v celkovém obsahu i zastoupení jednotlivých specií, zaměřili jsme se na vliv peroxidu vodíku při extrakci.

### **4.2.1 Analýzy materiálu DORM-3 po mikrovlnné extrakci**

Extrakce v mikrovlnném zařízení v 2% kyselině dusičné s různou koncentrací peroxidu vodíku byla provedena pro vzorky materiálu DORM-3.

Následnou analýzou bylo vyhodnoceno zastoupení jednotlivých specií arsenu, které je uvedeno na obrázku 4.3 a v tabulce 4.2.



**Obr. 4.3:** Analýza vzorku DORM-3 s různými extrakčními činidly.

(1 – 2% kyselina dusičná, 2 – 2% kyselina dusičná + 1% peroxid vodíku, 3 – 2% kyselina dusičná + 2% peroxid vodíku, 4 – 2% kyselina dusičná + 3% peroxid vodíku, 5 – 2% kyselina dusičná + 4% peroxid vodíku)

Z tohoto grafu je patrné, že nalezené koncentrace i zastoupení jednotlivých specií arsenu se liší podle koncentrace peroxidu vodíku. V případě použití pouze 2% kyseliny dusičné je extrakce neúčinná, tedy je nutná přítomnost peroxidu vodíku jako pomocného extrakčního činidla. Se zvyšující se koncentrací peroxidu vodíku se postupně zvyšuje koncentrace iAs. Na druhou stranu, koncentrace DMAs, jak je z grafu velmi dobře vidět, se se zvyšující koncentrací peroxidu vodíku konstantně snižuje.

V případě MAs se v přítomnosti 1% a 2% peroxidu vodíku koncentrace zvýšila. Avšak při vyšších koncentracích peroxidu vodíku, a to 3% a 4%, se koncentrace MAs naopak snižuje. Součet obsahů všech těchto specií se od 2% koncentrace peroxidu vodíku už nemění.

MAs se tedy v přítomnosti více koncentrovaného peroxidu vodíku rozkládá na jiné arsenové specie. Toto chování ukazuje, že pravděpodobně v přítomnosti peroxidu vodíku dochází k demethylaci specií.

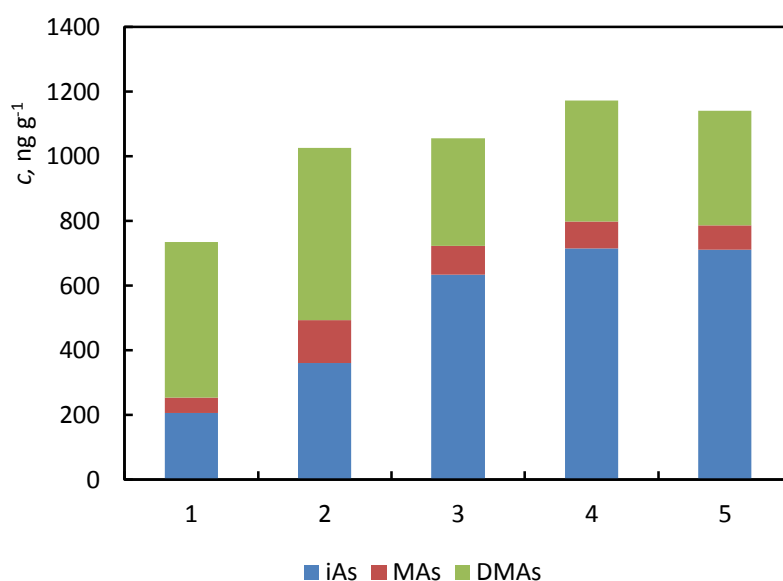
DMAs se tedy rozkládá na MAs a dále na iAs, jehož koncentrace rostou.

## 4.2.2 Analýzy materiálů DORM-3 a DORM-4 po extrakci v topném bloku

Extrakce ve 2% kyselině dusičné s různou koncentrací peroxidu vodíku byla opakována v topném bloku pro vzorky materiálů DORM-3 i DORM-4.

Z výsledků (Obr. 4.4 a Tab. 4.2) vyplývá, že extrakce s 2% kyselinou dusičnou je neúčinná stejně jako v případě mikrovlnné extrakce.

Koncentrace iAs s přibývajícím peroxidem vodíku stoupá, naopak v případě MAs a DMAs klesá nebo zůstává konstantní.



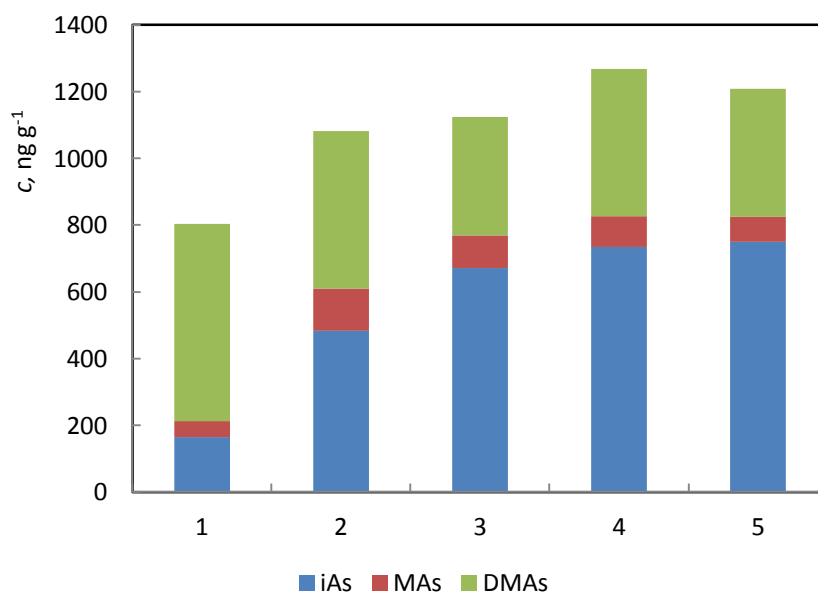
**Obr. 4.4:** Analýza vzorku DORM-3 s různými extrakčními činidly.

(1 – 2% kyselina dusičná, 2 – 2% kyselina dusičná + 1% peroxid vodíku, 3 – 2% kyselina dusičná + 2% peroxid vodíku, 4 – 2% kyselina dusičná + 3% peroxid vodíku, 5 – 2% kyselina dusičná + 4% peroxid vodíku)



Výsledek pro materiál DORM-4 je stejný jako u předchozích extrakcí (Obr. 4.5)

DORM-4 je v přítomnosti 2% kyseliny dusičné extrahován neúčinně. S rostoucí koncentrací peroxidu vodíku sice roste celková koncentrace specií, avšak dochází k rozkladu methylovaných specií (MAs a DMAs).



**Obr. 4.5:** Analýza vzorku DORM-4 s různými extrakčními činidly.

(1 – 2% kyselina dusičná, 2 – 2% kyselina dusičná + 1% peroxid vodíku, 3 – 2% kyselina dusičná + 2% peroxid vodíku, 4 – 2% kyselina dusičná + 3% peroxid vodíku, 5 – 2% kyselina dusičná + 4% peroxid vodíku)

### 4.3 Ověřování demethylace specií během mikrovlnné extrakce

Přestože je použití peroxidu vodíku během extrakce doporučováno v literatuře, jeho použití způsobuje rozklad methylovaných specií a následně nadhodnocení obsahu iAs, nejtoxičtější specíe arsenu. Tento rozklad methylovaných specií už byl dříve popsán v publikaci Alava et. al.<sup>29</sup> při analýze rýže s použitím mikrovlnné extrakční procedury s 1% kyselinou dusičnou a 1% peroxidu vodíku došlo k rozkladu asi 50% DMAs na iAs.

Abychom ověřili demethylaci MAs a DMAs při mikrovlnné extrakci, byla tato procedura provedena se standardními roztoky MAs a DMAs ve 2% kyselině dusičné a s přídavkem 1% a 4% peroxidu vodíku. V tomto případě však nebyl pozorován nárůst obsahu specií s nižší methylací, pouze nalezené hodnoty byly za přítomnosti 1% a 4% peroxidu vodíku o 12 % resp. 46 % nižší u MAs a o 24 % resp. 32 % nižší u DMAs. Tento pokles byl pravděpodobně způsoben interferencí peroxidu vodíku při generování hydridů – zbytkový obsah peroxidu vodíku byl vyšší, protože se jednak nerozložil bez přítomnosti matrice a standardy po extrakci byly při předredukci ředěny pouze 1:1, nikoliv 1:9 jako v případě referenčních materiálů.

Při demethylaci tedy pravděpodobně hraje roli i matrice vzorku a bude nutné tento experiment zopakovat s použitím standardního přídavku MAs a DMAs k referenčnímu materiálu a dále ověřit interferenci peroxidu vodíku při generování hydridů.

**Tab. 4.2:** Naměřené koncentrace jednotlivých specií a součtu specií materiálů DORM-3 a DORM-4 po extrakcích s jednotlivými extrakčními činidly.

extrakční procedura	extrakční činidlo	iAs, ng g <sup>-1</sup>	MAs, ng g <sup>-1</sup>	DMAs, ng g <sup>-1</sup>	součet specií, ng g <sup>-1</sup>
DORM-3 mikrovlnná extrakce	2% HNO <sub>3</sub>	218	53	471	742
	2% HNO <sub>3</sub> + 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	343	145	504	992
	2% HNO <sub>3</sub> + 2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	627	132	420	1179
	2% HNO <sub>3</sub> + 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	848	84	276	1208
	2% HNO <sub>3</sub> + 4% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	919	73	248	1241
DORM-3 extrakce v topném bloku	2% HNO <sub>3</sub>	206	48	482	736
	2% HNO <sub>3</sub> + 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	361	132	533	1026
	2% HNO <sub>3</sub> + 2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	635	88	333	1056
	2% HNO <sub>3</sub> + 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	716	83	373	1172
	2% HNO <sub>3</sub> + 4% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	711	75	356	1142
DORM-4 extrakce v topném bloku	2% HNO <sub>3</sub>	164	49	591	804
	2% HNO <sub>3</sub> + 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	482	128	471	1081
	2% HNO <sub>3</sub> + 2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	672	96	356	1124
	2% HNO <sub>3</sub> + 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	734	93	441	1268
	2% HNO <sub>3</sub> + 4% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	749	76	383	1208

## 5 Závěr

Tato práce byla zaměřena na testování publikované extrakční procedury pro speciální analýzu arsenu v certifikovaných referenčních materiálech rybího proteinu DORM-3 a DORM-4. Bylo zjištěno, že extrakce v mikrovlnném zařízení i v topném bloku dává shodné výsledky. V přítomnosti pouze zředěné kyseliny dusičné extrakce však není dostatečně účinná. Po přidání peroxidu vodíku se účinnost extrakce sice zvýšila, v tomto případě však docházelo k rozkladu methylovaných specií, což vede ke zdánlivému zvýšení obsahu anorganického arsenu. Proto je nezbytné pokračovat v hledání a ověřování vhodné extrakční procedury.

Výsledky měření iAs, MAs a DMAs nebyly v dobré shodě s výsledky publikovanými, ale ani publikované hodnoty speciace arsenu pro materiál DORM- 3 se neshodují.

Potvrzuje se, že krok extrakce je kritickým krokem pro správnou speciální analýzu arsenu v materiálech z ryb a mořských živočichů. Extrakční proces je ještě třeba řádně validovat s ohledem na účinnost extrakce a vzájemnou přeměnu specií arsenu.

## Seznam použité literatury

1. Komorowicz I.; Barańkiewicz D.: Arsenic and its speciation in water samples by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry – Last decade review; *Talanta* **84**, 247–261 (2011).
2. Rehman, K.; Naranmandura, H.: Arsenic metabolism and thioarsenicals; *Metallomic* **4**, 881–892 (2012).
3. Milstein, S.; Essader, A.; Murrel, C.; Pellizzari, E. D.; Fernando, R. A.; Raymer, J. H.; Akinbo, O.: Sample preparation, extraction efficiency, and determination of six arsenic species present in food composites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4180–4184 (2003).
4. EFSA (European Food Safety Authority): Scientific opinion on arsenic in food, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA J* **7(10)**: 1351:1 – 1351:199 (2009).
5. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry): Toxicological profile for arsenic (2007).
6. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.
7. Rabieh, S.; Hirner, A. V.; Matschullat, J.: Determination of arsenic species in human urine using high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **23**, 544–549 (2008).
8. Francesconi, K. A.; Kuehnelt, D.: Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000 – 2003; *Analyst* **129**, 273–395 (2004).
9. Feldmann, J.; Krupp, E. M.: Critical review or scientific opinion paper: Arsenosugars—A class of benign arsenic species or justification for developing partly speciated arsenic fractionation in foodstuffs? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **399(5)**, 1735–1741 (2011).
10. Gong, Z. L.; Lu, X. F.; Ma, M. S.; Watt, C.; Le, X. C.: Arsenic speciation analysis. *Talanta* (**58**), 77–96 (2002).

11. Ammann, A. A.: *American Journal of Analytical Chemistry* **2**, 27–45 (2011).
12. Currier, J. M.; Saunders, R. J.; Ding, L.; Bodnar, W.; Cable, P.; Matoušek, T.; Creed, J. T.; Stýblo, M.: Comparative oxidation state specific analysis of arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry and hydride generation- cryotrapping-atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **28**:6, 843–852 (2013).
13. Raab, A.; Meharg, A. A.; Jaspars, M.; Genney, D. R.; Feldmann, J.: Arsenic-glutathione complexes – their stability in solution and during separation by different HPLC modes. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **19**, 183-190 (2004).
14. Kumar, A. R.; Riyazuddin,P.: *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **87**, 469–500 (2007).
15. Matoušek, T.; Currier, J. M.; Trojánková, N.; Saunders, R. J.; Ishida, M. C.; González-Horta, C.; Musil, S.; Mester, Z.; Stýblo, M.; Dědina, J.: Selective hydride generation-cryotrapping-ICP-MS for arsenic speciation analysis at program levels: analysis of river and sea water reference materials and human bladder epithelial cells. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **28**, 1456–1465 (2013).
16. Matoušek, T.; Hernandez-Závala, A.; Svoboda, M.; Langerová, L.; Adair, B. M.; Drobná, Z.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.; Dědina, J.: *Spectrochimica Acta, Part B* **63**, 396–406 (2008).
17. Currier, J. M.; Svoboda, M.; Matoušek, T.; Dědina, J.; Stýblo, M.: Direct analysis and stability of methylated trivalent arsenic metabolites in cells and tissues. *Metallomics* **3**, 1347–1354 (2011).
18. Francesconi, K. A.: Arsenic species in seafood: Origin and human health implications. *Pure and Applied Chemistry*, **82(2)**, 373–381 (2010).
19. Borak, J.; Hosgood, H. D.: Seafood arsenic: Implications for human risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **47(2)**, 204–212 (2007).
20. Sloth, J. J.; Julshamn, K.: Survey of total and inorganic arsenic content in blue mussels (*Mytilus edulis* L.) from Norwegian fiords: Revelation of

- unusual high levels of inorganic arsenic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56(4)**, 1269–1273 (2008).
21. IARC (International Agency for Research on Cancer): A review of human carcinogens (2012).
  22. Batista, B. L.; Nacano, L. R.; De Souza, S. S.; Barbosa Jr., F.: Rapid sample preparation procedure for As speciation in food samples by LC-ICP-MS. *Food Additives and Contaminants* **29**, 780–788 (2012).
  23. Rasmussen, R. R.; Hedegaard, R. V.; Larsen, E. H.; Sloth, J. J.: Development and validation of an SPE HG-AAS method for determination of inorganic arsenic in samples of marine origin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**, 2825–2834 (2012).
  24. Zmozinski, A. V.; Llorente-Mirandes, T.; López-Sánchez, J. F.; da Silva, M. M.: Establishment of a method for determination of arsenic species in seafood by LC-ICP-MS. *Food Chemistry* **173**, 1073–1082 (2015).
  25. Pétursdóttir, A. H.; Gunnlaugsdóttir, H.; Krupp, E. M.; Feldmann, J.: Inorganic arsenic in seafood: Does the extraction method matter? *Food Chemistry* **150**, 353–359 (2014).
  26. Liu, L.; He, B.; Yun, Z.; Sun, J.; Jiang, G.: Speciation analysis of arsenic compounds by capillary electrophoresis on-line coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry using a novel interface. *Journal of Chromatography A* **1304**, 227–233 (2013).
  27. Leufroy, A.; Noël, L.; Beauchemin, D.; Guérin, T.: Bioaccessibility of total arsenic and arsenic species in seafood as determined by a continuous online leaching method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402**, 2849–2859 (2012).
  28. Liu, L.; Yun, Z.; He, B.; Jiang, G.: Efficient interface for online coupling of capillary electrophoresis with inductively coupled plasma – mass spectrometry and its application in simultaneous speciation analysis of arsenic and selenium. *Analytical Chemistry* **86**, 8167–8175 (2014).
  29. Alava, P.; Van de Wile, T.; Tack, F.: Extensive grinding and pressurized extraction with water are key points for effective and species preserving extraction of arsenic from rice. *Analytical Methods* **4**, 1237–1243 (2012).