



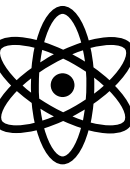
Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

PRIMJENA VEZANOG SUSTAVA TEKUĆINSKE KROMATOGRFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI SA SPEKTROMETRIJOM MASA UZ INDUKTIVNO SPREGNUTU PLAZMU ZA ANALIZU SPECIJA ARSENA U HRANI

Bernardo Marcioš mag. chem.

Poslijediplomski (doktorski) sveučilišni studij kemije

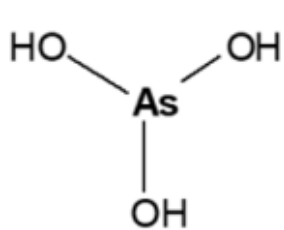
KEMIJSKI SEMINAR I. | 20. Ožujak 2024.



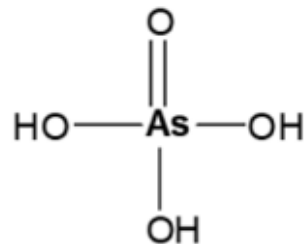
1. Arsenove specije i toksičnost

- 1980 god. – IARC – As – Kancerogen
- Provedena klasifikacija specija
- Kancerogene (G1)
- Potencijalno kancerogene (G2)

ANORGANSKE SPECIJE ARSENA



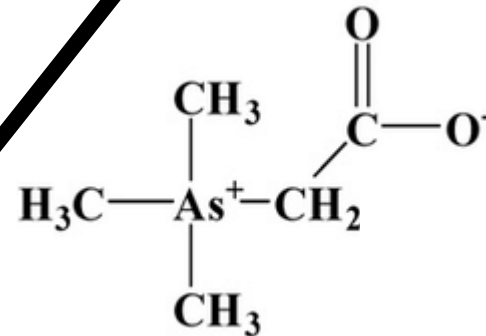
Arsenit (As(III))
LD₅₀ 4,5 mg/kg



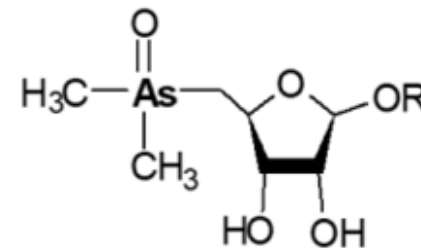
Arsenat (As(V))
LD₅₀ 18 mg/kg

GRUPA 1

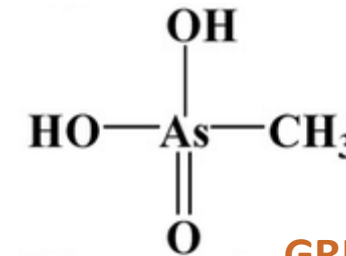
ORGANSKE SPECIJE ARSENA



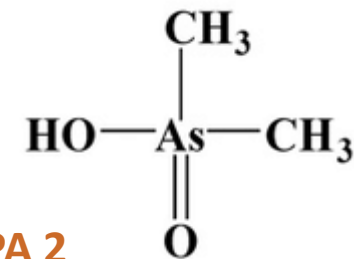
Arsenobetain (AsB)



Arsenošećeri (AsS)

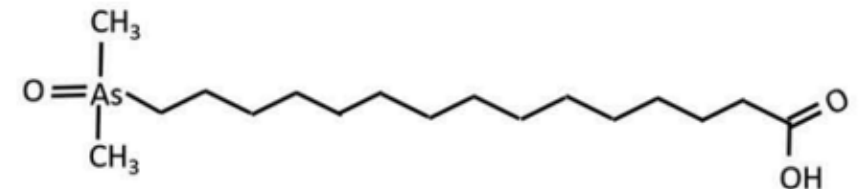


**Monometilarsonska
kiselina (MMA)**
LD₅₀ 1800 mg/kg

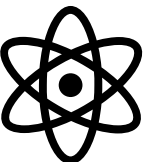


**Dimetilarsinska
kiselina (DMA)**
LD₅₀ 1200 mg/kg

GRUPA 2



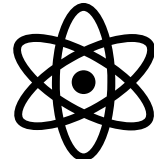
Arsenolipidi (AsL)



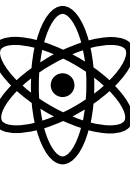


2. Zakonodavstvo Europske unije

- 2021. → EFSA izvještaj o kroničnoj izloženosti arsenu (~ 13 600 rezultata)
- Zaključak → Najveća izloženost anorganskom arsenu iz riže i hrane na bazi riže
- Europska komisija (EC) → Uredba 2023/465 i Uredba 2023/915



Anorganski arsen ($\text{As}^{\text{III}} + \text{As}^{\text{V}}$)	NDK (mg/kg mokre težine)
Žitarice i proizvodi od žitarica	
Nepretkuhana valjana riža (polirana ili bijela)	0,15
Pretkuhana i ljuštena riža	0,25
Rižino brašno	0,25
Rižini vaflji, rižine oblate, rižini krekeri, rižini kolačići, rižine pahuljice i napuhana riža za doručak	0,30
Riža namijenjena proizvodnji hrane za dojenčad i malu djecu	0,10
Bezalkoholna pića na bazi riže	0,030
Početa hrana za dojenčad, prijelazna hrana za dojenčad i hrana za posebne medicinske potrebe namijenjena dojenčadi i maloj djeci te hrana za malu djecu	
– stavljena na tržište kao prah	0,020
– stavljena na tržište kao tekućina	0,010
Dječja hrana	0,020
Voćni sokovi, rekonstituirani koncentrirani voćni sokovi i voćni nektari	0,020
Ukupan arsen (uAs)	
Sol	0,50

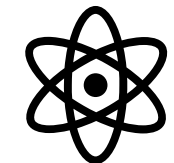


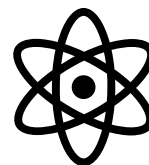
3. Hrana i prisutnost specija arsena



RIŽA

- Glavna i osnovna namirnica za pola populacije
- Ne sadrži gluten, palatabilnost , ne izaziva alergije
- Anaerobni uvjeti uzgoja na poplavljenim poljima
- Koncentracija arsena 10 puta veća nego ostale žitarice
- Mljevenje i poliranje smanjuje konc. arsena
- Anorganski arsen od 70 % do 80 % ovisno o vrsti riže



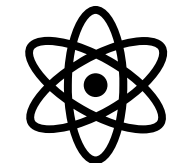


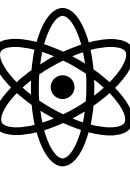
3. Hrana i prisutnost specija arsena



HRANA ZA DOJENČAD I MALU DJECU NA BAZI RIŽE

- Najčešća namirnica za prehranu navedene dobne skupine
- Problem omjera konzumacije prema tjelesnoj masi (veća izloženost)
- Hrana na bazi integralne riže i organski uzgoj → dodatna izloženost
- Velika izloženost u ranijoj dobi → utjecaj na rast i razvoj
- Ukupna konc. arsena nakon industrijske obrade nije smanjena



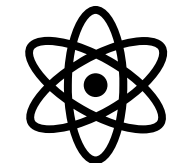


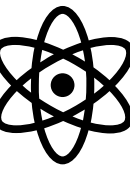
3. Hrana i prisutnost specija arsena



PIĆA NA BILJNOJ BAZI

- Velika popularnost unazad par godina (intolerancija i trendovi)
- Glavni sastojci → kokos, zob, proso, riža, bademi, lješnjaci, konoplja
- Najveće koncentracije anorganskog arsena → glavni sastojak riža
- Najmanja koncentracija → glavni sastojak bademi
- Arsenobetain, MMA i DMA nisu prisutni



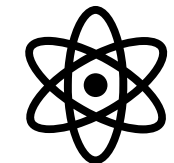


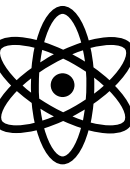
3. Hrana i prisutnost specija arsena



HRANA MORSKOG PORIJEKLA

- Široka grupa morskih organizama (mekušci, školjke, ribe, alge)
- Prevladavaju organske specije arsena (škampi, ribe)
- Anorganske specije → morska trava (Hijiki), slatkovodne ribe (Tajland), plava dagnja (Norveška)
- Mikroalge glavni izvor anorganskog arsena
- Metabolizam iAs → Arsenošećere



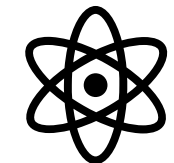


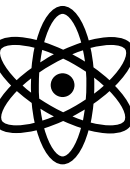
3. Hrana i prisutnost specija arsena



DODACI PREHRANI

- Koncentrirani izvori nutrijenata sa nutritivnim ili fiziološkim efektom
- Kada postoji nedostatak nutrijenata ili tvari u organizmu
- Konzumacija raste iz godine u godinu
- Sintetsko porijeklo (minerali/vitamini)
- Sve veći broj dodataka prirodnog porijekla
- Najveći izvor izloženosti putem dodataka prehrani na bazi algi

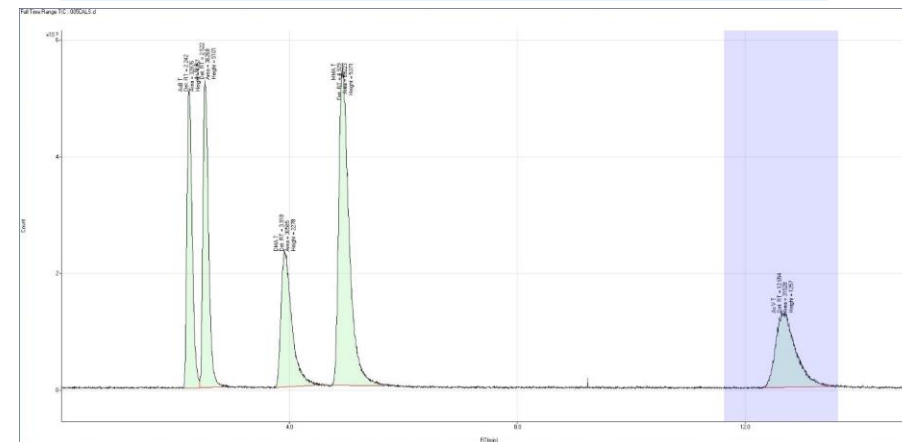
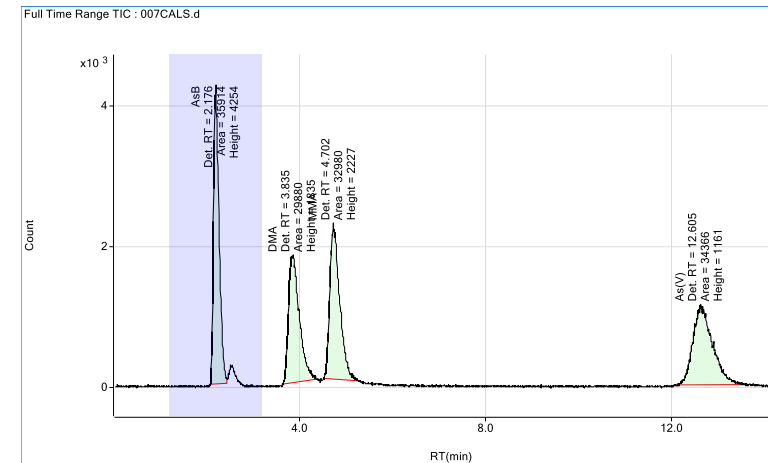


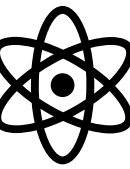


4. Elementna specijacijska analiza arsena

PRIPREMA UZORAKA

- Odabir odgovarajuće metode pripreme uzoraka od iznimne važnosti
- Dobra ekstrakcija bez međukonverzije specija → vrlo izazovno
- Korištenje blagih ekstrakcijskih otapala
- Ponekad potreban korak pročišćavanja

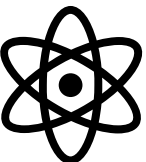
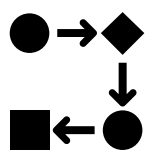


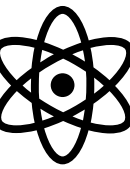


4. Elementna specijacijska analiza arsena

TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA SA ANIONSKOM IZMJENOM

- Analiza velikog broja arsenovih specija (As(III), As(V), MMA, DMA, arsenobetain (AsB), arsenokolin (AsC), Arsenošećeri(AsS)
- Neutralan pH → formiranje anionskih specija (As(V), MMA, DMA),
- As(III) → kao neutralna specija
- Navedena svojstva omogućuju razdvajanje u skladu sa pKa vrijednostima
- Najčešće se koristi kolona sa anionskom izmjenom Hamilton PRP-X100

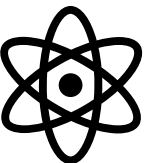
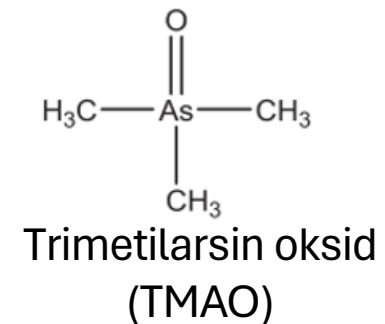
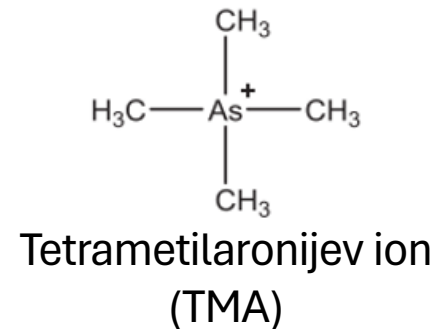
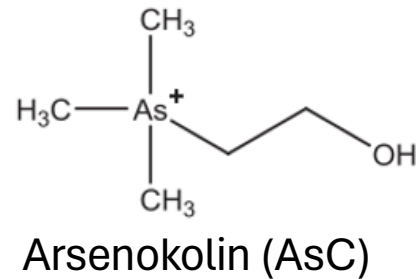
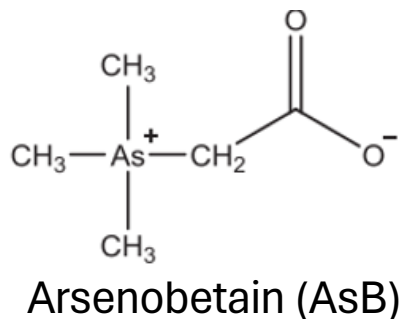


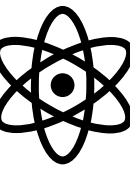


4. Elementna specijacijska analiza arsena

TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA SA KATIONSKOM IZMJENOM

- Za analizu arsenovih specija sa pozitivnim nabojem (AsB, AsC, TMA, TMAO)
- Vrijeme zadržavanja u korelaciji s nabojem
- Kolona sa kationskom izmjenom Hamilton PRP-X200



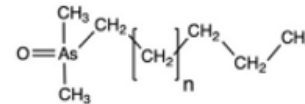


4. Elementna specijacijska analiza arsena

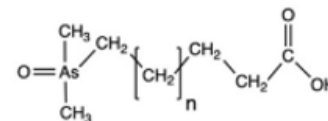
TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA OBRNUTIH FAZA

- Za specijacijsku analizu arsenolipida (AsL)
- ugljikovodici, masne kiseline, fosfolipidi sa As u svojoj strukturi
- C₁₈ ili C₈ analitičke kolone
- Razdvajanje na temelju broja ugljikovih atoma, broju dvostrukih veza i funkcionalnih skupina

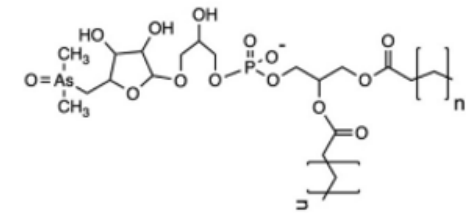
Ugljikovodici koji sadrže arsen (AsHCs)



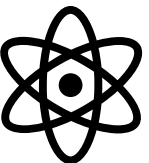
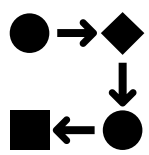
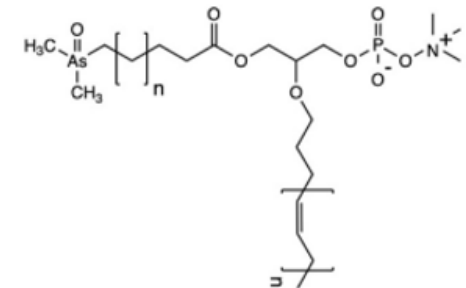
Masne kiseline koje sadrže arsen (AsFAs)

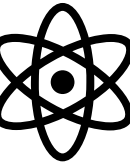
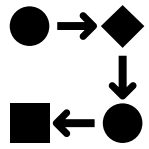


Fosfolipidi koji sadrže arsen (AsPLs)



fosfatidilkolini koji sadrže arsen (AsPCs)

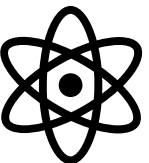


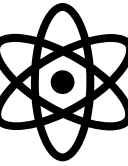
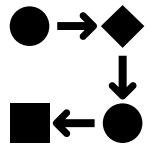


4. Elementna specijacijska analiza arsena

TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA IONSKIH PAROVA

- Za istovremeno razdvajanje ionskih i neutralnih specija
- Analitička kolona obrnutih faza (C_{18}) + mobilna faza sa ionskim parom
- Ionski par (nabijena grupa stupa u interakciju sa analitom, a hidrofobna grupa u interakciju sa stacionarnom fazom)
- Za anionske i neutralne specije → tetrametilamonika, tetrabutilamonijak i tetraetilamonijak
- Za kationske i neutralne specije → heksansulfonska kiselina, 1-pentan sulfonska kiselina

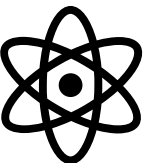


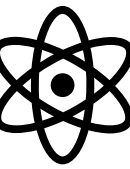


4. Elementna specijacijska analiza arsena

TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA HIDROFILNIH INTERAKCIJA

- Kromatografija s normalnim fazama sa mobilnom fazom za obrnute faze
- Hidrofilna stacionarna faza obložena slojem vode iz mobilne faze
- Vrijeme zadržavanja analita ovisi o njihovom prelasku u vodeni sloj ili adsorpciji na polarnu stacionarnu fazu
- Polarna stacionarna faza → istovremeno razdvajanje neutralnih, anionskih i kationskih As specija

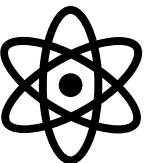
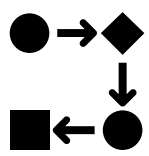


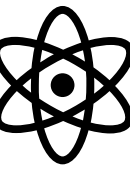


4. Elementna specijacijska analiza arsena

INSTRUMENTNE TEHNIKE ZA DETEKCIJU ARSENOVIH SPECIJA

- Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS)
- Selektivnost, osjetljivost i veliki dinamički raspon
- Reakcijsko-kolizijska ćelija → uklanjanje izobarnih interferencija (na masi 75) → ^{75}As
- ICP-QQQ-MS (kvadrupol-crc-kvadrupol) povećanje selektivnost i smanjenje šuma

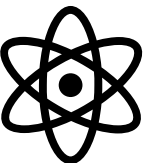
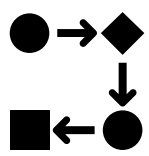


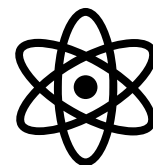


4. Elementna specijacijska analiza arsena

INSTRUMENTNE TEHNIKE ZA DETEKCIJU ARSENOVIH SPECIJA

- Spektrometrija masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS)
- Za identifikaciju arsenovih specija na temelju fragmentacije
- U kombinaciji sa HPLC-ICP-MS tehnikom omogućuje identifikaciju arsenovih specija i otkrivanje strukture
- Kao detektor kada specije arsena eluiraju sa sličnim vremenima zadržavanja

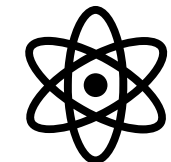


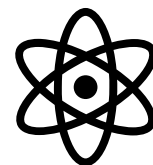


5. Nova saznanja u području specijacije As

IC-MICAP-MS

- Vezani sustav ionske kromatografije s mikrovalno induciranom dušikovom plazmom pri atmosferskom tlaku uz spektrometriju masa (IC-MICAP-MS)
- Kod specijacijske analize elemenata koji su podložni interferencijama u argonovoj plazmi (^{75}As)
- Izobarne interferencije kod Ar plazme \rightarrow $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, $^{36}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^1\text{H}^+$, $^{38}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{36}\text{Ar}^{39}\text{K}$
- Nisu potrebne kompleksne i vrlo skupe procedure za nadvladavanje interferencija pri analizi As
- Manja cijena instrumenta i manja cijena dušika u usporedbi sa argonom
- Idealna primjena i za Ca, Fe, i Se koji također imaju interferencije u standardnoj Ar plazmi

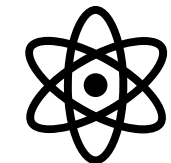
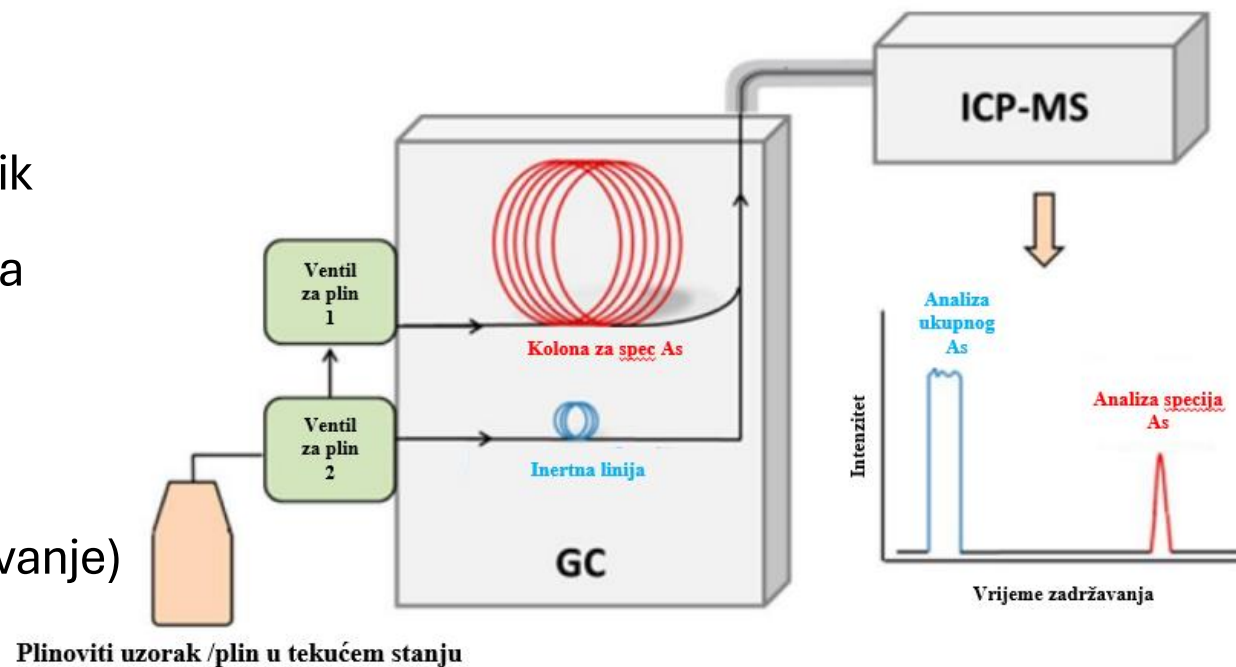


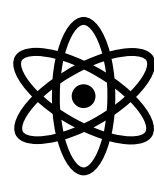


5. Nova saznanja u području specijacije As

GC-ICP-MS

- Za analizu uzoraka u plinovitom stanju i uzoraka gdje je plin preveden u tekući oblik
- Postoji nekoliko metoda za analizu specija arsena navedenom tehnikom
- Direktna analiza
- Analiza putem SPE kolone (ukoncentriravanje)
- Korištenje kriogene stupice (CT)

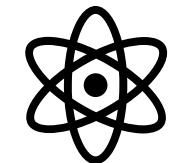


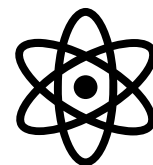


5. Nova saznanja u području specijacije As

KAPILARNA ELEKTROFOREZA

- Veliki potencijal u elementnoj specijaciji arsena kada je dostupna vrlo mala količina uzorka
- Vrlo dobra sposobnost i efikasnost razdvajanja
- Kao dio vezanog sustava sa tehnikom ICP-MS postaje vrlo jak alat u specijaciji
- Najveća problematika takvog vezanog sustava je izvedba dobrog sučelja
- Vrlo bitno → transport visoke efikasnosti i ujednačen protok
- Trenutno najbolje rješenje sučelja je mikrofluidna kapilarna elektroforeza na čipu (μ chip-CE)
- Potrebno samo 25 μ L uzorka

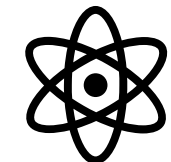


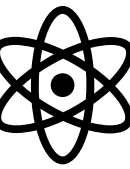


5. Nova saznanja u području specijacije As

NANOMATERIJALI U SPECIJACIJSKOJ ANALIZI ARSENA

- Najveću primjenu u specijacijskoj analizi arsena imaju ugljikove nanostrukture
- Višezidne ugljikove nanocijevčice kao adsorbent koriste se za istovremenu specijaciju arsena, selena i kroma u vodama u okolišu
- Selektivno adsorbiranje pri pH 2,2 za As(V), Cr(VI) i Se(VI) dok se As(III), Cr(III), Se(IV) ne vežu
- Karboksilirani nanoporozni grafen → visoki afinitet za speciju As(V) pri pH 3,5
- Najnovija „on-line” separacija → modificirane Fe₂O₄ magnetske nanočestice
- Adsorpcija ovisi o pH vrijednosti (3 do 4 As(V) i 8 do 10 As(III)) → eluiranje, prereducija i određivanje





6. Zaključak



Veliki broj arsenovih specija → sakupljanje podataka



Provedba metaboličkih i toksikoloških studija



Donošenje zakonskih ograničenja (NDK)



Odabir odgovarajuće pripreme uzoraka i tehnike za razdvajanje i detekciju specija



Razvoj novih vezanih sustava za analizu specija arsena

HVALA NA PAŽNJI!

