

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

SPECIACE ANORGANICKÉHO ARSENU V MATRICI ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU METODAMI SPE-HG-AAS A HPLC-ICP-MS

KAMILA ŠTĚPÁNKOVÁ^{a,b},
ALENA ŠIMÁKOVÁ^a a DAVID MILDE^b

^a Státní veterinární ústav Olomouc, pracoviště Kroměříž, oddělení cizorodých látek, Národní referenční laboratoř pro chemické prvky v potravinách, Hulínská 2286, 767 60 Kroměříž, ^b Katedra analytické chemie, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc kstepankova@svuol.cz

Došlo 24.10.11, přijato 17.1.12.

Klíčová slova: speciální analýza, arsen, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, atomová absorpční spektrometrie s generováním těkavých hydridů

Úvod

V analytické chemii se termín speciace stal pojmem, který vyjadřuje myšlenku, že různé chemické formy prvku by měly být posuzovány individuálně. Přítomnost jedné specie prvku může mít i ve velmi nízkých koncentracích zásadní vliv na živý organismus. Proto znalost celkové koncentrace prvku má velmi nízkou vypovídací hodnotu o skutečné toxicitě vzorku. V roce 2000 vydala Mezinárodní unie pro čistou a aplikovanou chemii (IUPAC) definici pojmů: chemická specie prvku (specifická forma prvku definovaná izotopovým složením, elektronovým nebo oxidačním stavem nebo molekulovou strukturou) a speciální analýza (analytická činnost vedoucí k identifikaci a/nebo stanovení jedné nebo více chemických specií ve vzorku)¹.

Toxické vlastnosti arsenu byly známy již v antickém Řecku (300 let př.n.l.). Arsen se vyskytuje v atmosféře, půdách, sedimentech i živých organismech. Je známo více než 245 minerálů, které obsahují elementární As. Zemská půda obsahuje průměrně 2–3 μg g⁻¹ arsenu. Světová produkce arsenu se pohybuje mezi 75 až 100 tisíc tun za rok. V roce 1990 bylo 70 % získaného arsenu použito k výrobě prostředků na impregnaci dřeva, 22 % k výrobě herbicidů a vysoušecích prostředků, 4 % do skla, 2 % do slitin a 2 % na různé účely².

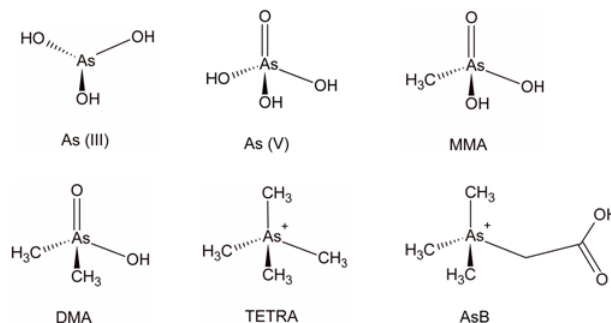
Koncentrace arsenu ve vodě je závislá na geochemickém prostředí. V přírodě bývá vyšší koncentrace arsenu v podzemních vodách, což je důsledek interakce vody s horninou. Přítomnost arsenu v řekách je důsledkem průmyslové činnosti.

Toxicita jednotlivých specií se velmi liší. Zatímco As (III) a As (V) jsou považovány za nejtoxičtější specie, methylované formy arsenu jako monomethylarsenitá kyselina (MMA), dimethylarsenitá kyselina (DMA) a tetramethylarsonium (TETRA) jsou méně toxické než anorganické formy. Organoarsenité specie, ke kterým se řadí arsenobetain (AsB) a arsenocholin (AsC), jsou netoxické (tab. I). Anorganický arsen, který vstupuje do potravinového řetězce, se může v organismu transformovat na MMA, DMA, AsB, AsC a arsenocukry. Například u mořských organismů je dobře známá schopnost nejen As akumulovat, ale také methylovat. V roce 1977, kdy byl arsenobetain izolován, bylo zjištěno, že se jedná o nejzastoupenější specii arsenu u mořských živočichů (80 % a více). Dodnes bylo identifikováno více než 50 různých specií³ (obr. 1).

Anorganický arsen je považován za toxický prvek, který má schopnost se rychle absorbovat z trávicího traktu do krve a dostává se tak do jednotlivých orgánů. Světová zdravotnická organizace (WHO) klasifikovala anorganický

Tabulka I
Hodnoty LD₅₀ u vybraných specií arsenu

Specie	Hodnoty LD ₅₀ [mg kg ⁻¹]
As(III)	15–42
As(V)	20–800
TETRA	890
MMA	700–1800
DMA	1200–2600
AsB	10000



Obr. 1. Nejzastoupenější specie arsenu v mořských organismech

arsen jako karcinogen 1. skupiny, který způsobuje především rakovinu kůže, plic a močového systému, onemocnění spojené s pokožkou, poškození ledvin, anemii a kardiovaskulární onemocnění⁴. WHO doposud stanovila prozatímní tolerovatelný týdenní příjem (PTWI) na $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti, což pro 70 kg člověka odpovídá dennímu příjmu 150 μg .

V roce 2005 vydal Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) prohlášení, že v současnosti měřený obsah celkového arsenu v rybích produktech není dostačující informace k určení toxicity, a je tedy nezbytné stanovit hodnotu anorganického arsenu⁵. V současné době je stanovení specií zmíněno pouze ve směrnici Evropské unie 2002/32/EC o nežádoucích látkách v krmivech, která stanovuje maximální limity pro látky, mezi které patří i arsen. Při překročení max. limitu pro celkový arsen u krmiv získaných ze zpracování ryb nebo jiných mořských živočichů, který je 15 mg kg^{-1} , u moučky z mořských řas a krmivých surovin z mořských řas, který je 40 mg kg^{-1} , a u kompletních krmiv pro ryby a kožešinová zvířata, který je 6 mg kg^{-1} , je v této směrnici uveden požadavek: „Na žádost příslušných orgánů musí odpovědný hospodářský subjekt provést analýzu, aby prokázal, že obsah anorganického arsenu je nižší než 2 ppm“ (cit.⁶). Na zavedení hodnot maximálních limitů pro anorganický arsen do legislativy potravin se v současné době pracuje.

Vzhledem k legislativním požadavkům se jedním z cílů technické komise CEN/TC 327/WG 4 stalo vytvoření Evropské standardní metody pro stanovení anorganického arsenu v krmivech živočišného původu. Jens J. Sloth a Rokle V. Hedegaard z Národního potravinového institutu na Technické univerzitě v Dánsku začali mezi lety 2008 až 2010 tuto metodu vyvíjet a v roce 2010 byla pořádána mezinárodní validační studie (IMEP-32) na stanovení anorganického arsenu metodou SPE-HG-AAS (extrakce na tuhé fázi – hydridová technika atomové absorpční spektrometrie) po asistované mikrovlnné extrakci. Jako Národní referenční laboratoř pro chemické prvky v potravinách jsme se studie zúčastnili spolu s 23 evropskými laboratořemi z 12 zemí. Technická komise CEN/TC 327/WG 4 v současné době pracuje na dokončení této metody CEN na stanovení anorganického arsenu v krmivech živočišného původu metodou SPE-HG-AAS⁷.

Metody speciace arsenu se postupem času měnily. Separace analytů je většinou dosažena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Velmi vhodné je využití iontově-párové i iontově-výměnné chromatografie. Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem bývá využíván jako detektor, který poskytuje vynikající meze detekce. Nevýhodou je tvorba polyatomické interference ArCl^+ , která může být minimalizována využitím HPLC⁸.

Tento článek srovnává výsledky metody SPE-HG-AAS a HPLC-ICP-MS (HPLC s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem) na stanovení anorganického arsenu v živočišné matrici a shrnuje validační parametry pro metodu HPLC-ICP-MS dosažené v naší laboratoři.

Experimentální část

Vzorky

Zkoumaný materiál jsme obdrželi jako účastníci mezilaboratorní validační studie IMEP-32, která byla zaměřena na stanovení anorganického arsenu v krmivech živočišného původu metodou SPE-HG-AAS. Část obdržených vzorků měla přirozený obsah anorganického arsenu a část byla obohacena o anorganický arsen přidavkem standardu.

Seznam zkoumaných vzorků je uveden v tab. II.

Stanovení anorganického arsenu metodou SPE-HG-AAS

Chemikálie a základní roztoky

K přípravě kalibračních roztoků byl použit standardní roztok As o koncentraci 1000 mg l^{-1} (Titrisol, Merck), který byl naředěn demineralizovanou vodou (MiliQ, Milipore, USA) na roztoky o koncentracích v rozsahu 0 až $8,06 \mu\text{g l}^{-1}$.

Příprava vzorku

K navážce 0,2 g testovaného materiálu bylo přidáno 10 ml 3% (v/v) H_2O_2 (Suprapur, Merck) v $0,06 \text{ mol l}^{-1}$ HCl (bez arsenu, Lachner). Vzorky pro obě studované metody byly podrobeny asistované mikrovlnné extrakci. Vzorky byly v mikrovlnném systému při 90°C po dobu 25 min a dalších 7 min probíhalo chlazení. Vzniklá suspenze byla převedena do 15ml polypropylenových zkumavek, odstředěna a supernatant byl slit do čisté polypropylenové zkumavky. 3 ml supernatantu s 3 ml 40 mmol l^{-1} uhličitánu amonného byly znovu odstředěny. Supernatant byl převeden do čisté zkumavky.

Separace na SPE kolonkách

K izolaci anorganického arsenu byly použity SPE kolonky Strata SAX ($55 \mu\text{m}$, 70A Phenomenex), které byly nejdříve kondicionovány 2 ml methanolu (Chromasolv®, SigmaAldrich). Dále se nechalo pomalu prokapat 4 ml připraveného roztoku vzorku. SPE kolonky

Tabulka II

Seznam zkoumaných vzorků

Číslo vzorku	Druh vzorku
1	kompletní krmivo pro ryby
2	kompletní krmivo pro ryby s přidavkem standardu
3	rybí moučka
4	rybí moučka s přidavkem standardu
5	rybí filety s přidavkem standardu
7	rybí moučka s přidavkem standardu
Kontrolní vzorek	CRM TORT-2

byly promyty 3 ml 0,5 mol l⁻¹ kyseliny octové (99 %, p.a., Lachema). Po následném přidavku 1,25 ml elučního roztoku 0,5 mol l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové (bez arsenu, Lachner) byl veškerý eluent odebrán.

Měření HG-AAS

Anorganický arsen byl stanoven na přístroji AAnalyst, FIAS 400 (PerkinElmer) při vlnové délce 193,7 nm. K 1 ml eluentu bylo přidáno 7 ml roztoku 0,06 M KI (Lachner) a kyseliny askorbové o koncentraci 0,06 mol l⁻¹ (Lachner) ve 3 M HCl (bez arsenu, Lachner). Roztok byl ponechán 60 min při pokojové teplotě a následně bylo přidáno 6 ml 3 M HCl (bez arsenu, Lachner). Před měřením se roztok ještě 60 min nechal stát.

Stanovení anorganického arsenu metodou HPLC-ICP-MS

Chemikálie a základní roztoky

K přípravě kalibračních roztoků byl použit standardní roztok As o koncentraci 1000 mg l⁻¹ (Titrisol, Merck), monomethylarsenitan sodný, sesquihydrát, (čistota ≥ 98 %, Supelco), kyselina dimethylarseničná (98 %, SigmaAldrich) a arsenobetain, p.a. (čistota ≥ 95 %, Fluka). K přípravě kalibračních roztoků o koncentracích v rozsahu 5–25 µg l⁻¹ každé specie byl použit pracovní roztok o koncentraci 1 mg l⁻¹ každé specie.

Mobilní fáze o složení 0,005 mol l⁻¹ (NH₄)₂HPO₄ a 0,01 mol l⁻¹ NH₄NO₃, pH 8,9 byla připravena za použití chemikálií (NH₄)₂HPO₄, p.a. (Merck), kyseliny dusičné 65 %, (Trace SELECT, Fluka) a 26% vodného roztoku amoniaku, p.a. (Lachema) v supračisté vodě.

Příprava vzorku

Byla identická s přípravou vzorku k metodě SPE-HG-AAS.

Separace na HPLC koloně

K separaci 4 specií arsenu (AsB, DMA, MMA, anorganický arsen) byla využita aniontově-výměnná kolona Hamilton PRP-X100, 150 × 4,6 mm, 5 µm za použití předkolony Hamilton PRP-X100, 10 × 4,6 mm. Průtok mobilní fáze kolonou byl 1 ml min⁻¹ a teplota kolony byla 20 °C. Nastříkovaný objem byl 100 µl a celková délka analýzy 12 min. K promývání autosampleru byl použit 5% (v/v) vodný roztok methanolu. Separace specií probíhala na přístroji HPLC Series 200 (PerkinElmer).

Měření ICP-MS

Jednotlivé specie byly detegovány na přístroji ICP-MS ELAN DRC-e (PerkinElmer), který byl vybavený koncentrickým zmlžovačem a cyklonickou mlžnou komorou. Měření probíhalo ve standardním modu, bez využití DRC modu, a podmínky jsou uvedeny v tab. III.

Tabulka III
Podmínky detekce ICP-MS

Parametry ICP-MS	Hodnota
Příkon do plazmatu	1100 W
Trvání odečtu signálu (dwell time)	250 ms
Počet skenů na opakování (sweeps/replicate)	10
Počet opakování	3
Režim Autolens	vypnuto
Měřicí mód	odečet na vrcholu píku
Průtok Ar zmlžovačem	0,7 – 1,1 l min ⁻¹ (optimalizováno)
Napětí na iontové optice	6–9 V (optimalizováno)
Měřený nuklid	⁷⁵ As

Výsledky a diskuse

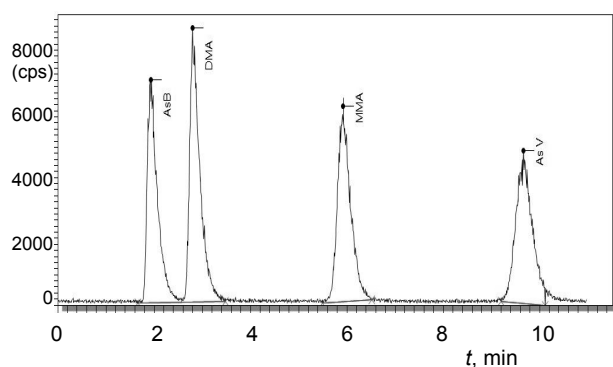
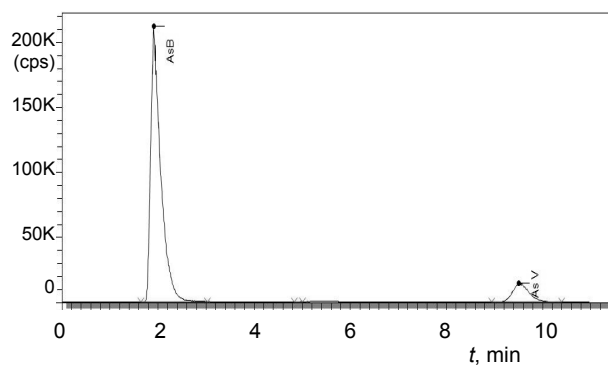
Anorganický arsen byl stanoven metodami SPE-HG-AAS a HPLC-ICP-MS ve dvou různých dnech. Každý připravený vzorek byl měřen dvakrát a v každý den měření byly provedeny dvě opakování přípravy, tedy pro každý vzorek bylo získáno 8 výsledků pro každou metodu. Z výsledků validační studie IMEP-32 byla určena vztažná hodnota pro jednotlivé vzorky. V tab. IV jsou uvedeny vztažné hodnoty a srovnání s výsledky koncentrací anorganického arsenu obou použitých metod.

U vzorku č. 1 s nejnižší hodnotou koncentrace anorganického arsenu (0,071 mg kg⁻¹) se metodou HPLC-ICP-MS nepodařilo anorganický arsen detegovat, na rozdíl od metody SPE-HG-AAS, u které byla výtěžnost 45 %. U vzorků č. 2, 3, 4, 5, 7 a kontrolního vzorku byly výtěžnosti u metody SPE-HG-AAS v rozmezí 70–106 %. Dvě nejnižší hodnoty výtěžností 70 % a 77 % byly u vzorku č. 3 a kontrolního vzorku, které byly bez přidavku standardu. U metody HPLC-ICP-MS se výtěžnosti pohybovaly v intervalu 95–120 %. V kontrolním vzorku nebyla stanovena koncentrace anorganického arsenu z důvodu nedostatku testovaného materiálu. Poměr výsledků výtěžností metody HPLC-ICP-MS ku SPE-HG-AAS se pohyboval pro jednotlivé vzorky v intervalu 1,07–1,31.

Validace metody HPLC-ICP-MS

Pro potřeby naší laboratoře byla metoda zvalidována.

Výtěžnost a opakovatelnost byla stanovena pro 4 specie na 3 hladinách vždy z 10 měření. Na první hladině měřením obohaceného blanku na koncentraci 0,03 mg kg⁻¹, na druhé hladině měřením obohaceného vzorku krmiva pro ryby s přidavkem ke vzorku 0,12 mg kg⁻¹ každé specie a na třetí hladině měřením obohaceného vzorku rybí moučky s přidavkem ke vzorku 1,15 mg kg⁻¹ každé specie.

Obr. 2. Chromatogram standardního roztoku 10 µg l⁻¹

Obr. 3. Chromatogram vzorku rybích filetů č. 5

Tabulka IV
Srovnání výsledků z metody HPLC-ICP-MS a SPE-HG-AAS

Vzorek	Vztažná hodnota [mg kg ⁻¹]	Výsledky [mg kg ⁻¹] průměr ± SD SPE-HGAAS	Výsledky [mg kg ⁻¹] průměr ± SD HPLC-ICP-MS	Výtěžnost SPE-HG-AAS	Výtěžnost ICP-MS	Poměr výsledků výtěžnosti HPLC-ICP-MS/SPE-HG-AAS	Přídavek standardu
1	0,071	0,032 ± 0,018	nedetekováno	45 %	n.d.	n.d.	ne
3	0,189	0,145 ± 0,019	0,180 ± 0,015	77 %	95 %	1,24	ne
7	0,432	0,387 ± 0,008	0,413 ± 0,035	90 %	96 %	1,07	ano
Kontrolní vzorek	0,544	0,383 ± 0,045	Neměřeno	70 %	–	–	ne
2	0,713	0,601 ± 0,022	0,790 ± 0,060	84 %	111 %	1,31	ano
4	1,062	1,042 ± 0,027	1,176 ± 0,047	98 %	111 %	1,13	ano
5	2,643	2,799 ± 0,545	3,169 ± 0,139	106 %	120 %	1,13	ano

Výpočty byly prováděny softwarem Chromera, programem Microsoft Excel a EffiValidation (tab. V).

Parametry kalibrační křivky byly stanoveny z měření kalibračních standardních roztoků všech specií arsenu softwarem Chromera a metodou EffiValidation: „Korelační a QC koeficient“. Linearita byla prokázána v koncentračním rozsahu 0–25 µg l⁻¹. Meze detekce a stanovitelnosti byly vypočteny metodou EffiValidation: „3 S – IUPAC“ z výsledků měření 10 spikovaných slepých vzorků na koncentraci 0,03 mg kg⁻¹ každé specie (tab. VI).

Opakovatelnost nástřiků roztoku standardu byla prověřena 10 opakovanými nástřiky standardního roztoku o koncentraci 10 µg l⁻¹ všech 4 specií arsenu. Je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka a ze záznamů softwaru Chromera byla vypočtena v programu Microsoft Excel. Hodnoty směrodatné odchylky pro jednotlivé specie se pohybovaly v rozmezí 0,33–0,41 µg l⁻¹.

Rozlišení pík bylo ověřeno metodou EffiValidation 3.0 – „Rozlišení pík dle Ph.Eur.“ na chromatogramu standardních roztoků o koncentraci 10 µg l⁻¹ všech čtyř specií

arsenu. Hodnota rozlišení pík AsB-DMA a DMA-MMA je 1,2. Pro píky MMA-AsV je rozlišení 8,2.

Faktor symetrie pík byl vypočítán metodou EffiValidation 3.0 – „Faktor symetrie dle Ph.Eur.“ podle chromatogramu standardních roztoků o koncentraci 5 µg l⁻¹ všech čtyřech specií arsenu (AsB – 1,50; DMA – 1,58; MMA – 1,03; As(V) – 1,00).

Odhad nejistoty měření byl proveden v souladu s dokumentem EA – 4/16: Vyjadřování nejistot v kvantitativním zkoušení⁹. Byla spočítána rozšířená nejistota U (U = k · u; použitý koeficient rozšíření k pro 95% pravděpodobnost se rovná 2). Odhad nejistoty byl spočítán pro 4 specie na třech koncentračních hladinách (10⁻²; 10⁻¹ a 10⁰ mg kg⁻¹) pro AsB (21 %, 7 % a 8 %), DMA (31 %, 12 % a 7 %), MMA (43 %, 10 % a 9 %) a As(V) (45 %, 10 % a 8 %).

Jako Národní referenční laboratoř pro chemické prvky jsme se z finančních důvodů rozhodli zvalidovat pouze metodu HPLC-ICP-MS. I přes vyšší náklady na provoz se metoda jeví časově méně náročná. K dalším výhodám patří

Tabulka V
Validační parametry metody – výtěžnost a opakovatelnost

Specie	Hladina 10^{-2} mg kg ⁻¹		Hladina 10^{-1} mg kg ⁻¹		Hladina 10^0 mg kg ⁻¹	
	výtěžnost [%]	opakovatelnost [%]	výtěžnost [%]	opakovatelnost [%]	výtěžnost [%]	opakovatelnost [%]
AsB	103	10	98	1,8	96	1,8
DMA	96	15	100	5,0	101	1,4
MMA	95	21	107	3,6	100	3,3
Anorg. As	90	22	106	3,6	100	2,0

Tabulka VI
Validační parametry metody – korelační koeficient, LOD a LOQ

Specie	Korelační koeficient	LOD [mg kg ⁻¹]	LOQ [mg kg ⁻¹]
AsB	0,99946	0,01	0,03
DMA	0,99845	0,01	0,05
MMA	0,99913	0,02	0,07
Anorg. As	0,99944	0,02	0,07

možnost sledování koncentrací dalších tří specií, což metoda HG-AAS neumožňuje.

Závěr

V roce 2010 jsme se jako Národní referenční laboratoř pro chemické prvky spolu s dalšími 23 laboratořemi z 12 zemí zúčastnili mezinárodní validační studie IMEP-32 na stanovení anorganického arsenu v krmivech živočišného původu metodou SPE-HG-AAS. Jako účastníci jsme obdrželi 6 vzorků a jeden kontrolní vzorek v koncentračním rozsahu 0,07–2,6 mg kg⁻¹, které jsme podrobili analýze. Z celkového počtu laboratoří poslalo výsledky 19. Další 9 laboratoří bylo vyřazeno ze statistického vyhodnocení z důvodu nahlášení abnormálních výsledků nebo technických problémů. Výsledky naší laboratoře byly do statistického hodnocení zařazeny s výjimkou výsledku u vzorku č. 2, kde byla hodnota vyloučena jako odlehlá.

Na základě statistického zpracování zasláných výsledků byla metoda vyhodnocena jako vhodná pro stanovení anorganického arsenu v krmivech živočišného původu metodou SPE-HG-AAS. K zamyšlení však zůstává důvod, proč z celkového počtu původně přihlášených laboratoří bylo schopno zaslat vyhodnotitelné výsledky jen 43 % zúčastněných. Většina laboratoří uvedla technické problémy a data ze tří laboratoří byla vyloučena pro systematickou chybu (výsledky byly buď příliš nízké, nebo vysoké).

Pokud metoda bude schválena jako oficiální, bude se jednat o další důležitý krok pro speciální analýzu arsenu v krmivech. Bohužel do dnešního dne se žádná legislativa ani oficiální metoda netýká anorganického arsenu v potravinách, ačkoliv se toxicita jednotlivých specií arsenu tolik liší. Jedním z důvodů je, že pro stanovení maximálních limitů pro anorganický arsen nemá Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) shromážděno dostatek dat. Jedná se o začarovaný kruh, kdy laboratoře nemají důvod zavádět metody a poskytovat výsledky pro stanovení specií, protože nejsou v legislativě, a tím pádem chybí data, na jejichž základě by se mohly stanovit maximální limity. Prvním krokem k získání dat pro koncentraci anorganického arsenu v potravinách ze strany EU referenční laboratoře bylo v roce 2010 uspořádání mezilaboratorního porovnání na stanovení anorganického arsenu v rýži (IMEP 107), kterého jsme se zúčastnili za použití metody HPLC-ICP-MS. V roce 2011 proběhlo další mezilaboratorní porovnání na stanovení anorganického arsenu v mouce, zelenině a řasách pod názvem IMEP 112. Ve všech výše uvedených výsledcích mezilaboratorního porovnání jsme byli hodnoceni pozitivně. Výsledky z těchto testů jsou dány k dispozici pracovní skupině národních expertů průmyslových kontaminantů a kontaminantů životního prostředí k určení maximálních hodnot v některých potravinách a jejich začlenění do legislativy. U arsenu se v nejbližší době plánuje stanovit maximální limity anorganického arsenu v rýži, dětské výživě, cereáliích, řasách a doplňcích stravy.

Použité zkratky

CEN	The European Committee for Standardization, Evropský výbor pro normalizaci
DMA	kyselina dimethylarsenitá
EFSA	evropský úřad pro bezpečnost potravin
HG-AAS	atomová absorpční spektrometrie – hydridová technika
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IMEP	International Measurement Evaluation Programme

LD ₅₀	Jedná se o množství látky, po které uhynulo 50 % testovaných živočichů za 24 hodin po expozici.
MMA	kyselina monomethylarsenitá
SPE	solid phase extraction
TC327/WG1	Technická komise, Technical committee, Animal feedingstuffs – Methods of sampling and analysis
TETRA	tetramethylarsoniový ion
TMAO	trimethylarsenid oxid

LITERATURA

1. Temleton D. M., Arbese F., Cornelis R., Danielson L.-G., Muntau H., Van Leeuwen H. P., Lobinski R.: *Pure Appl. Chem.* 72, 1453 (2000).
2. Cornelis R., Crews H., Causo J., Heumann K. Chichemster: *Handbook of Elemental Speciation II – Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health.*, J. Wiley, West Sussex 2005.
3. Francesconi K. A., Kuehnelt D.: *Analyst* 129, 373 (2004).
4. U.S. Environmental Protection Agency: Toxicity and Exposure Assessment for Children's Health, Inorganic arsenic – TEACH Chemical Summary (U.S.EPA 2007).
5. European Food Safety Authority: Opinion of the scientific panel on contamination in the food chain on a request from the commission related to arsenic undesirable substance in animal feed, N°EFSA-Q-2003-031 (EFSA 2005).
6. Evropský Parlament a Rada Evropské Unie: Směrnice Evropského Parlamentu a Rady 2002/32/ES ze dne 7. května 2002 o nežádoucích látkách v krmivech, úř. věst. L 14 (ES 2002).

7. Sloth J. J., Cordeiro F., Rasmussen R. R., Hedegaard R. V., Emteborg H., Verbist I., Danier J., Calle M. B.: IMEP-32: Determination of inorganic arsenic in animal feed of marine origin, A Collaborative Trial Report, January 2011.
8. Ackley K. L., B'Hymer C., Sutton K. L., Caruso J. A.: *J. Anal. At. Spectrom.* 14, 845 (1999).
9. Český institut pro akreditaci: Směrnice EA o vyjadřování nejistoty v kvantitativním zkoušení, EA – 4/16 (ČIA 2004).

K. Štěpánková^{a,b}, A. Šimáková^a, and D. Milde^b

(^a *Department of Residues, National Reference Laboratory for Chemical Elements, State Veterinary Institute, Kroměříž*, ^b *Department of Analytical Chemistry, Palacký University Olomouc*): **Speciation of Inorganic Arsenic in Animal Matrices by the SPE-HG-AAS and HPLC-ICP-MS Methods**

Our National reference laboratory for chemical elements participated in a collaborative study in 2011. This study was conducted in accordance with international protocol to determine the performance characteristic of an analytical method for determination of inorganic arsenic in animal feed of marine origin. The method was based on solid phase extraction from organoarsenic compounds followed by detection with hydride generation atomic absorption spectrometry. This article focuses on comparison of two different methods of inorganic As speciation: solid phase extraction followed by detection with hydride generation AAS (used in validation study) and HPLC followed by new modified method inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). The method HPLC-ICP-MS was used and validated for determination of arsenobetaine, dimethylarsinic acid, monomethylarsonic acid and inorganic arsenic.