

Legislativní a bezpečnostní aspekty speciace toxických prvků v potravinách a farmaceutických materiálech.

LEGISLATIVE AND SAFETY ASPECTS OF SPECIATION OF TOXIC ELEMENTS IN FOOD AND PHARMACEUTICAL MATERIALS

Miroslav Fišera, H. Velichová, D. Sumczynski

 Ambis.Vysoká škola.

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

VITATOX 2023

Ústav analýzy a chemie potravin
Fakulta technologická UTB ve Zlíně
Vavrečkova 275, 762 72 Zlín, ČR



SPECIAČNÍ ANALÝZA

SPECIACE

je termín pro popis **distribuce** nejméně dvou různých prvkových forem v systému.

SPECIE

je definována jako **forma prvku** charakterizovaná svým isotopickým složením, elektronovým nebo oxidačním stavem a/nebo strukturou molekuly nebo komplexu.

SPECIAČNÍ ANALÝZA

zahrnuje analytické aktivity zaměřené na **identifikaci a/nebo měření** množství jedné nebo více jednotlivých forem (specií) ve vzorku.

Prvky vhodné pro speciaci

- Výskyt prvků v různých oxidačních stupních
- Výskyt prvků v různých chemických formách (různé vazby)
- **Odlišné vlastnosti různých forem** (fyziologické působení, toxicita, biodostupnost)

(As, Se, Hg, Sn, Cr, Sb, Bi, Te,)

Specie a oblasti zájmu speciální analýzy

Biochemie rostlin a zvířat, ekotoxikologie, výživa

Organokovové specie
arsenobetain, arsenocholin,
selenoaminokyseliny

Makrocykly
deriváty chlorofylu,
kobalaminy

Metalothioneiny Cd, Cu, Zn
Cd, Cu, Zn

Fytochelatiny

Cd, Cu, Zn, Co, As

Metaloenzymy
Zn, Mo, Co

Redoxní stavy
As(III)/As(V), Cr(III)/Cr(VI),
Se(IV)/Se(VI), Sb(III)/Sb(V),
Fe(II)/Fe(III)

Polysacharidy
Pb, Sr, Ba, Ca, Mg

Léčiva na bázi organokovů
Pt, Ru, Ti

Alkylované kovy
 $Me_n Sn^{(3-n)+}$, $Bu_n Sn^{(3-n)+}$,
 $Ph_n Sn^{(3-n)}$, $Me_n Ge^{(4-n)}$
 n^+ , $Me_2 Hg$, $Et_2 Hg$,
 $MeHg^+$, $Me_n Et_m Pb^{(4-m-n)}$,
 $MeCd^+$, $Me_2 Cd$

Specie kovů a polokovů

Nukleové kyseliny
Cr, Ni, Pt, Ru

Metaloporfyriny
Ni, V, Fe, Ga

Transportní proteiny
Al, Cu, Zn, Fe

Katalytické směsi
Ni, Rh, Ru

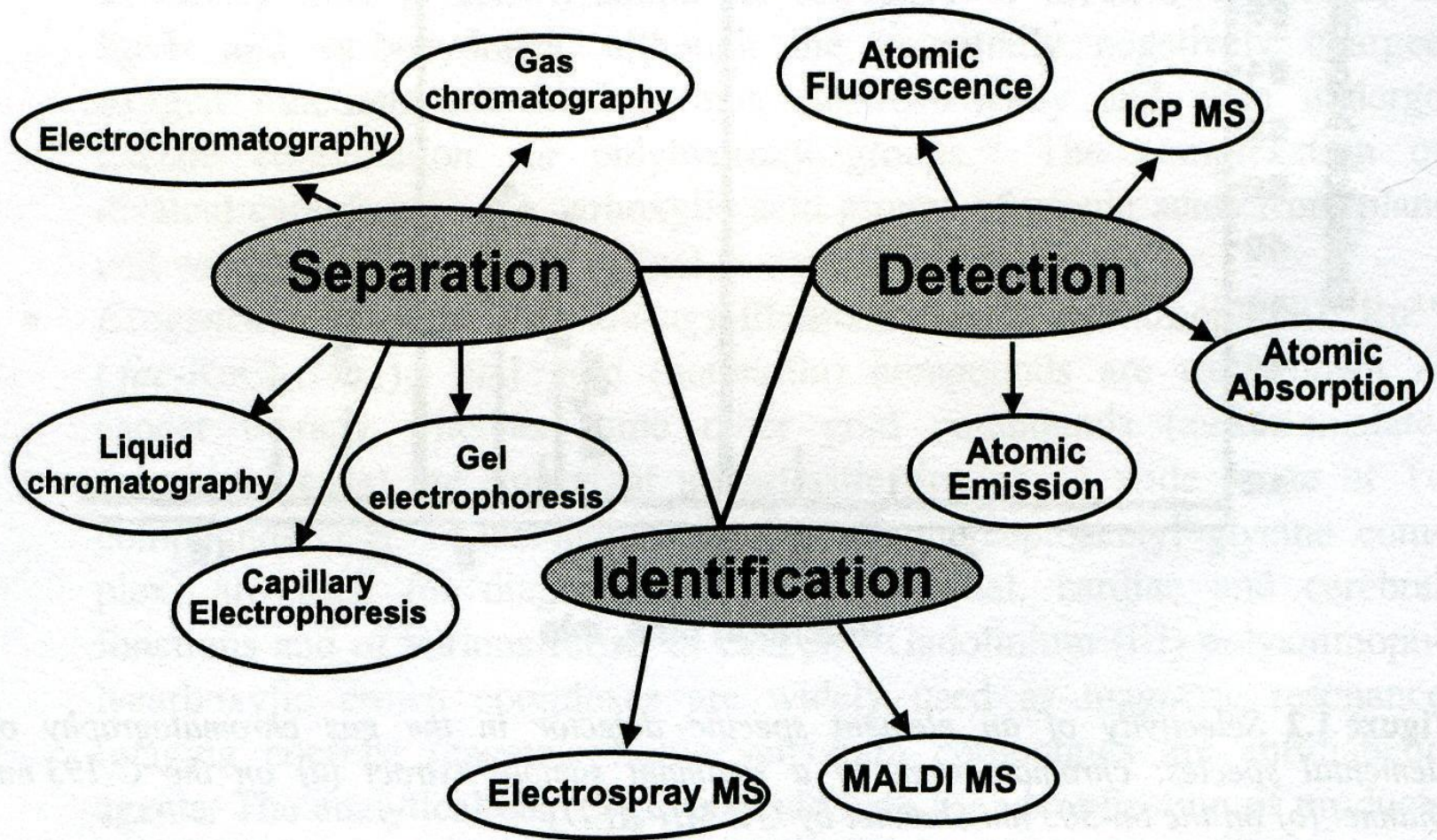
Organicky vázaná rtuť a arsen
nafta z živičné břidlice, benzín,
kondenzáty přírodních plynů

Průmyslová chemie

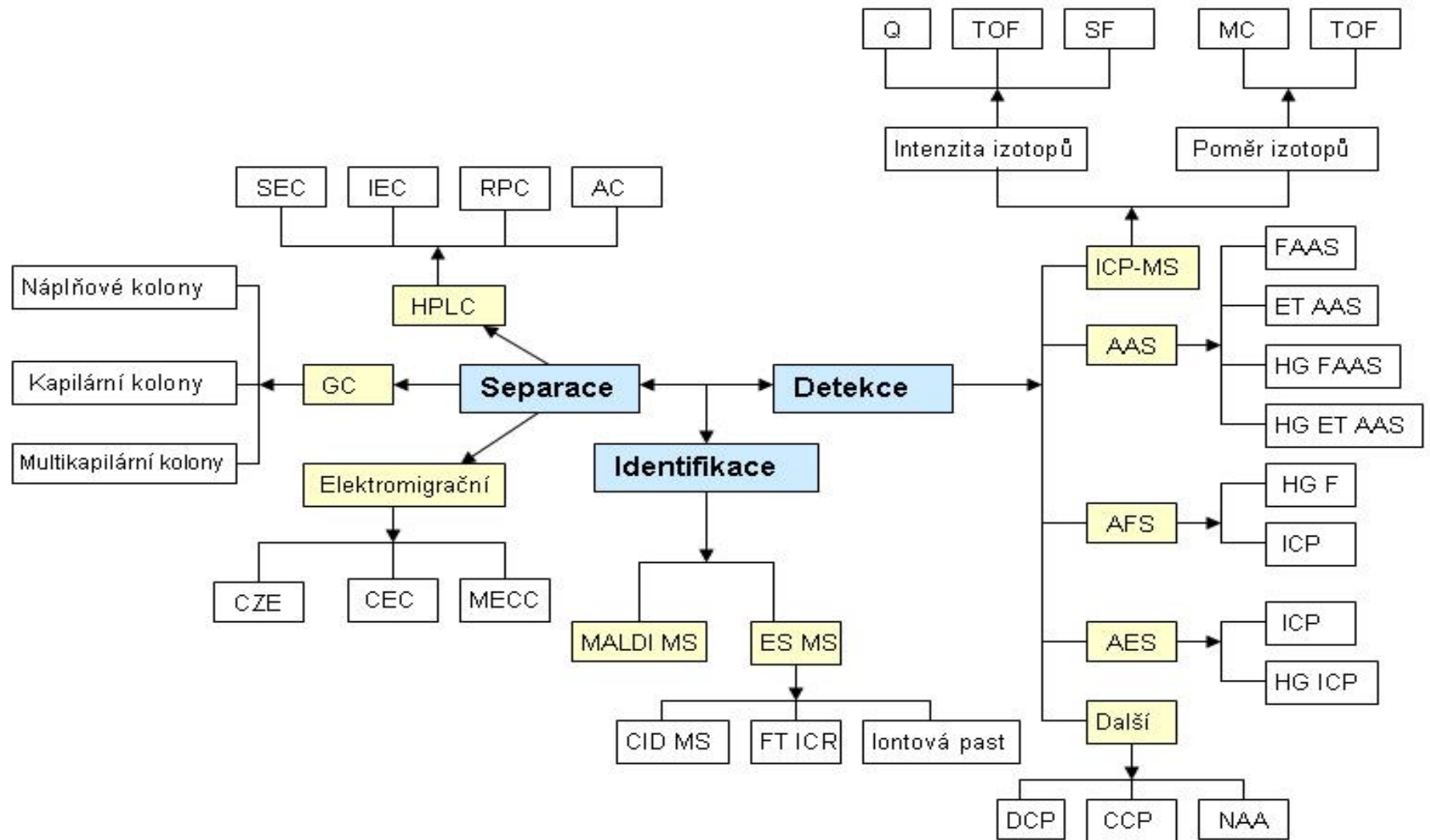
Životní prostředí (chemie vody a ovzdušší)

Klinická biochemie

Spojené metody pro speciální analýzu



Spojené metody pro speciální analýzu



CELKOVÉ POSTUPY VHODNÉ PRO SPECIACI

ÚPRAVA VZORKU

- Extrakce
- Sorpce
- SPE
- US podpora

SEPARACE

- Gelová permeační chromatografie
- Iontově výměnná chromatografie
- CZE
- HPLC

DETEKCE

- AAS
- AFS
- ICP – OES
- ICP - MS

CELKOVÉ POSTUPY VHODNÉ PRO SPECIACI

ÚPRAVA VZORKU

- ❑ Extrakce
- ❑ Sorpce
- ❑ SPE
- ❑ US podpora

SEPARACE

- ❑ Gelová permeační chromatografie
- ❑ Iontově výměnná chromatografie
- ❑ CZE
- ❑ HPLC

DETEKCE

- ❑ AAS
- ❑ AFS
- ❑ ICP – OES
- ❑ ICP - MS

CELKOVÉ POSTUPY VHODNÉ PRO SPECIACI

ÚPRAVA VZORKU

- ❑ Extrakce
- ❑ Sorpce
- ❑ SPE
- ❑ US podpora

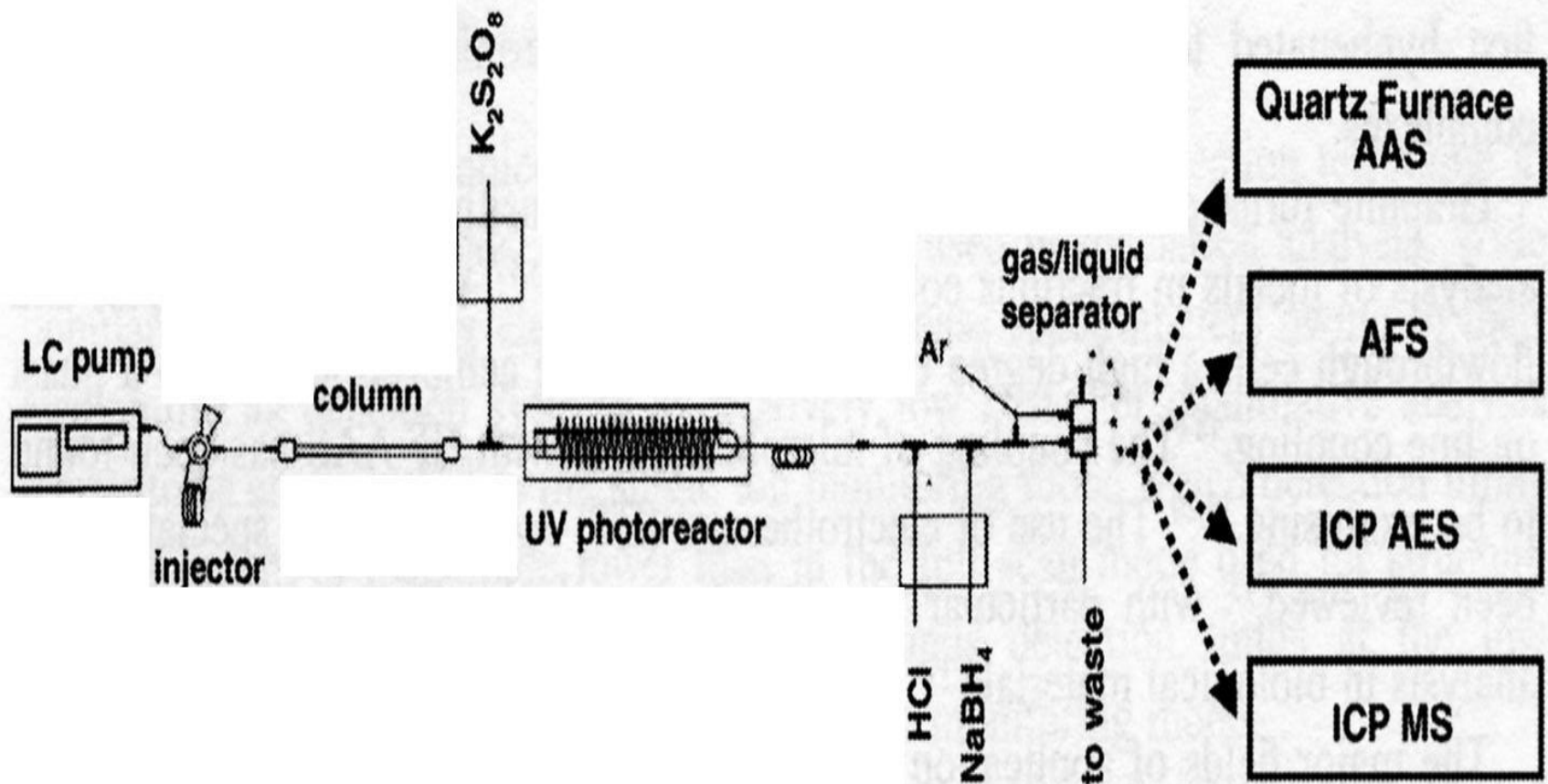
SEPARACE

- ❑ Gelová permeační chromatografie
- ❑ Ionově výměnná chromatografie
- ❑ CZE
- ❑ HPLC

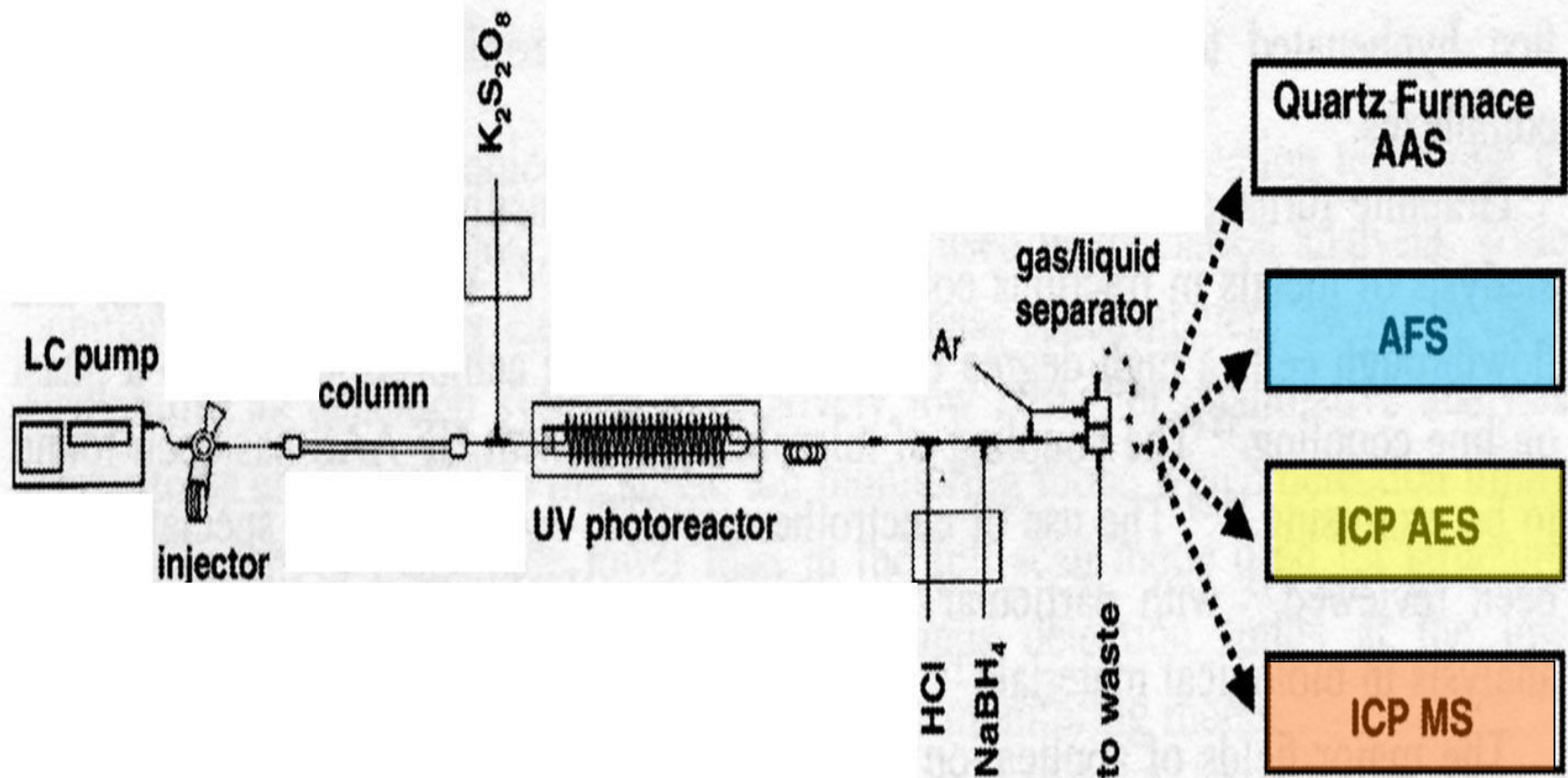
DETEKCE

- ❑ AAS
- ❑ AFS
- ❑ ICP – OES
- ❑ ICP - MS

Spojené metody pro speciální analýzu - **VARIACE DETEKCE**



Spojené metody pro speciální analýzu - **VARIACE DETEKCE**



AFS - Fluorescenční detektor

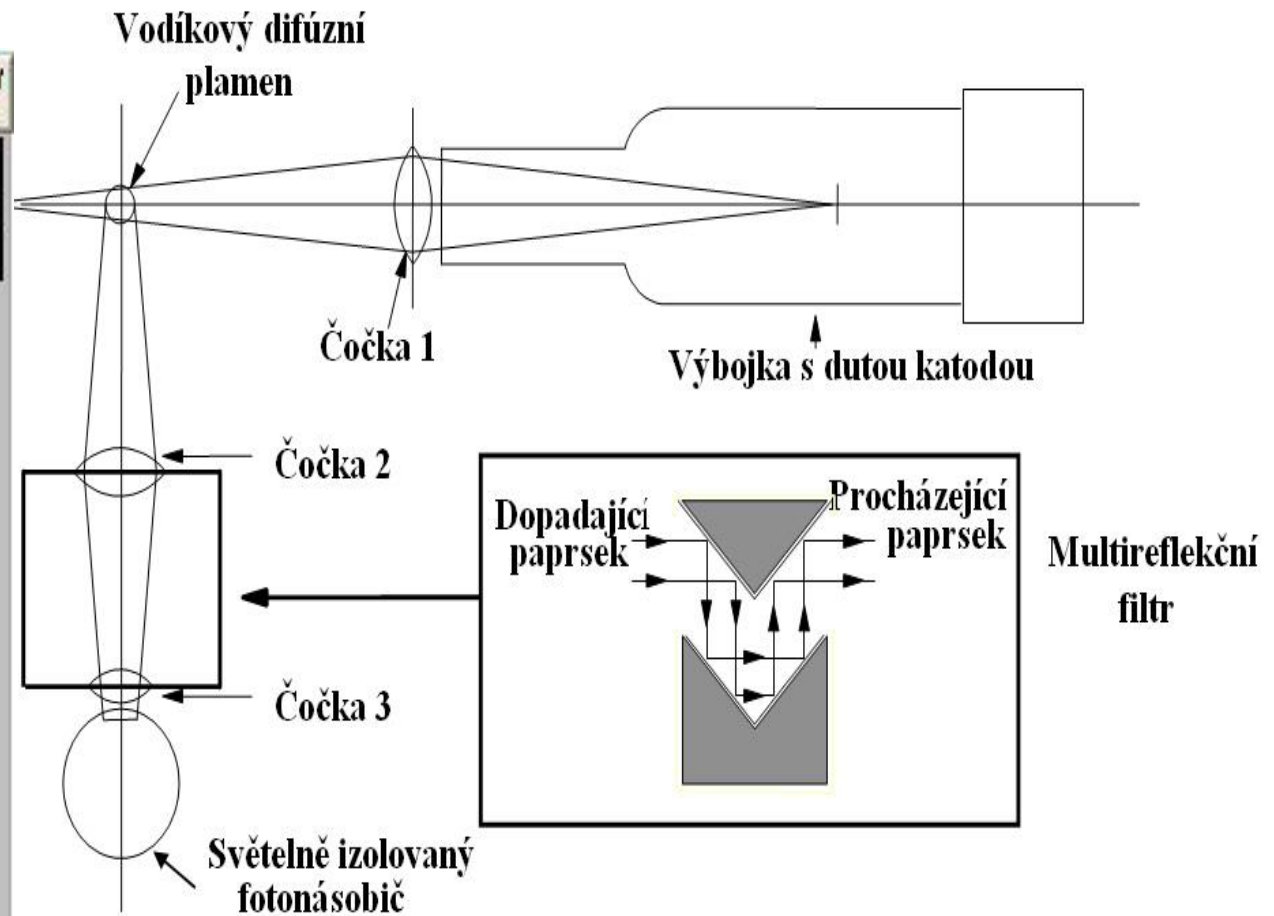
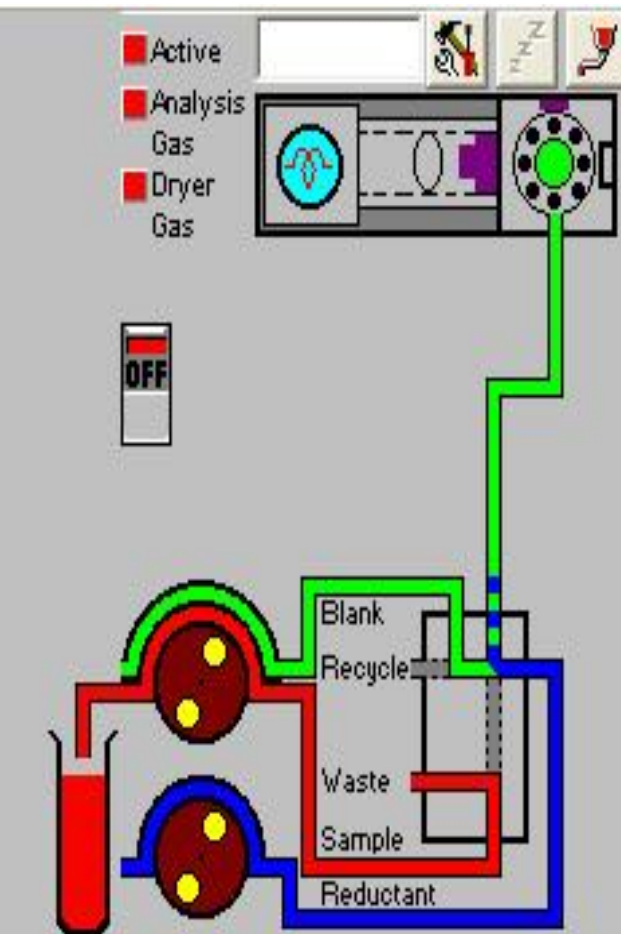
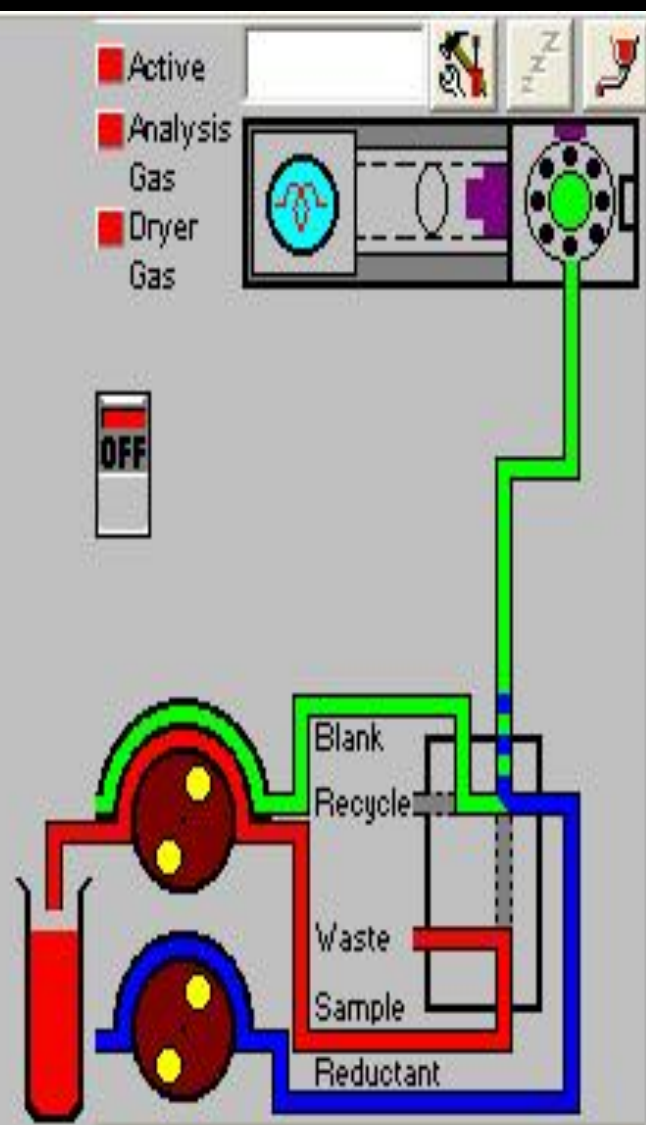


Schéma fluorescenčního detektoru

AFS - Fluorescenční detektor

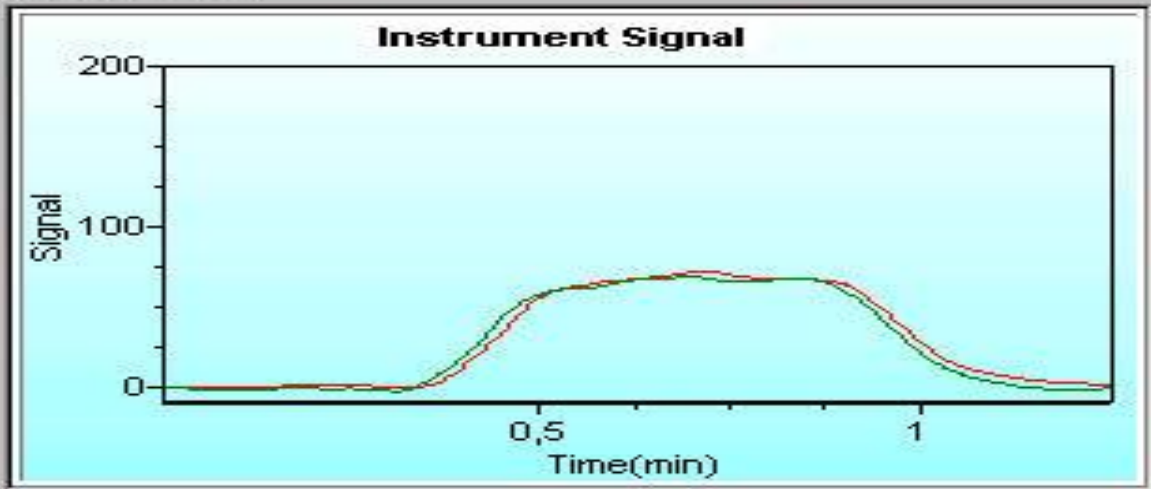


Kalibrace 0 - 2 ppb Se

Result Details

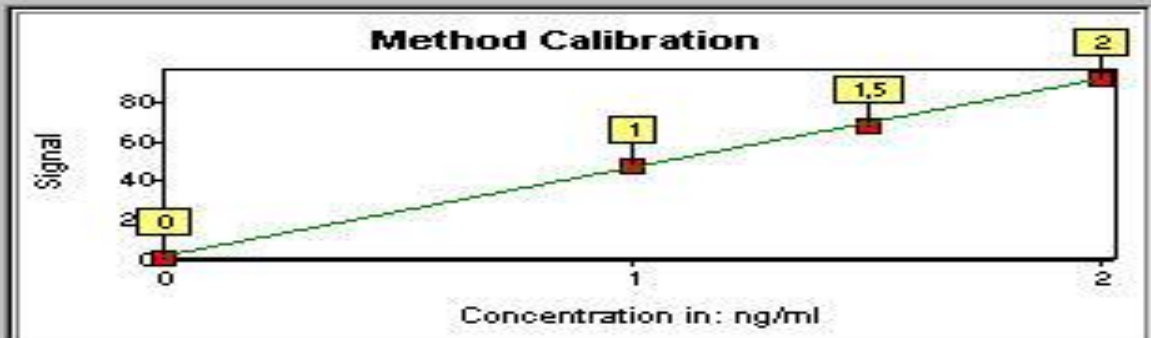
Pos	M
Runs	2
Type	Sample
Name	
ID/Action	
Conc	1,539302
Pk Ht	70,671066
Pk Area	2194,161377
Baseline	-0,619452
SD	0,022735
RSD	1,480000

AutoScale



Calibration Details

Measured by	
Fit type	Least Squares
Unit	ng/ml
Slope	44,685284
Intercept	1,886957
Correlation Coef.	0,999568
Reslope %	0,000000



Include	Pos	Runs	Conc	Pk Ht	Pk Area	Res %	Res Conc	Date/Time
Yes	M	2	0	1,673601	21,794600	0,000000	-0,004775	15 2004 11:28
Yes	M	2	1	47,728764	1459,911743	2,588152	0,025882	15 2004 11:32
Yes	M	2	1,5	67,455254	2049,878174	-2,177643	-0,032665	15 2004 11:35
Yes	M	2	2	91,773979	2824,06396	0,577881	0,011558	15 2004 11:41

Kalibrace 0 - 400 ppt Se

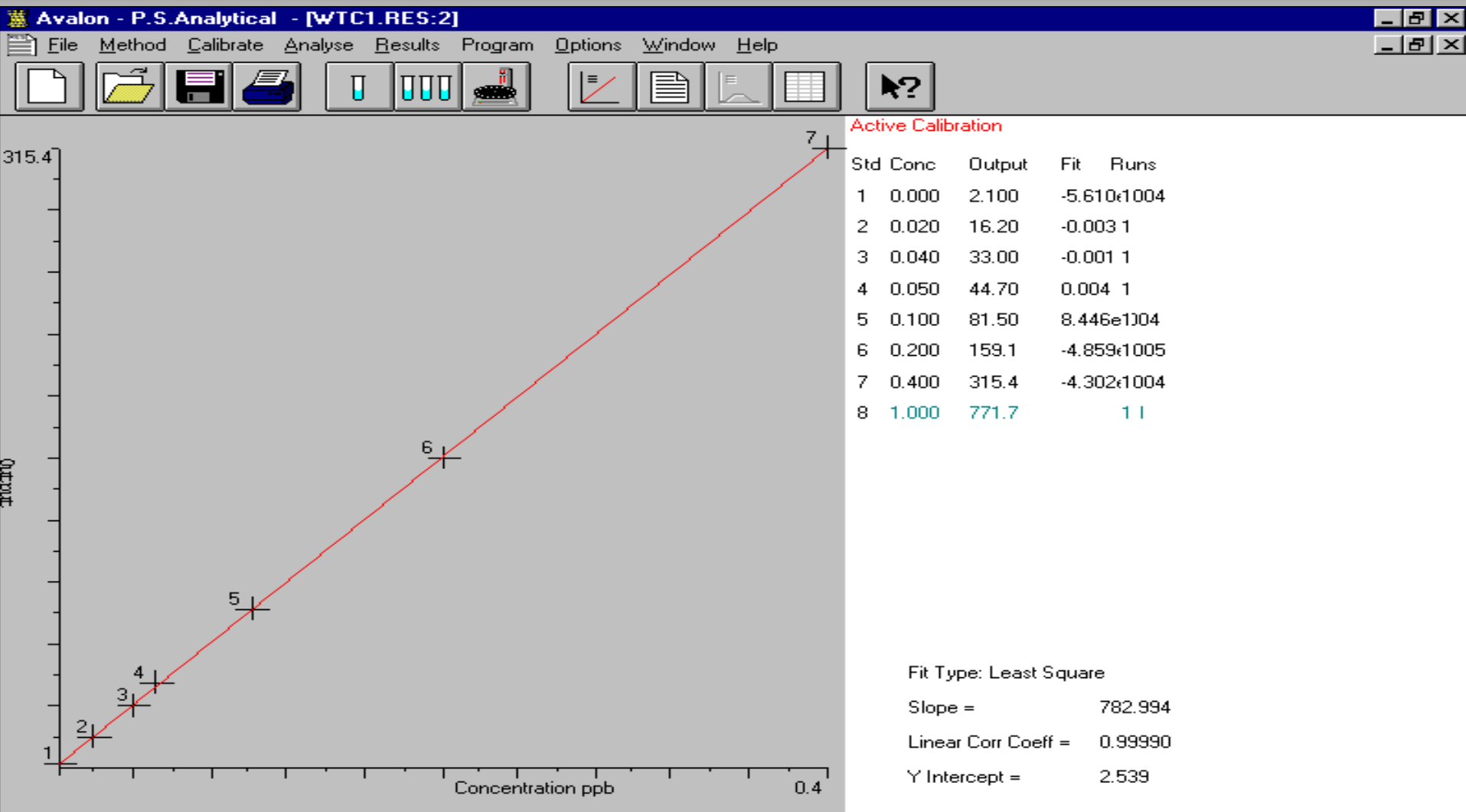
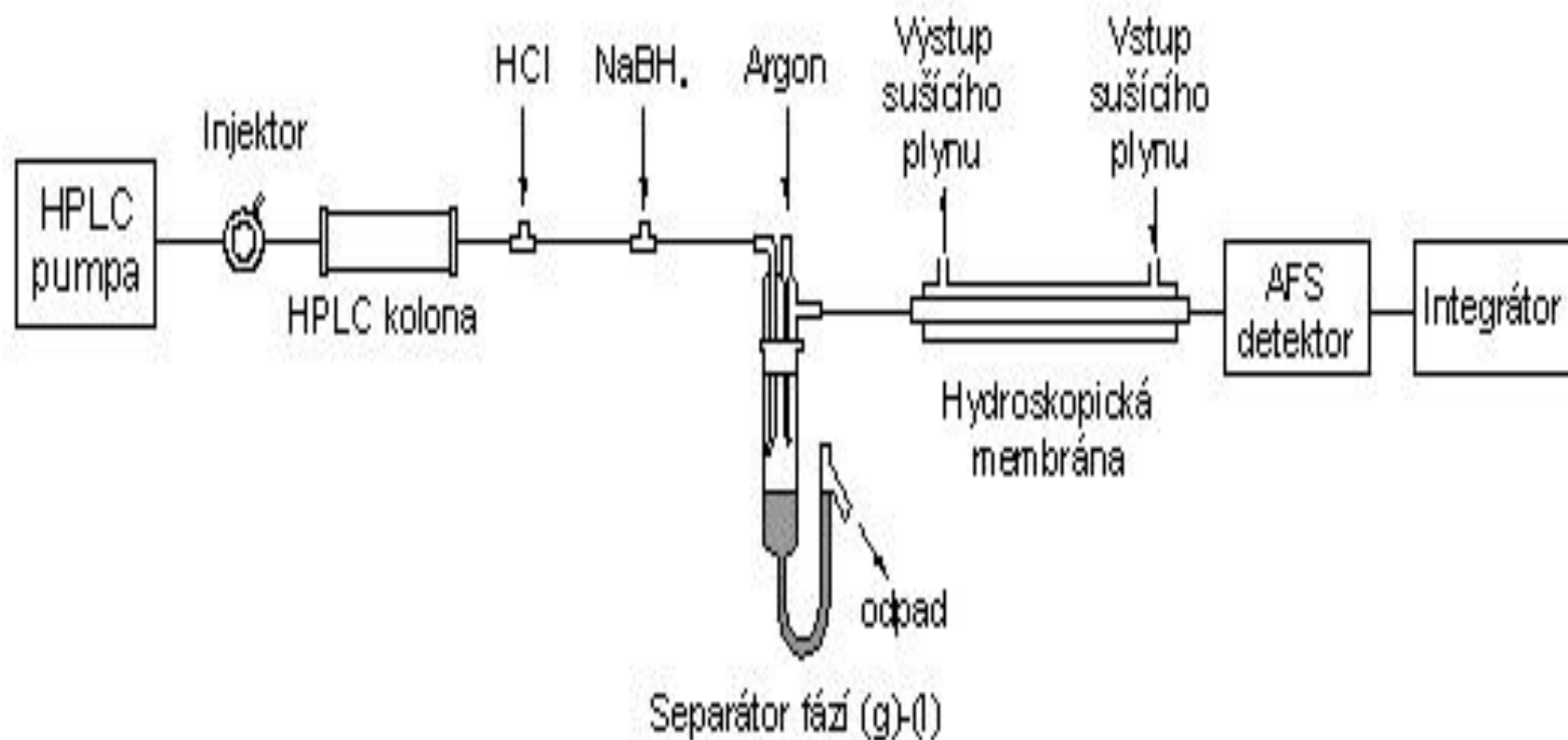
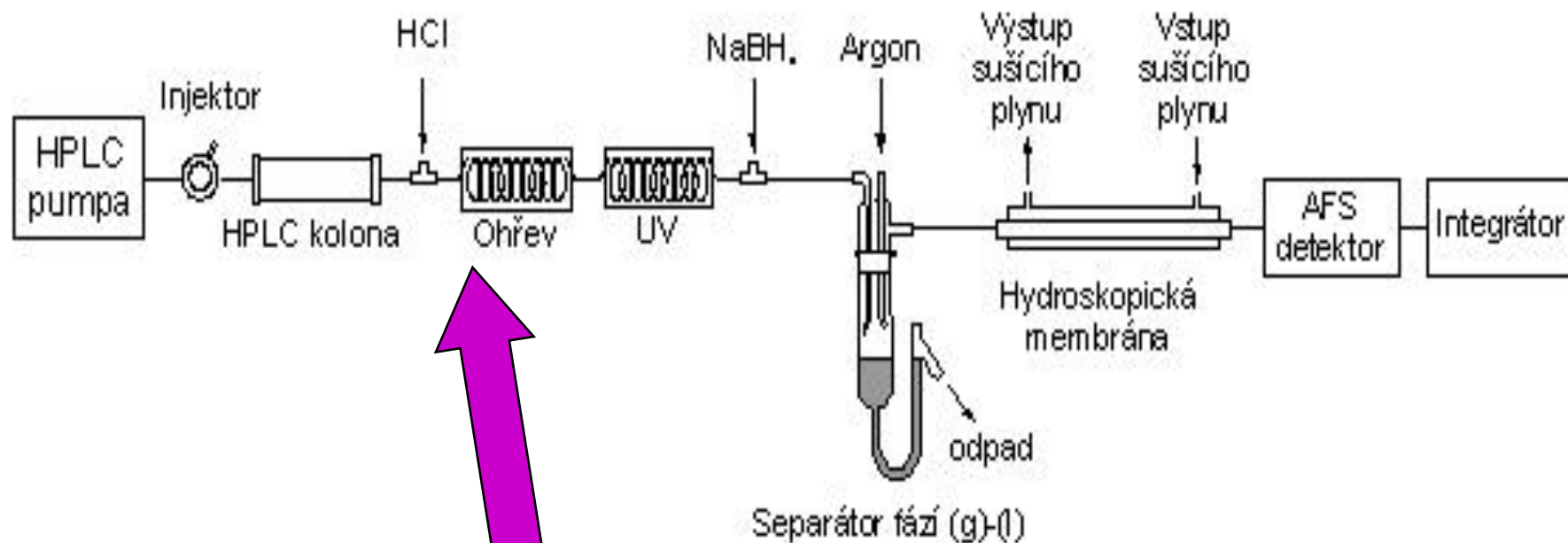


Schéma HPLC-HG-AFS



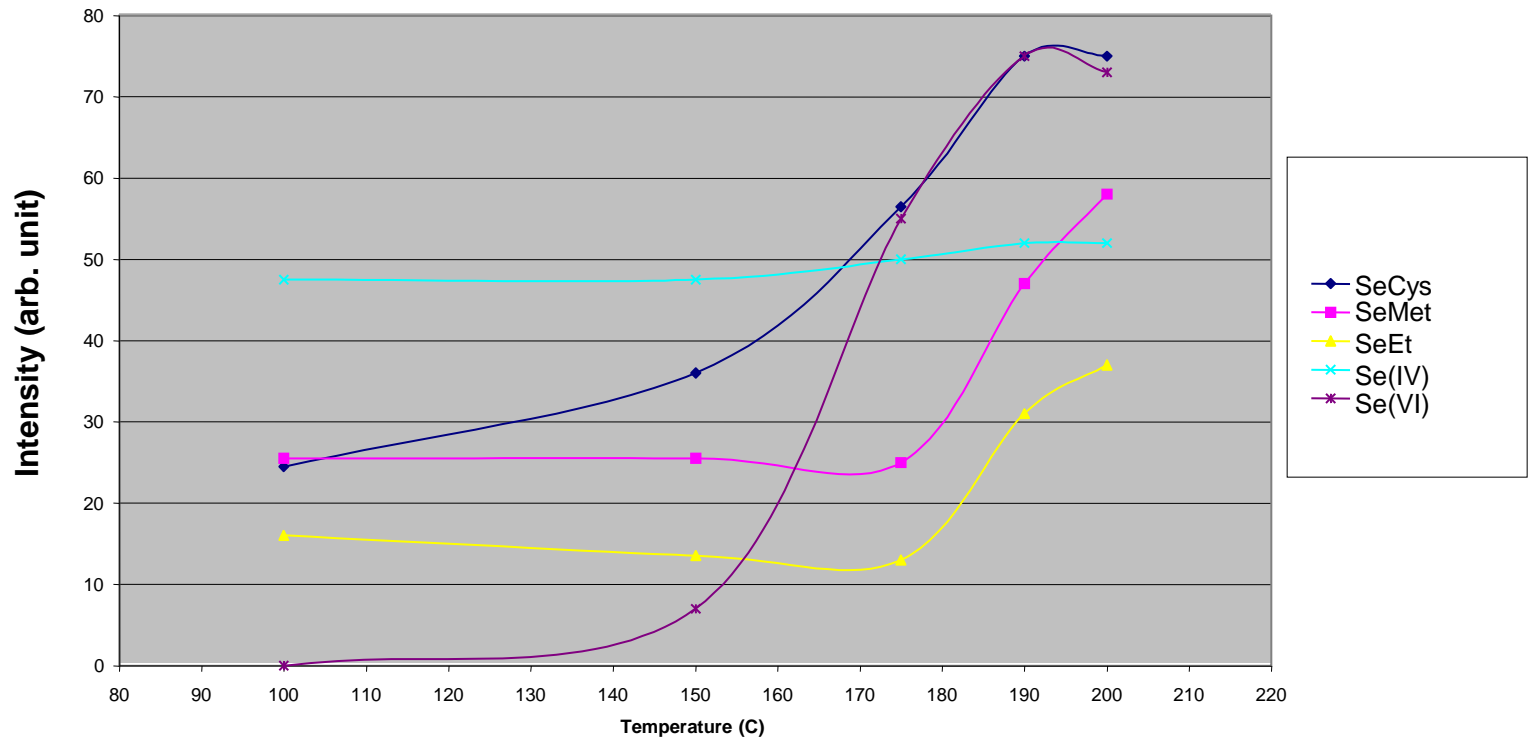
HPLC - Ohřev - UV - HG - AFS



- Zvýšení odezvy pro selenoaminokyseliny.
- Odstranění signálu pro selen(VI) přidavkem 20% HCl nebo 50% HBr.

Vliv ohřevu na zvýšení odezvy pro jednotlivé formy

VLIV TEPLoty NA ZVÝŠENÍ ODEZVY PRO JEDNOTLIVÉ FORMY





Testované iontoměniče

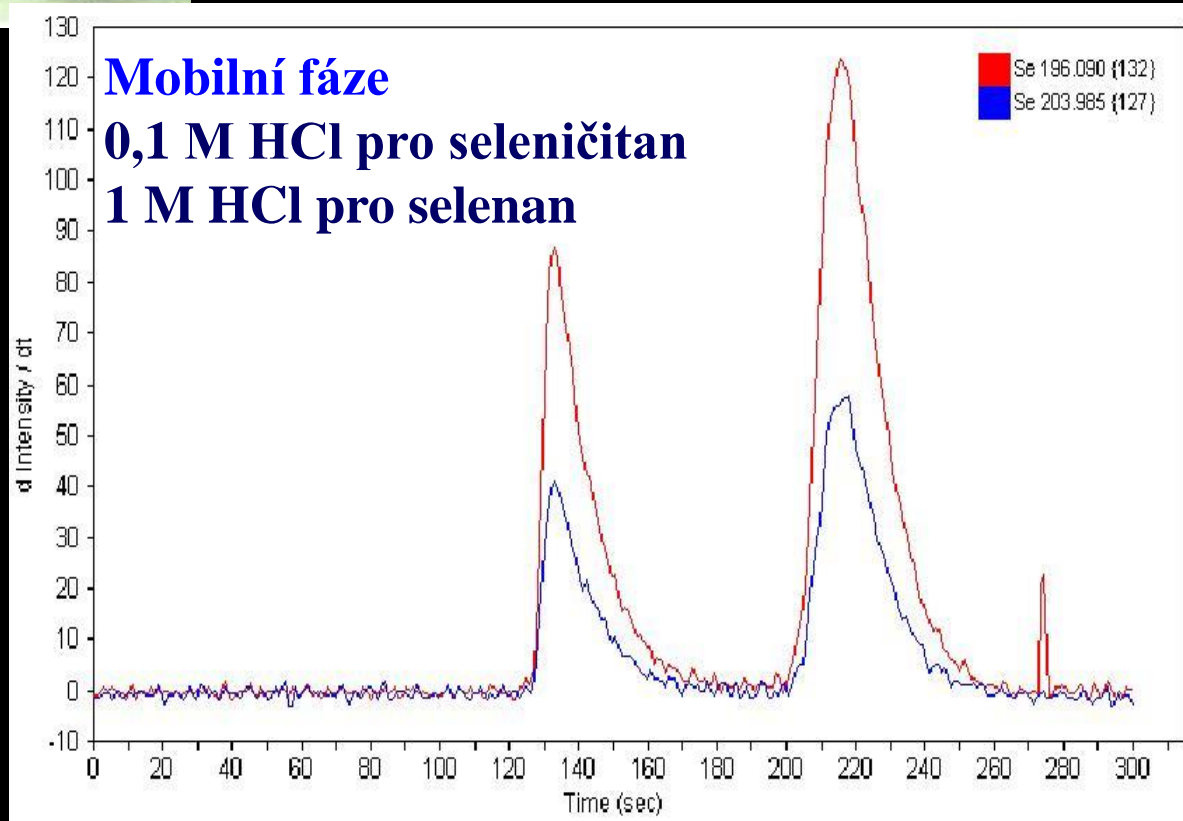
Separon SGX-AX, 60 μm

QAE-Sephadex, A-25, 40-120 μm

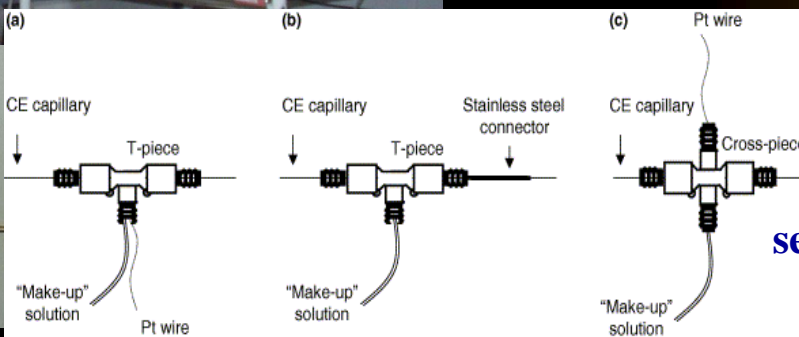
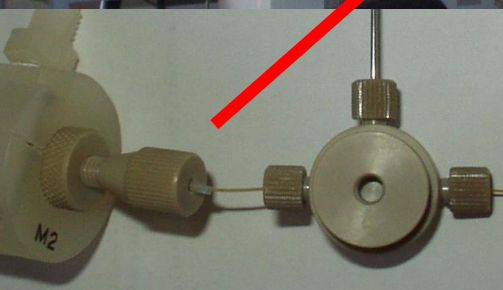
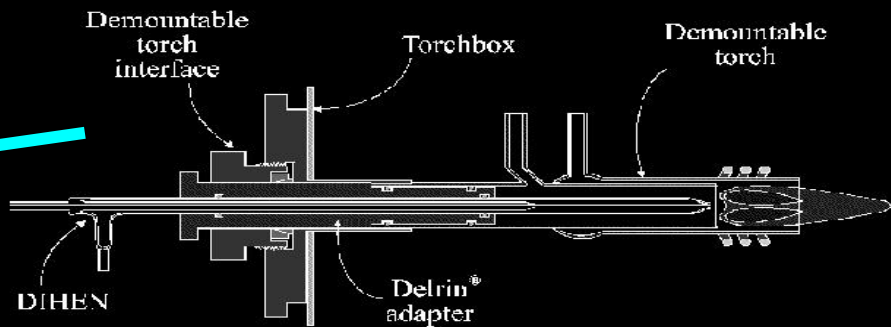
Diethylaminoethyl Cellulose DE 32, microgranular

Dowex 1x8, 200-400 mesh, silně zásaditý anex

**Derivační závislost
intenzita–čas (timescan)
pro Se(IV) a Se(VI)
s koncentrací 5 mg.l⁻¹
na koloně se Separonem
SGX-AX. 2 ml dávka
vzorku eluovaná 2 ml
0,1 M HCl následně pak
2 ml 1 M HCl.**



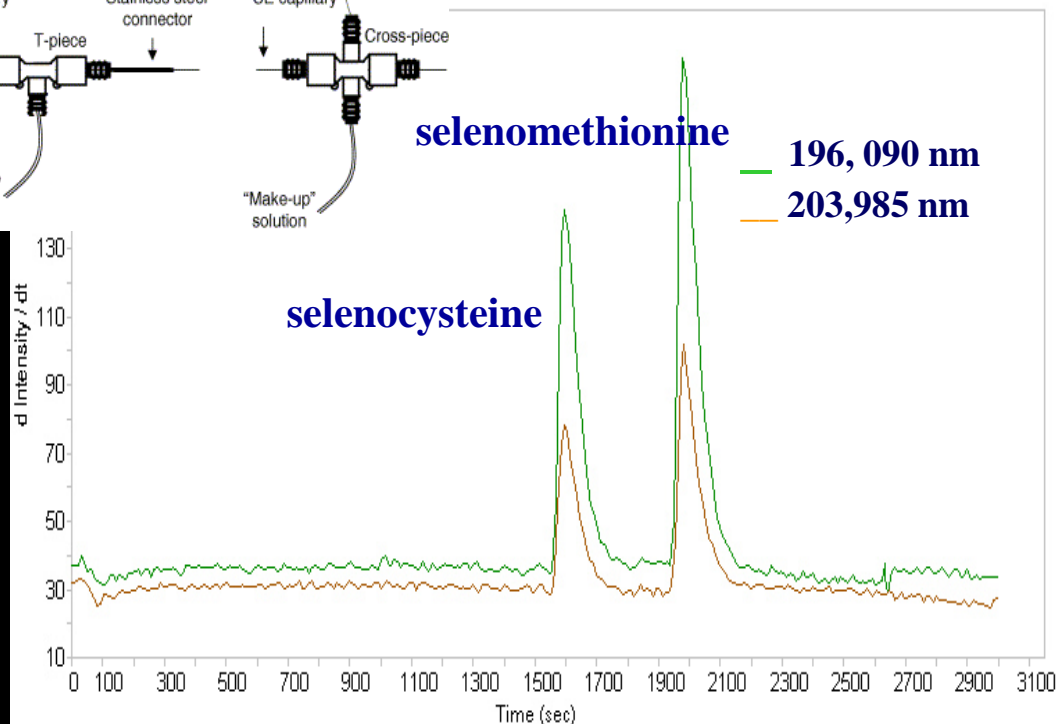
CZE-ICP-OES (CZE PRINCE 460UV2000 (SPECTRONEX))



**Mikrodávkový zmlžovač
MCN100/M2 nebo DIHEN**

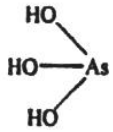
*Typické varianty interface používané
v CZE-ICP-MS(OES) spojení.*

**Separční podmínky pro CZE
10 mM Na₂CO₃; pH 11; U=20 kV**

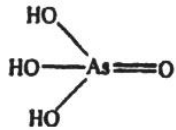


CZE-ICP-OES timescan zápis při určování retenčních časů

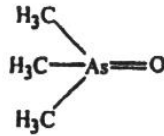
SPECIACE SLOUČENIN ARSENU



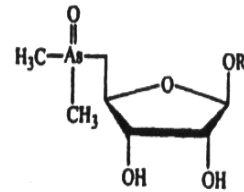
arsenous acid



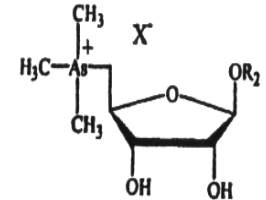
arsenic acid



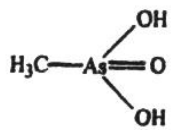
trimethylarsine oxide (TMAO)



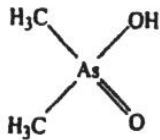
dimethylarsinoylribosides



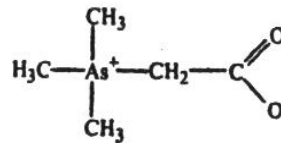
trimethylarsonioribosides



methylarsonic acid (MA)

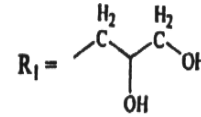


dimethylarsinic acid (DMA)

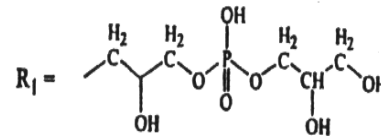


arsenobetaine (AB)

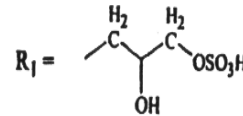
glycerol-ribose:



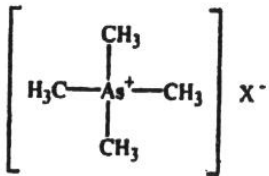
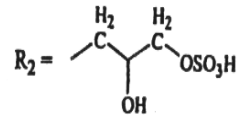
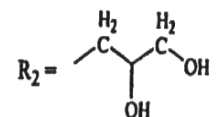
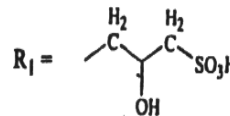
phosphate-ribose:



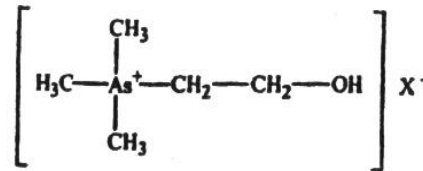
sulfate-ribose:



sulfonate-ribose:



tetramethylarsonium cation (TETRA)



arsenocholine (AC)

W. Goessler and D. Kuehnelt, *Analytical Methods for the Determination of Arsenic and Arsenic Compounds in the Environment*, in *Environmental Chemistry of Arsenic* (2002) W.T.Jr.Frankenberger (Ed.). Marcel Dekker Inc., New York - Basel

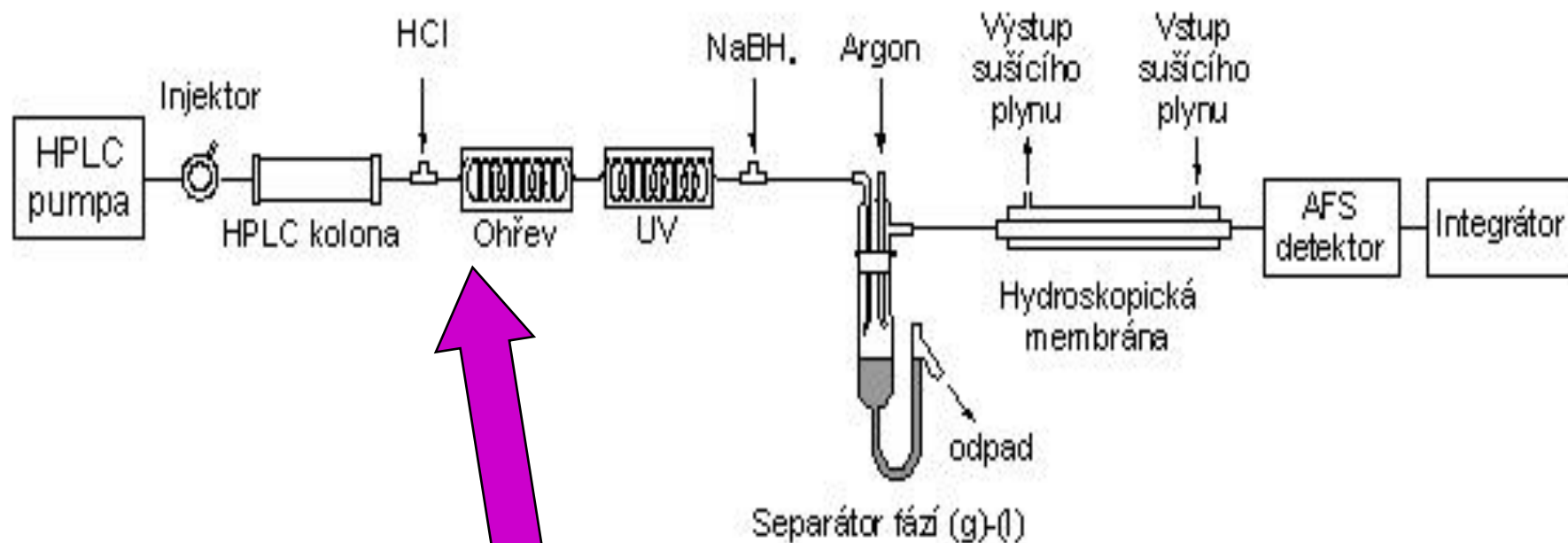
SPECIE ARSENU

- **Arsenitany a arseničnany (As(III), As(V))**
 - **Hlavní výskyt:**
 - Vodné extrakty půd
 - Pitná, povrchová a mořská voda
 - Půdní rostlinstvo
- **Monomethyl- a dimethylarseničnany (MMA, DMA)**
 - Většina součástí životního prostředí
 - Minoritní součást

SPECIE ARSENU

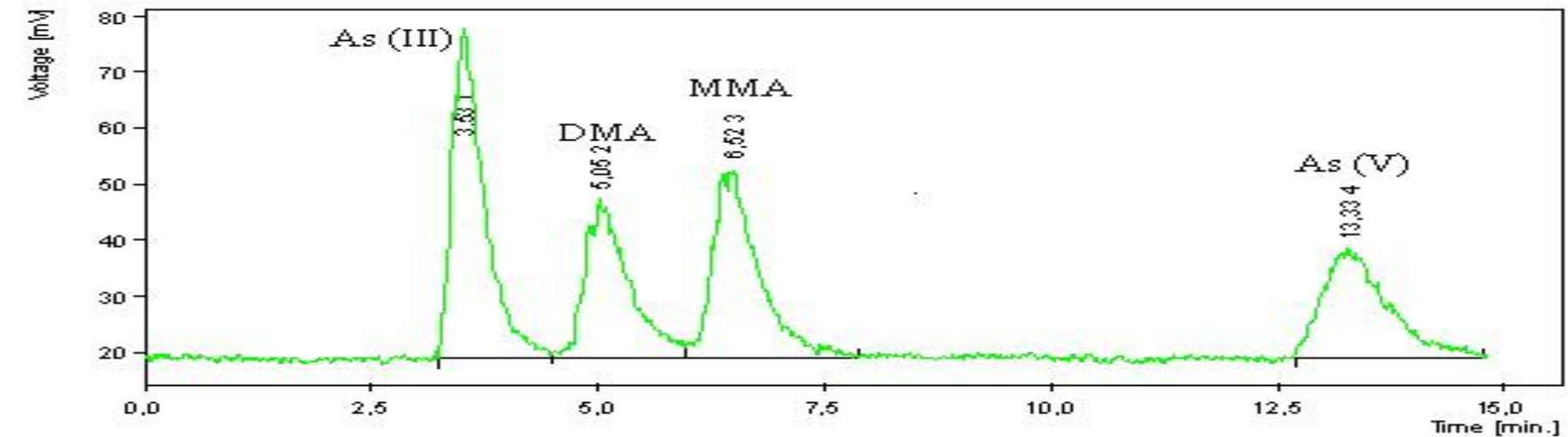
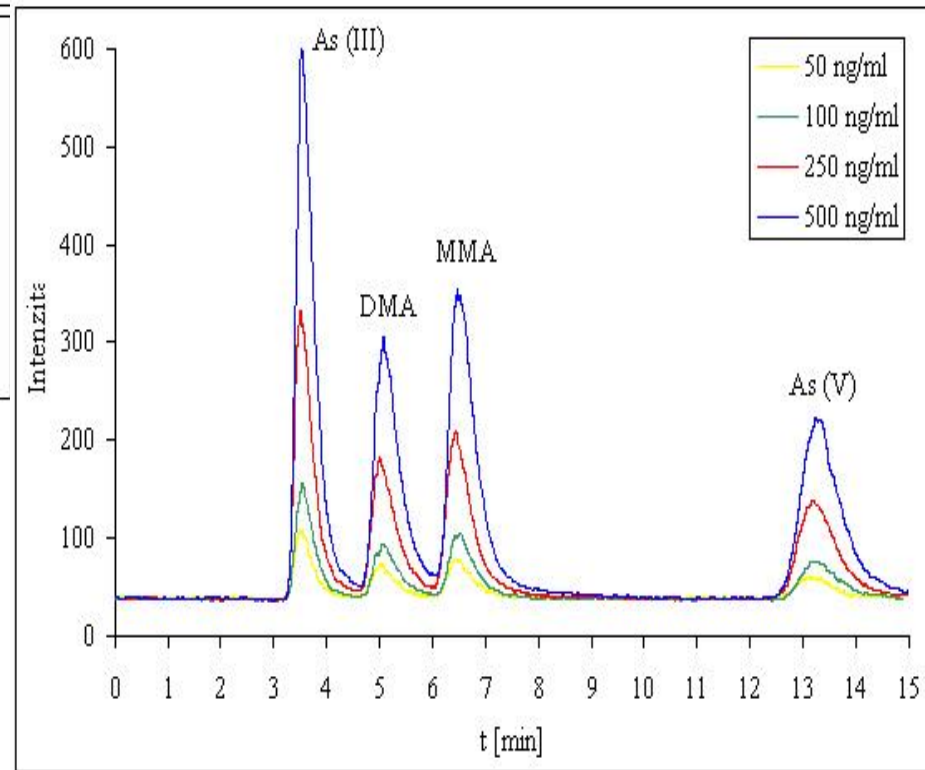
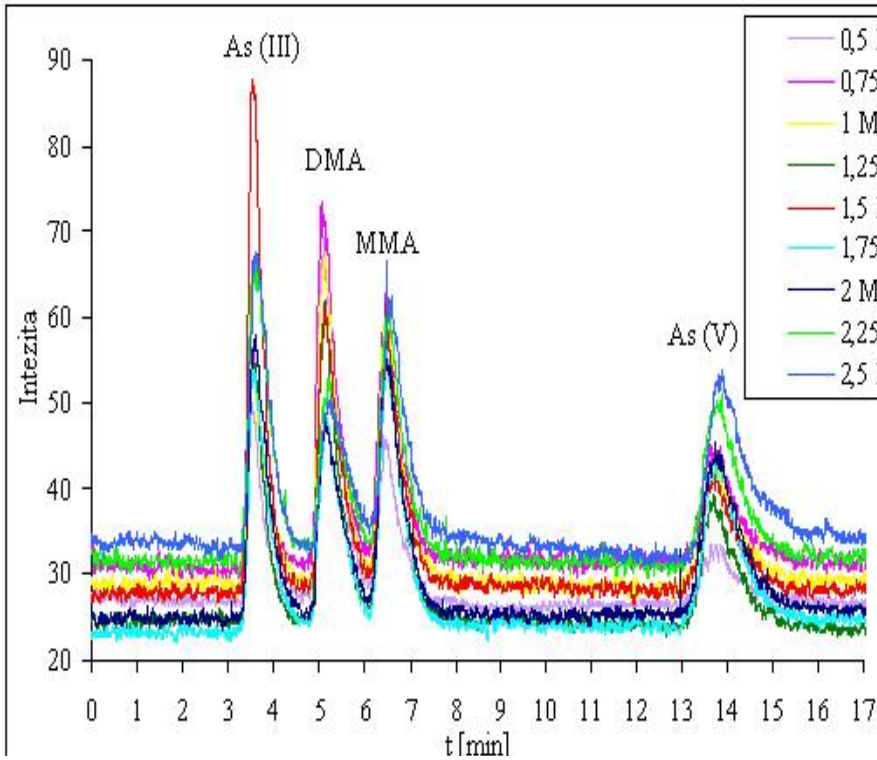
- **Arsenobetain (AsB)**
 - **Hlavní výskyt:**
 - **Mořští živočichové**
 - **Nenalezen :**
 - **Mořských řasách a v mořské vodě**
- **Arseno-ribosidy (arsenocukry)**
 - **Hlavní výskyt:**
 - **Mořské a sladkovodní řasy**
 - **Mořští živočichové**
 - **Minoritní výskyt:**
 - **Sladkovodní rostliny a suchozemští živočichové**

HPLC - Ohřev - UV - HG - AFS

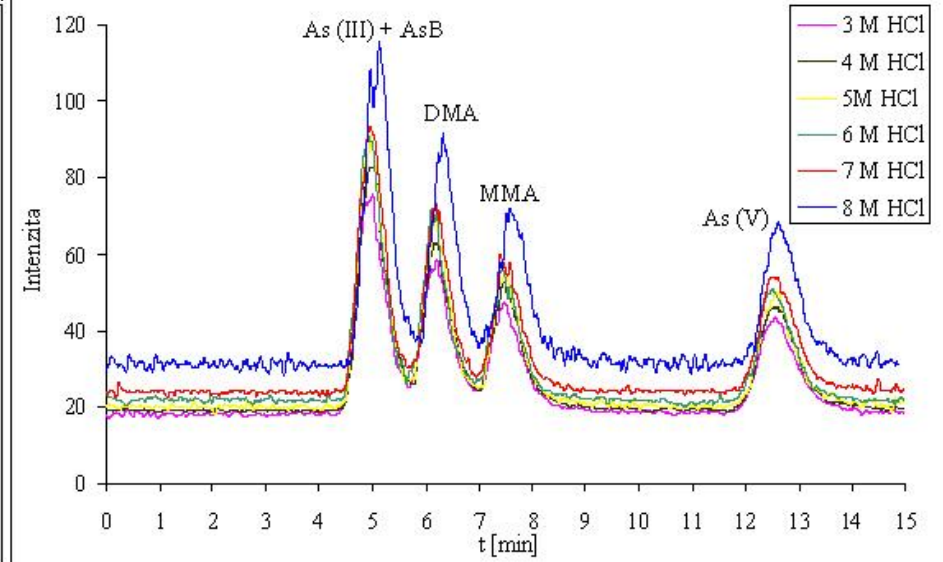
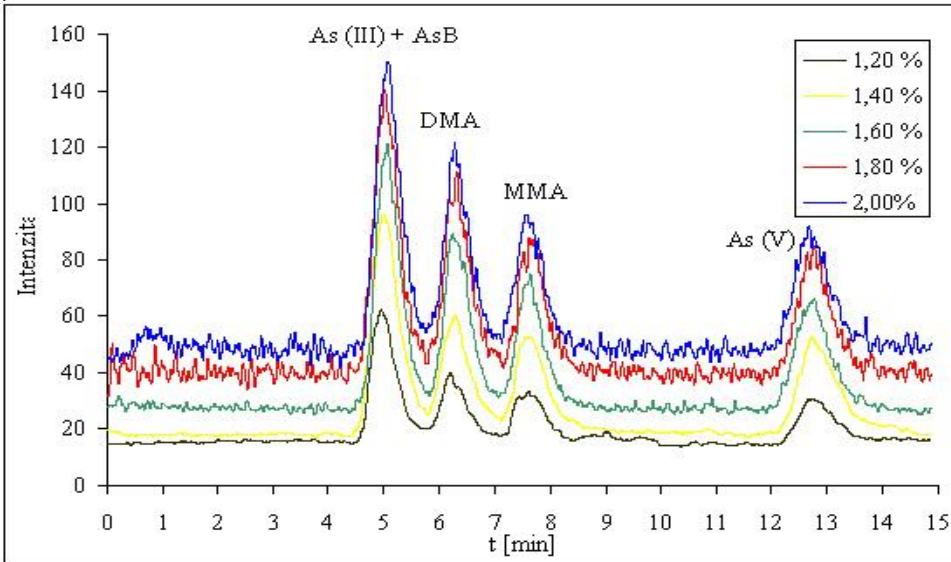
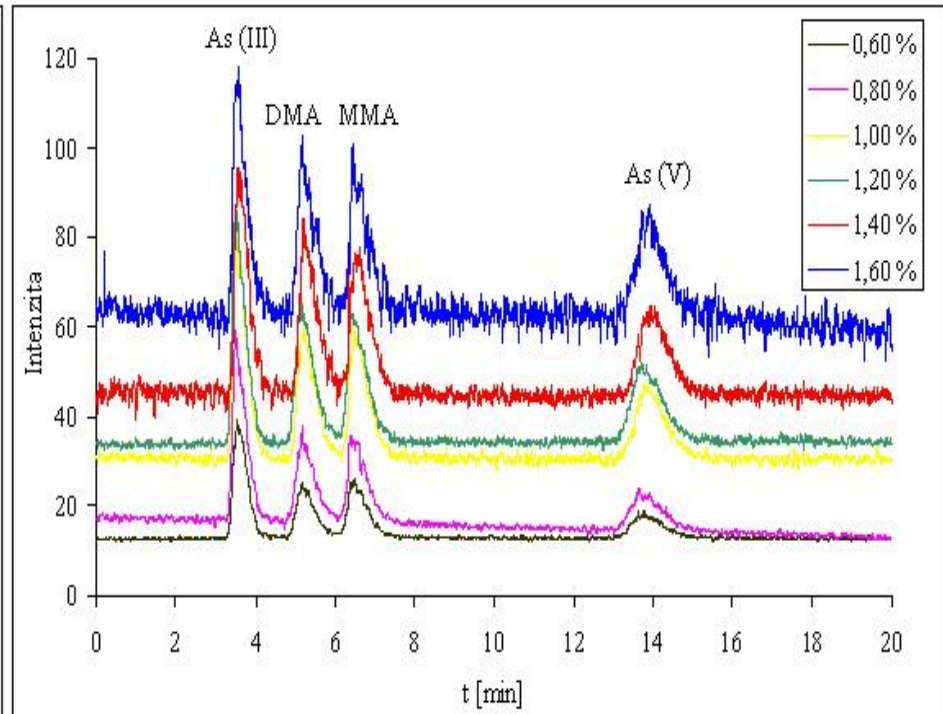
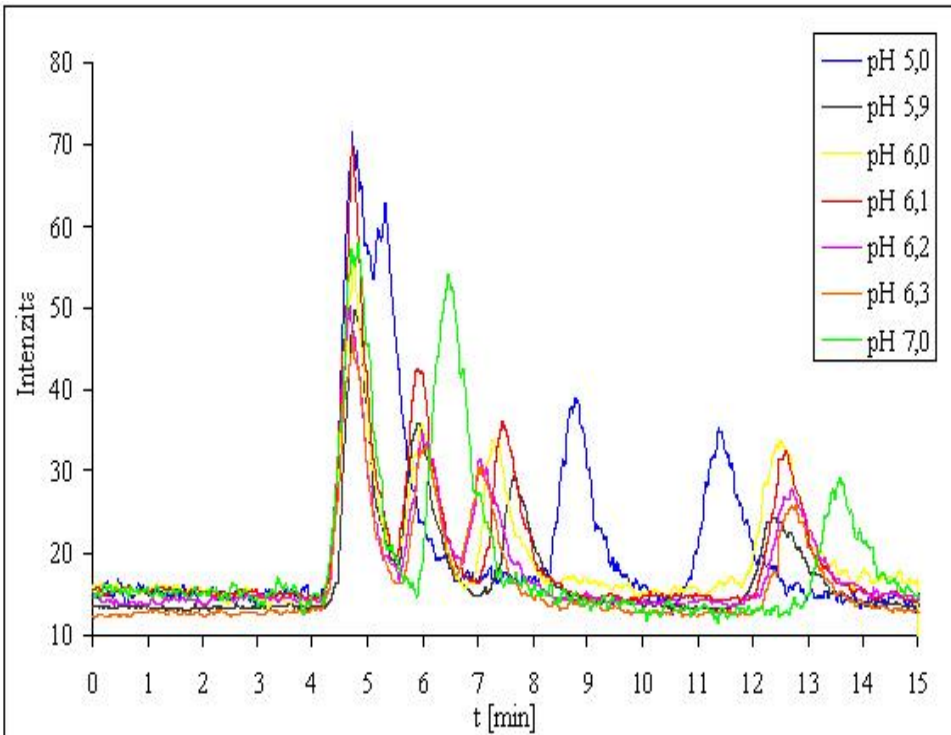


- Zvýšení odezvy pro selenoaminokyseliny.
- Odstranění signálu pro selen(VI) přidavkem 20% HCl nebo 50% HBr.

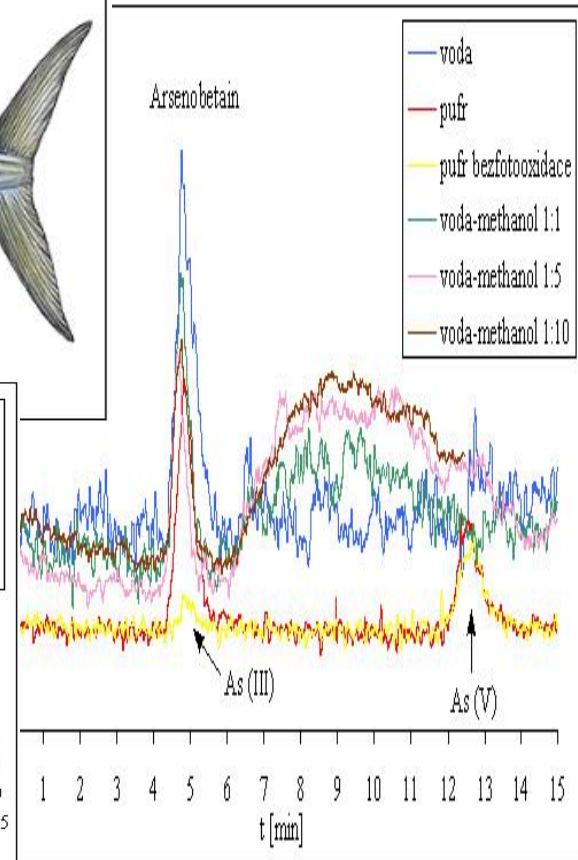
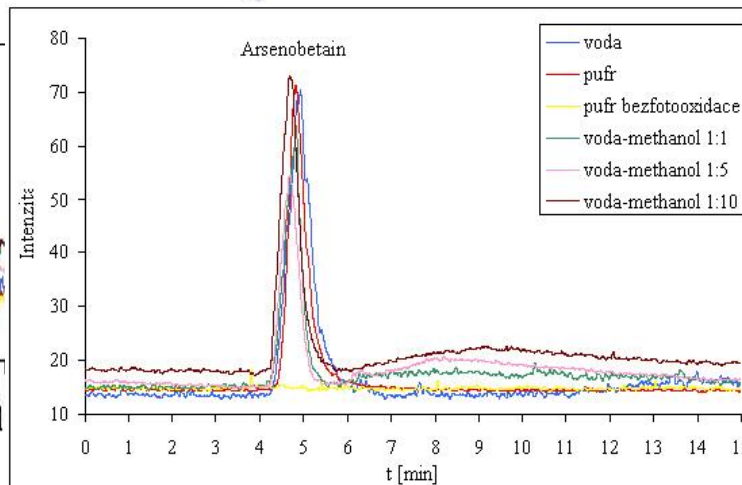
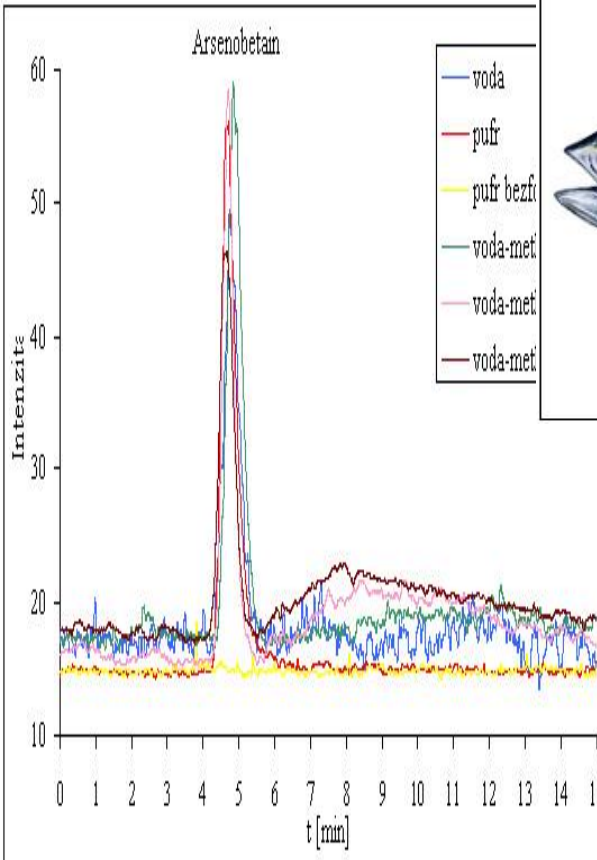
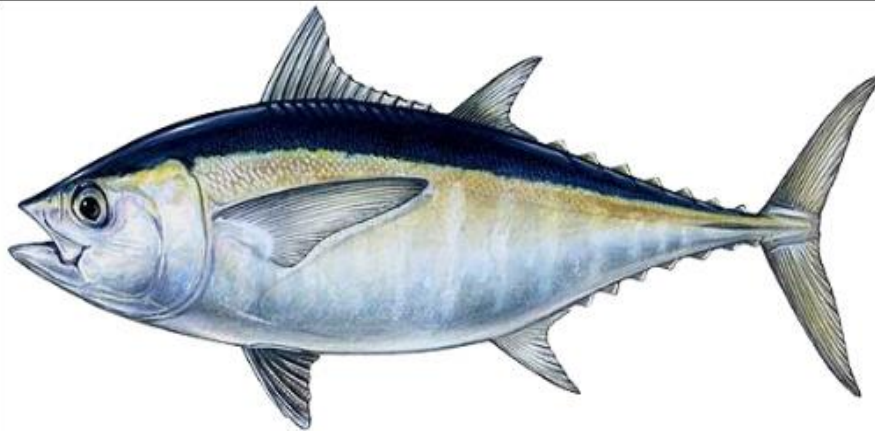
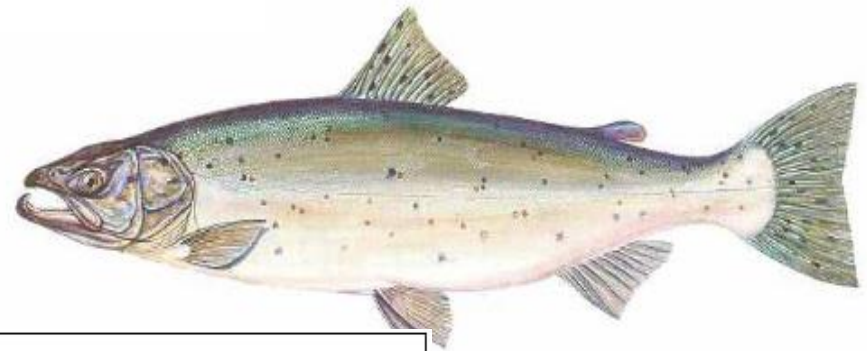
HPLC - UV - HG - AFS



HPLC - UV - HG - AFS



HPLC - UV - HG - AFS



HPLC - UV - HG - AFS

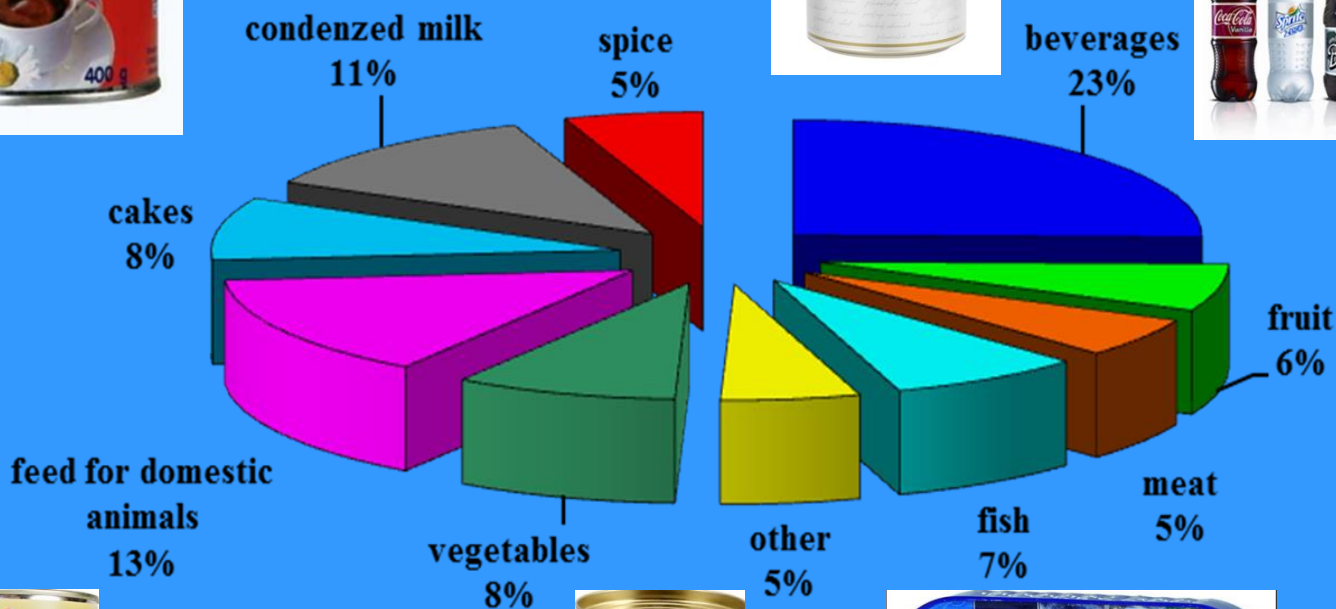
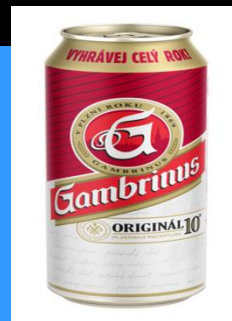
- **Limit pro sladkovodní ryby 1 mg/kg**
- **Limit pro mořské ryby 5 mg/kg**

Vzorek	Celkový As		Extrahovatelný As			LOQ [mg/kg]
	c	RSD	c	RSD	LOD	
	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	[%]	[mg/kg]	
Pstruh č. 1	1,42	7,76	1,49	1,14	0,16	0,37
Pstruh č. 2	1,94	1,47	1,67	2,65	0,15	0,35
Pstruh č. 3	2,13	2,75	1,46	1,54	0,14	0,33
Pstruh č. 4	1,78	1,06	1,04	5,45	0,15	0,34
Pstruh č. 5	1,50	3,24	1,06	5,70	0,15	0,35
Pstruh č. 6	1,34	0,48	0,96	1,84	0,14	0,32
Pstruh č. 7	1,43	5,36	0,72	3,80	0,13	0,30
Pstruh č. 8	1,45	0,58	0,94	2,93	0,14	0,32
Pstruh č. 9	1,90	3,67	1,03	1,61	0,16	0,37
Pstruh č. 10	1,37	0,13	0,86	7,79	0,14	0,32
Pstruh č. 11	1,62	3,42	1,00	3,17	0,15	0,36
Pstruh směsný	1,67	2,88	1,02	5,23	0,14	0,31
Losos č. 1	0,53	4,11	0,39	2,87	0,17	0,39
Losos č. 2	0,37	5,39	0,17*	15,73	0,15	0,34
Losos č. 3	1,70	3,28	1,01	0,89	0,16	0,37
Tuňák	4,53	0,96	1,76	1,61	0,12	0,28

Speciace sloučenin cínu

- ↪ Jedním z **ukazatelů hygienicko-toxikologické jakosti potravin je obsah toxických** minerálních látek.
- ↪ **Cín je pro člověka i ostatní živočichy esenciálním prvkem**, ale ve větším množství je toxický.
- ↪ **Lidé mohou vstřebávat cín z potravin, dýcháním a kůží.** Absorpce cínu může způsobit akutní právě tak, jako dlouhodobý problém. Nejčastější cesta vstupu cínu do lidského organismu je trávicí soustavou, proto je v dnešní době na kontrolu potravin kladen velký důraz.

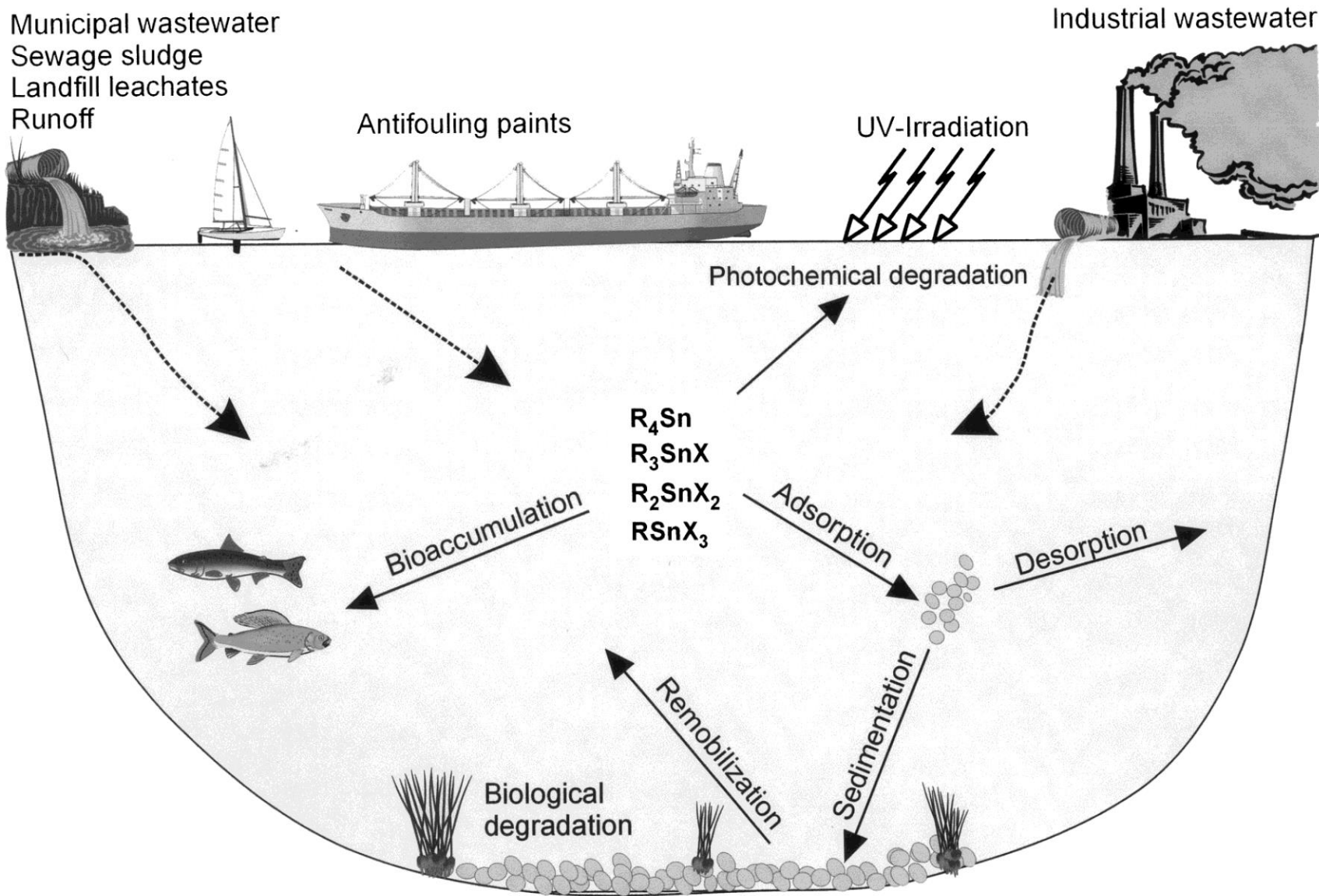
Nejčastěji konzumované druhy konzervovaných potravin s obsahem cínu

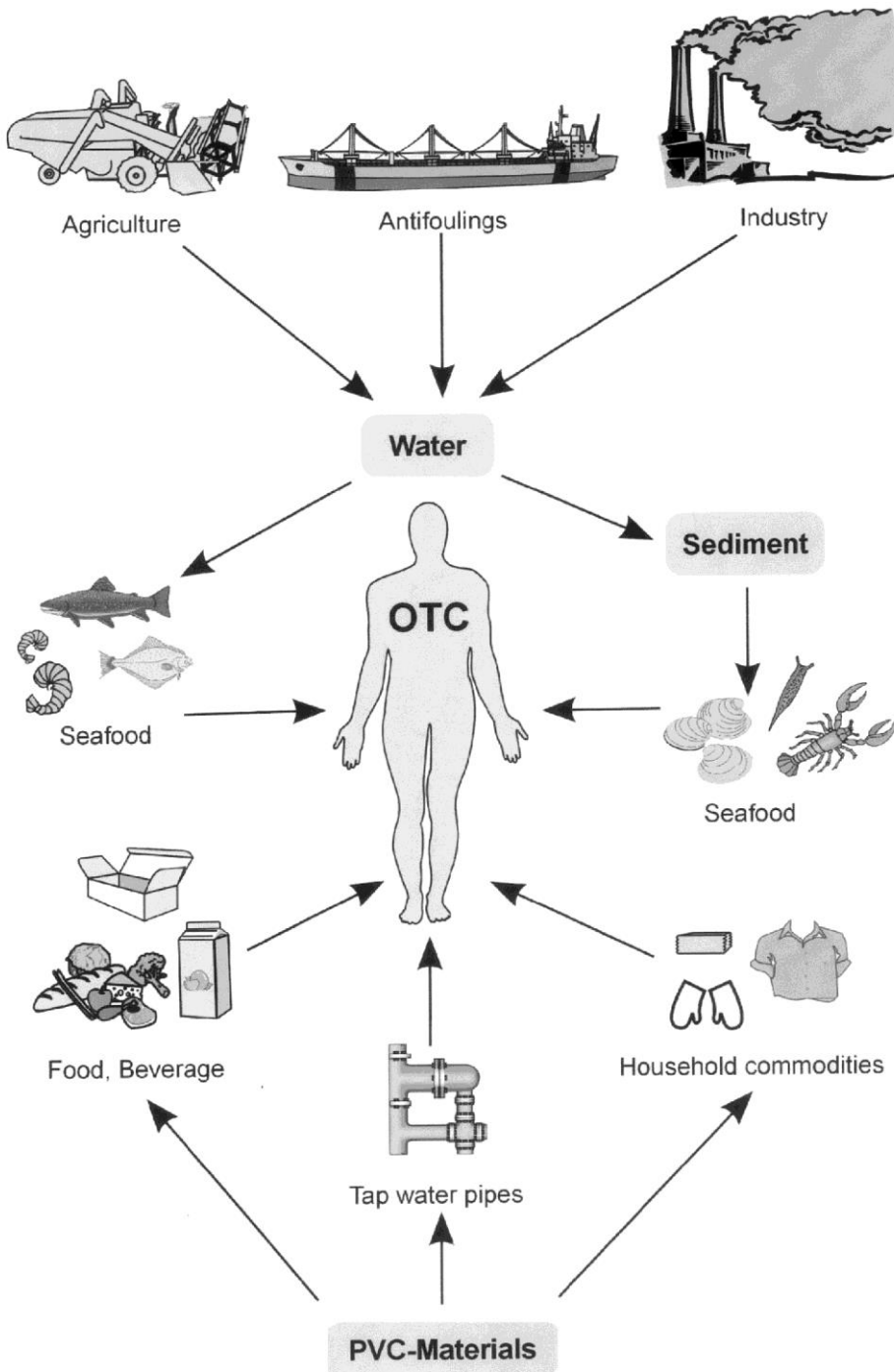


Průmyslové použití organocínů

Aplikace	Funkce	Sloučenina
PVC stabilizátor	Ochrana proti rozkladu	R_2SnX_2 a R_4SnX_2 R=Me, Bu, Oct
Antikorozní (protirůstové) nátěry	Biocid	R_3SnX R= Bu, Ph
Agrochemikálie	Fungicidy, insekticidy, proti roztočům, atd.	R_3SnX R= Bu, Ph, Cyhx
Ochrana dřeva	Fungicidy, insekticidy	Bu_3SnX
Drůbežářství	Odčervovač	Bu_2SnX_2

Zdroje a koloběh organocínitých sloučenin ve vodním prostředí





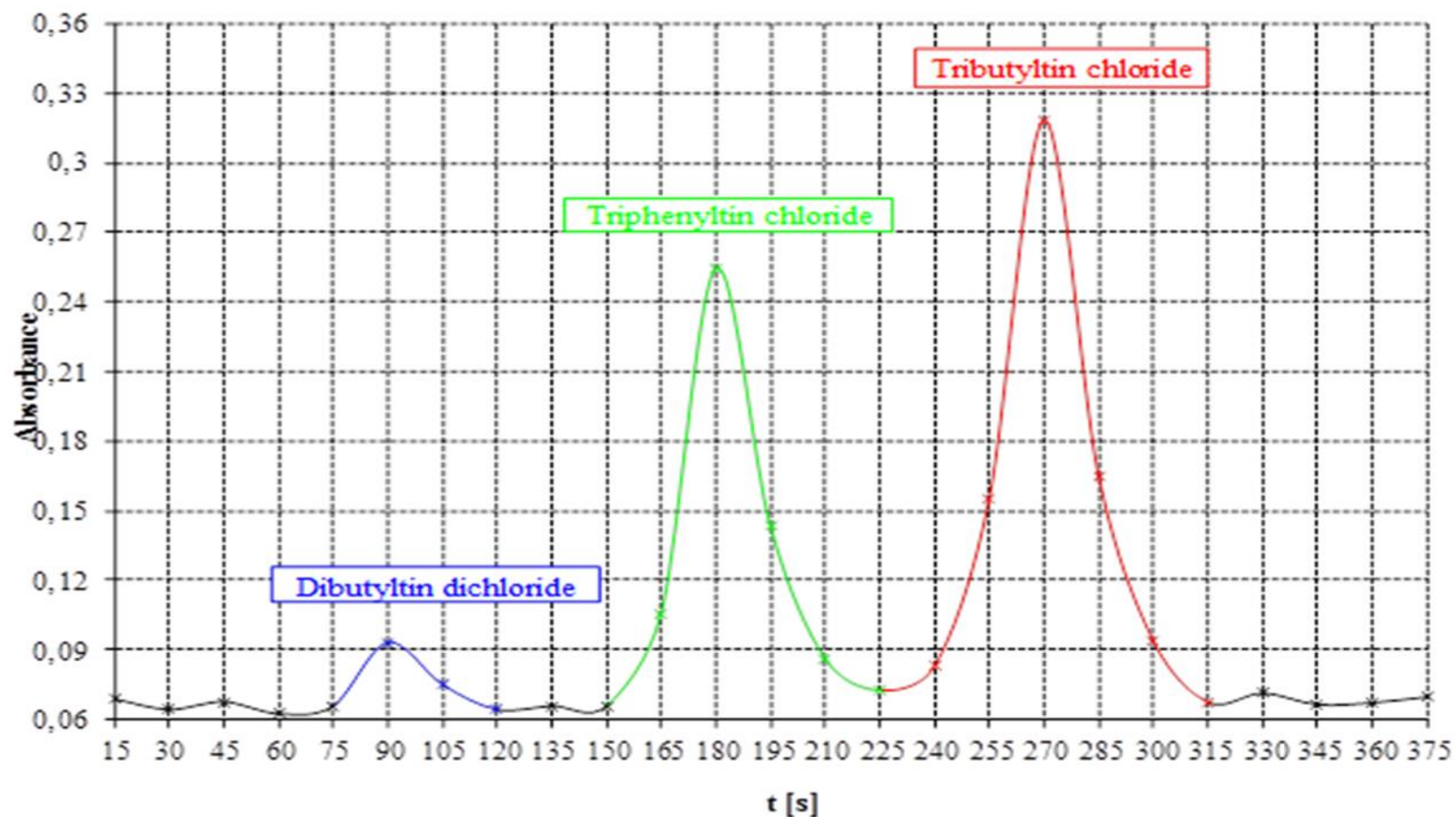
Hlavní cesty průniku organocíničitých látek do lidského těla (OTC)

- **Akceptovatelný denní příjem pro člověka není stanoven**
- **Riziková hladina OTC pro lidské zdraví v mořských produktech při jejich pravidelné konzumaci dosud není určena**

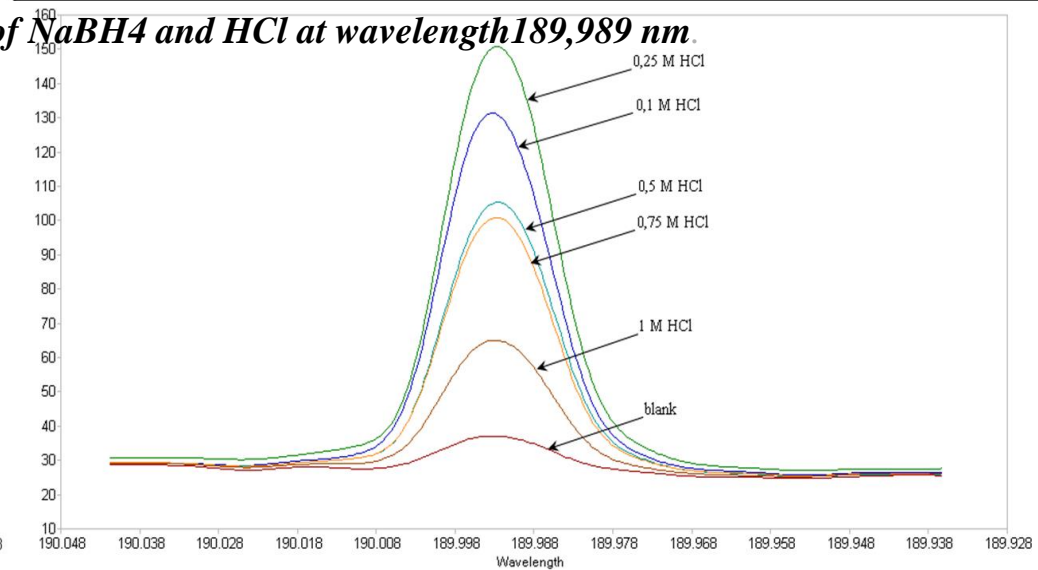
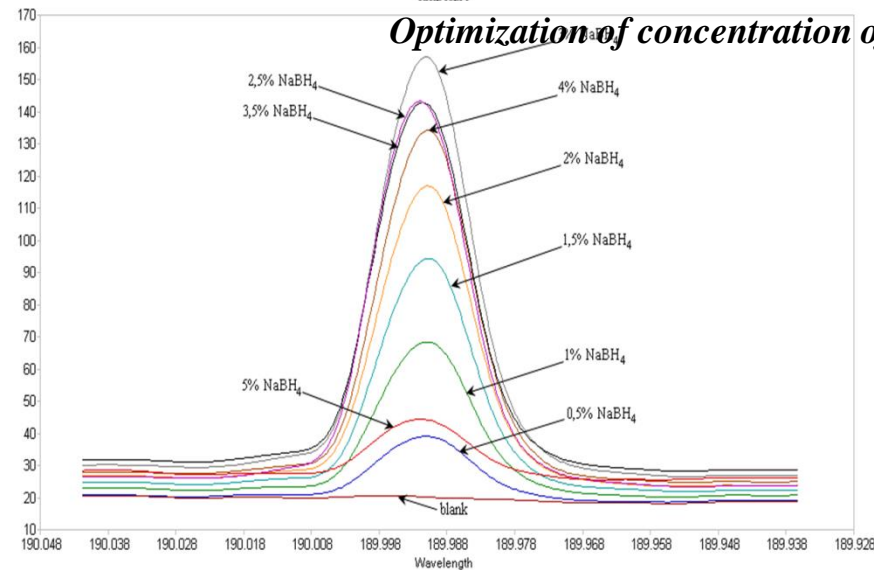
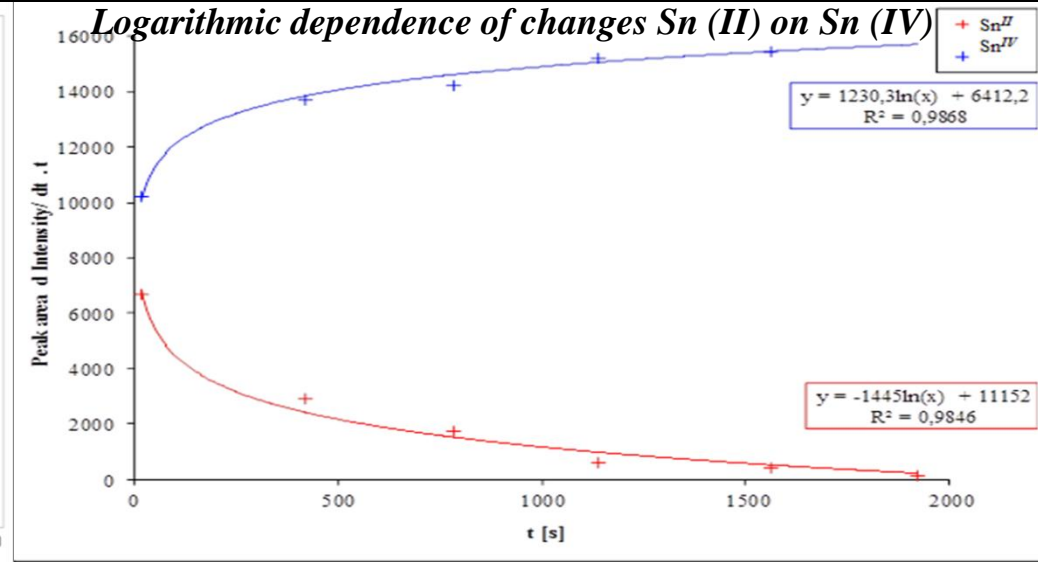
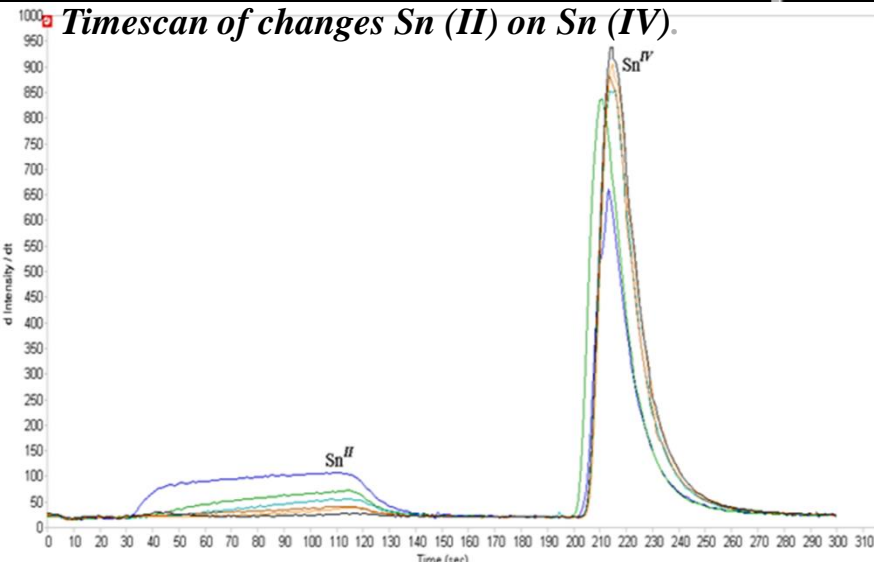
Legislativa - EK 1881/2006/ES

Potraviny ⁽¹⁾		Maximální limity (mg/kg čerstvé hmotnosti)
3.5	Arsen (anorganický) ⁽⁵⁰⁾ ⁽⁵¹⁾	
3.5.1	Nepředpařená omletá rýže (leštěná nebo bílá rýže)	0,20
3.5.2	Předpařená rýže a loupaná rýže	0,25
3.5.3	Pufované rýžové chlebičky, rýžové oplatky, rýžové krekry (sušenky) a rýžové koláčky	0,30
3.5.4	Rýže určená pro výrobu potravin pro kojence a malé děti ⁽³⁾	0,10
3.4	Cín (anorganický)	
3.4.1	Konzervované potraviny jiné než nápoje	200
3.4.2	Konzervované nápoje včetně ovocné a zeleninové šťávy	100
3.4.3	Konzervované příkrmly a obilné příkrmly pro kojence a malé děti kromě sušených výrobků a výrobků v prášku ⁽³⁾ , ⁽²⁹⁾	50

Stanovení organocínových sloučenin pomocí HPLC-ETA-AAS na přístroji Solaar M6 ETA-AAS se Zeemanovou korekcí pozadí a HPLC kolonami ACE 3 μm C-18 15 cm \times 1,0 mm a Kromasil C-18, 40-120 μm , 15 cm



Stanovení anorganických forem Sn pomocí ICP-OES s hydridovou generací – optimalizace parametrů



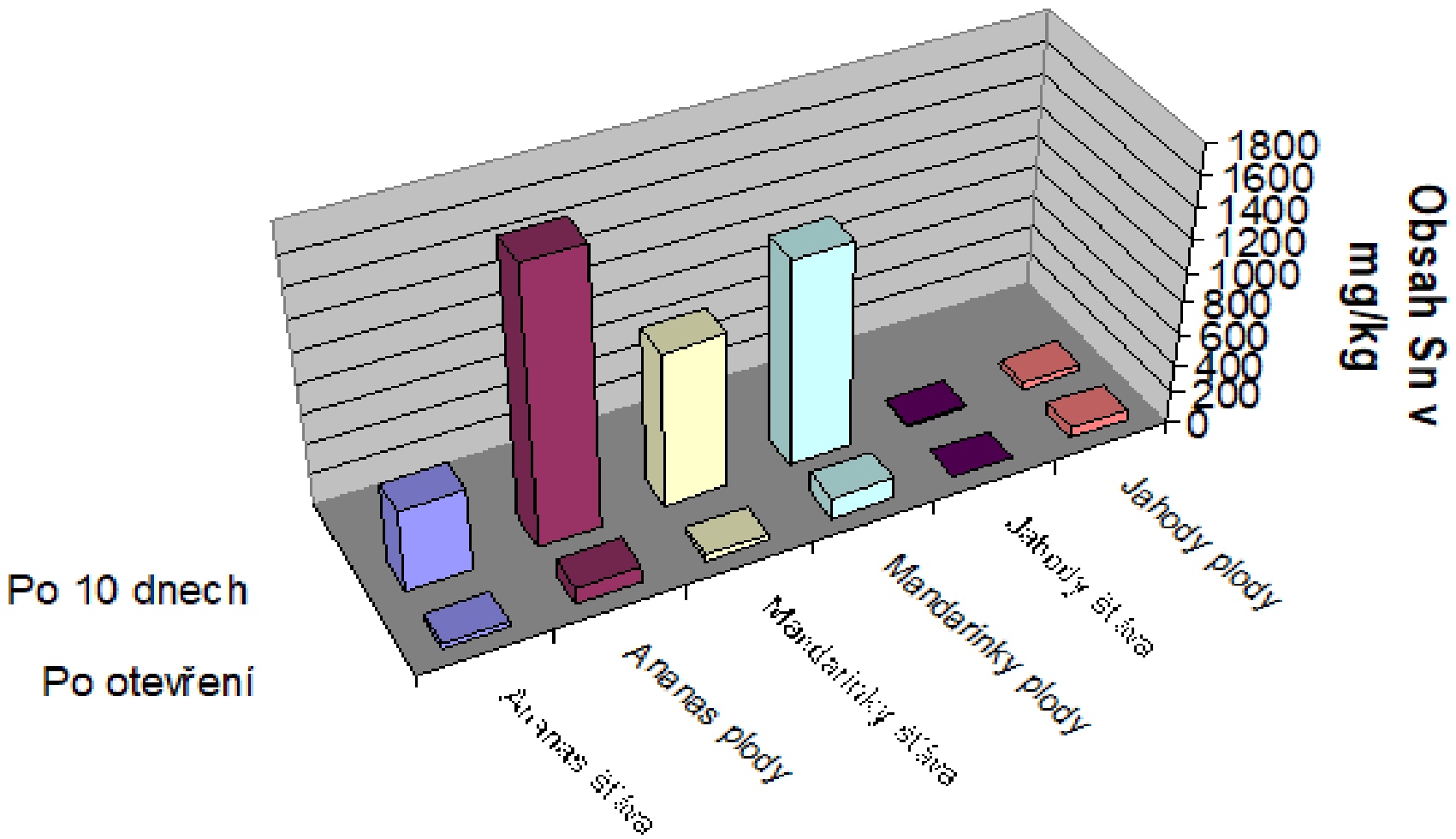
Stanovení cinu v potravinářských vzorcích metodou HG-ICP-OES po MW rozkladu a HG s 3% NaBH₄ v 0,1% roztoku KOH.

SAMPLE	c [mg.l ⁻¹]	
	λ 189,989 nm	λ 242,949 nm
Coca Cola	0,1766 ± 0,0629	0,1965 ± 0,0608
Sprite	0,0903 ± 0,1159	0,1167 ± 0,1056
Fanta	0,0275 ± 0,0390	0,0518 ± 0,0632
Gambrinus 10° - beer	0,0360 ± 0,0100	0,0557 ± 0,0035
PowerKing	0,0227 ± 0,0015	0,0516 ± 0,0022
Piknik – cond. milk	0,3758 ± 0,0078	0,6716 ± 0,0162
Sardines in veg. oil	1,0791 ± 0,0892	1,2154 ± 0,5410
Hunter salami	0,7016 ± 0,1250	0,6606 ± 0,0937

Porovnání výsledků stanovení cínu metodami ETA-AAS a HG-ICP-OES

Vzorek	ETA - AAS Obsah Sn [$\mu\text{g/g}$]	HG-ICP-OES/AP Obsah Sn [$\mu\text{g/g}$]
Ananas-šťáva	37,49 \pm 6,41	36,37 \pm 1,82
Ananas-ovoce	110,74 \pm 6,09	107,20 \pm 2,30
Mandarinky-šťáva	36,24 \pm 2,07	36,88 \pm 0,46
Mandarinky-ovoce	128,45 \pm 48,82	137,90 \pm 1,12
Jahody-šťáva	6,06 \pm 0,28	7,19 \pm 0,10
Jahody-ovoce	69,68 \pm 2,23	72,31 \pm 2,86
Mražené filé	23,98 \pm 2,85	24,85 \pm 2,52
Konzervovaná makrela	145,92 \pm 5,25	146,60 \pm 1,25

Porovnání obsahů cínu v konzervovaném ovoci v čase



Speciace jednotlivých forem prvků pomocí IC-ICP-MS

Ionexové kolony typu AS7 (AG7) vhodné pro speciaci prvků tvořící oxoanionty (Se, As, Cr, Sn)

IonPac AS7/AG7 Packing Specifications

Column	Particle Diameter μm	Substrate X-linking %	Column Capacity μeq/column	Functional Group	Hydrophobicity
AS7 4 x 250 mm	10.0	2	100	Alkyl quaternary ammonium	Medium-High
AG7 4 x 50 mm	10.0	2	25	Alkyl quaternary ammonium	Medium-High
AS7 2 x 250 mm	10.0	2	25	Alkyl quaternary ammonium	Medium-High
AG7 2 x 50 mm	10.0	2	6.25	Alkyl quaternary ammonium	Medium-High

Speciace jednotlivých forem prvků pomocí IC-ICP-MS

Ionexové kromolony typu AC7 (AG7) vhodné pro speciaci prvků tvořící oxoanionty (Se, As, Cr, Sn)

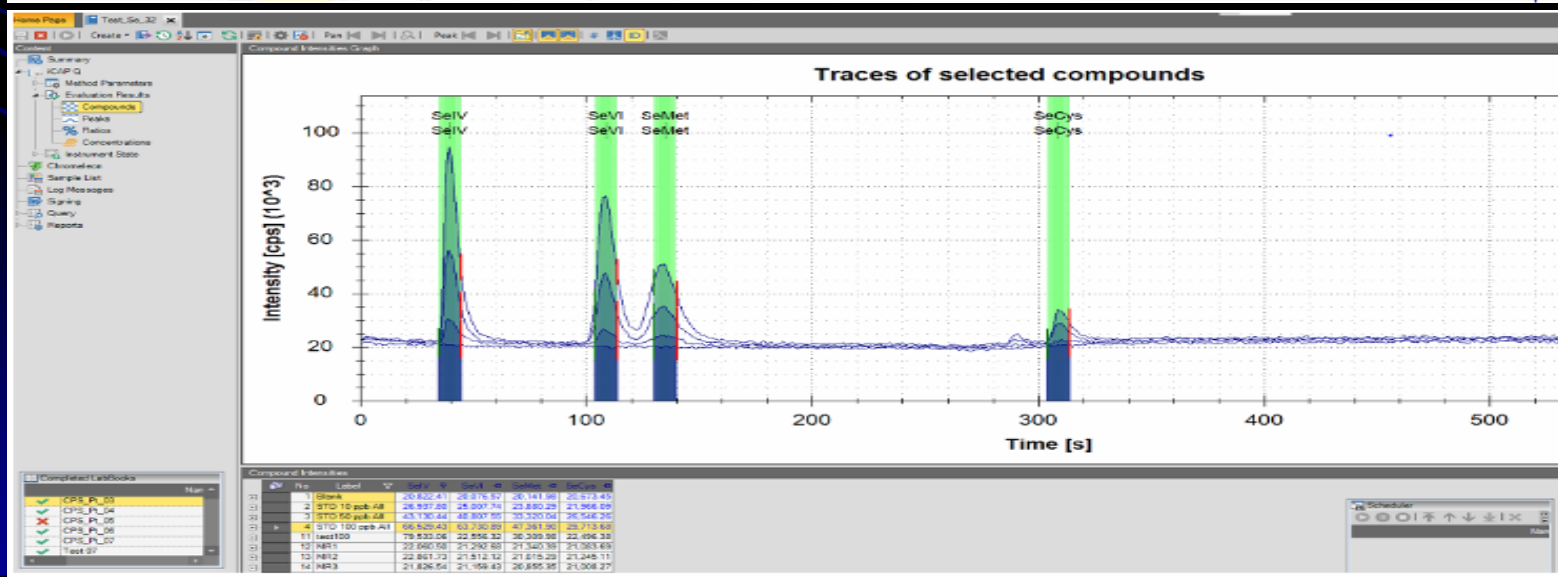
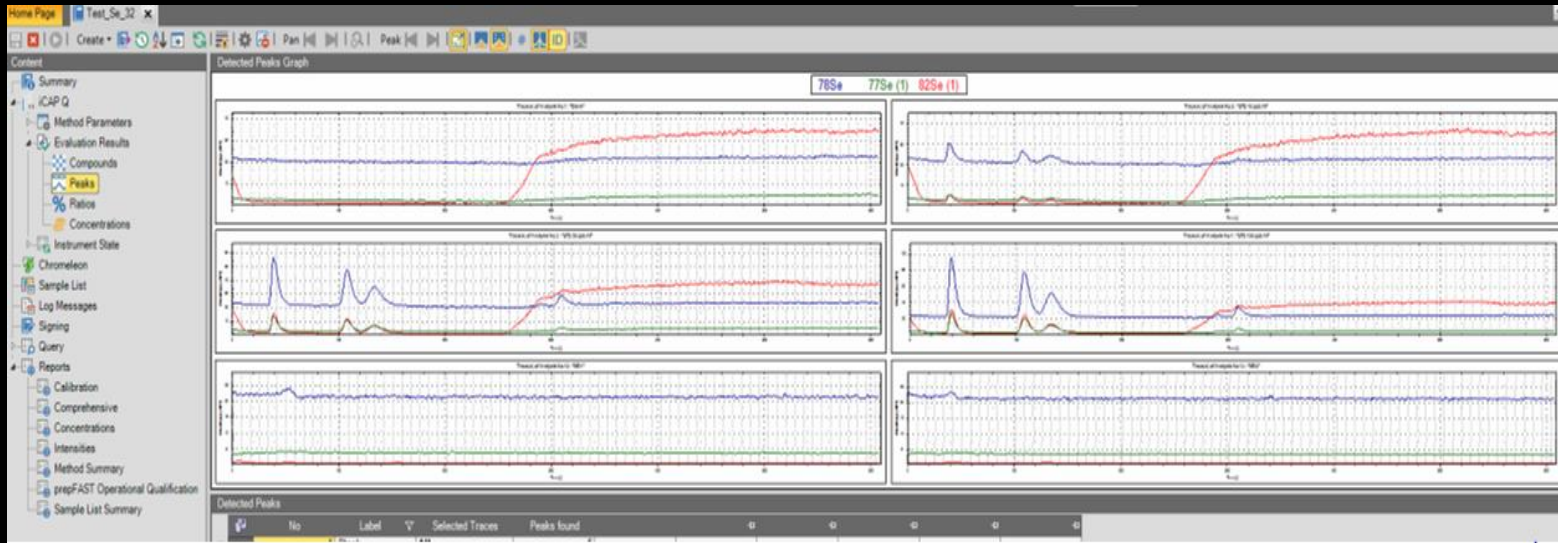
Parametry iCAP Qc ICP-MS

- Výkon plazmatu 1550 W
- Průtok zmlžovacího plynu 0.80 L/min
- Průměr injektoru 2 mm I.D., křemenné sklo
- Vzorkovací a sběrný konus Ni/Pt
- Průtok He v kolizní cele 4.8 mL/min
- Nastavení napětí pro KED 2 V
- Vzorkovací čas kanálu 100 ms

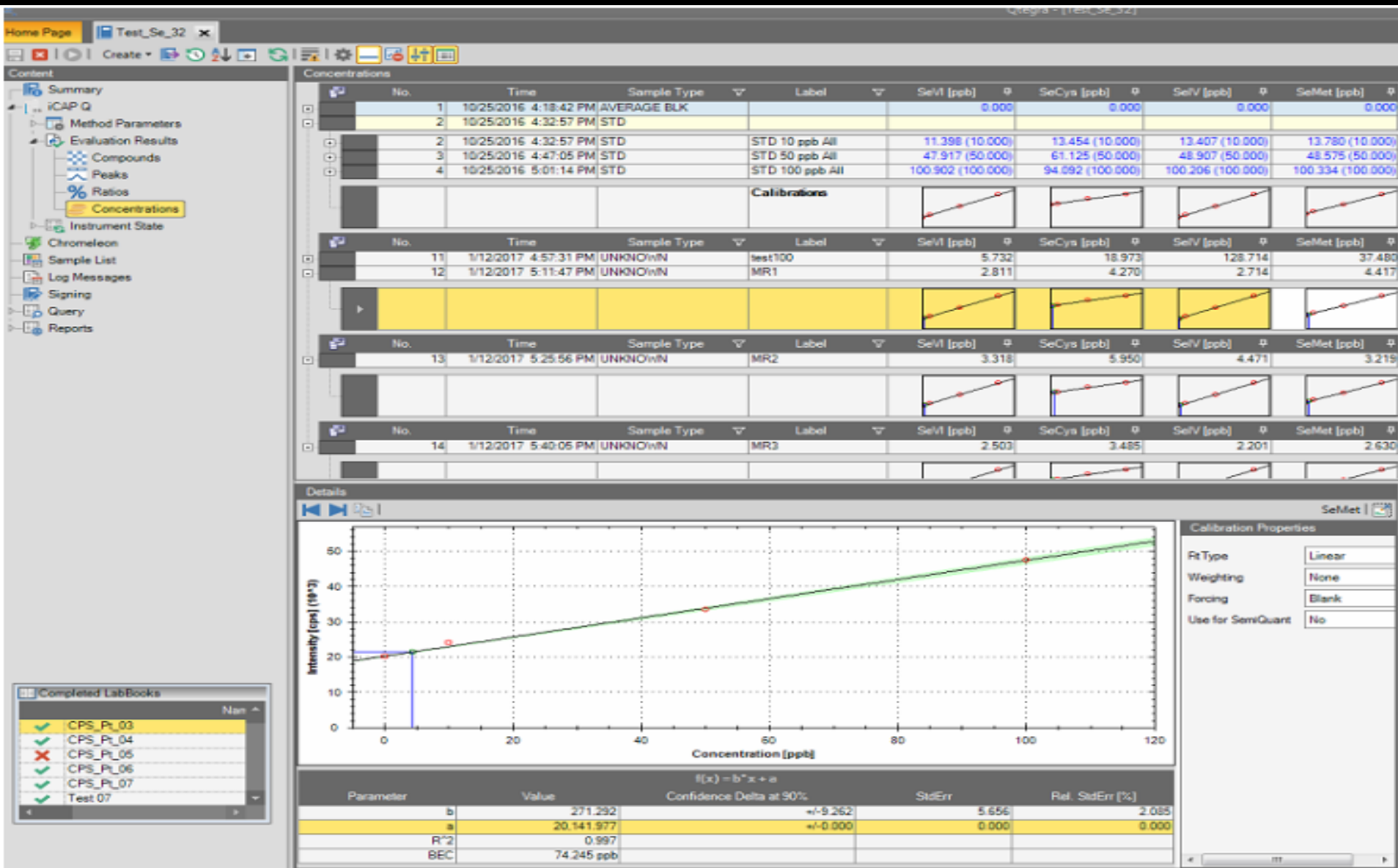


Stanovení jednotlivých forem Se pomocí IC-ICP-MS – optimalizace parametrů

Kolona AS7, 4 x 250 mm, 10 μm , gradient, A: 20 mmol/l uhličitán amonný, B: 200 mmol/l uhličitán amonný, 0.8 ml/min, vzorek 20 μl , doba 540 s (9 min)



Stanovení jednotlivých forem Se pomocí IC-ICP-MS – optimalizace parametrů



Hodnotící kritéria pro kontaminaci kovy

- **Index znečištění kovy** (**MPI** – metal pollution index)
- **Chronický denní příjem** (**CDI** – chronic daily intake)
- **Rizikový kvocient** (**HQ** – hazard quotient)
- **Index nebezpečí** (**HI** – hazard index)
- **Karcinogenní riziko** (**Risk(ccs)** – carcinogenic risk)
- **Předběžný denní příjem minerálních látek** (**PDMI** - provisional daily mineral intake)



Article

The Effect of Flake Production and *In Vitro* Digestion on Releasing Minerals and Trace Elements from Wheat Flakes: The Extended Study of Dietary Intakes for Individual Life Stage Groups

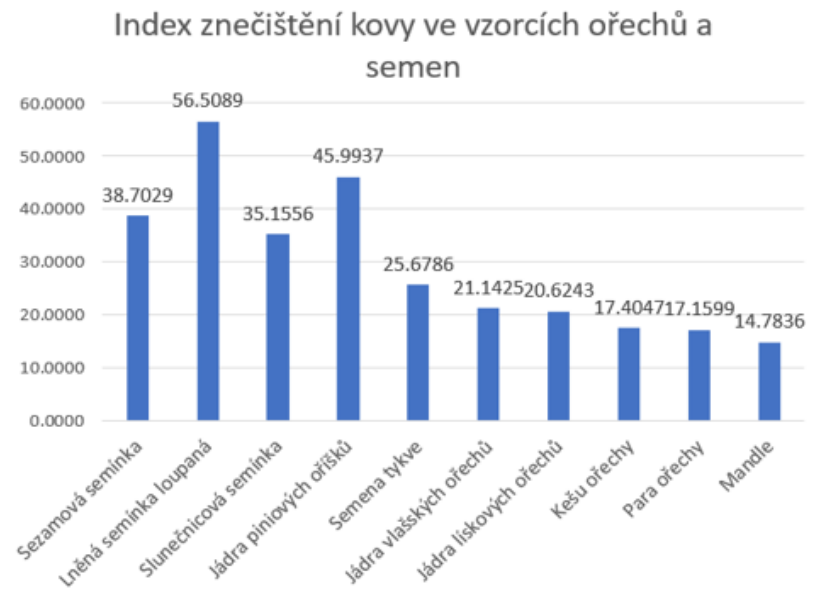
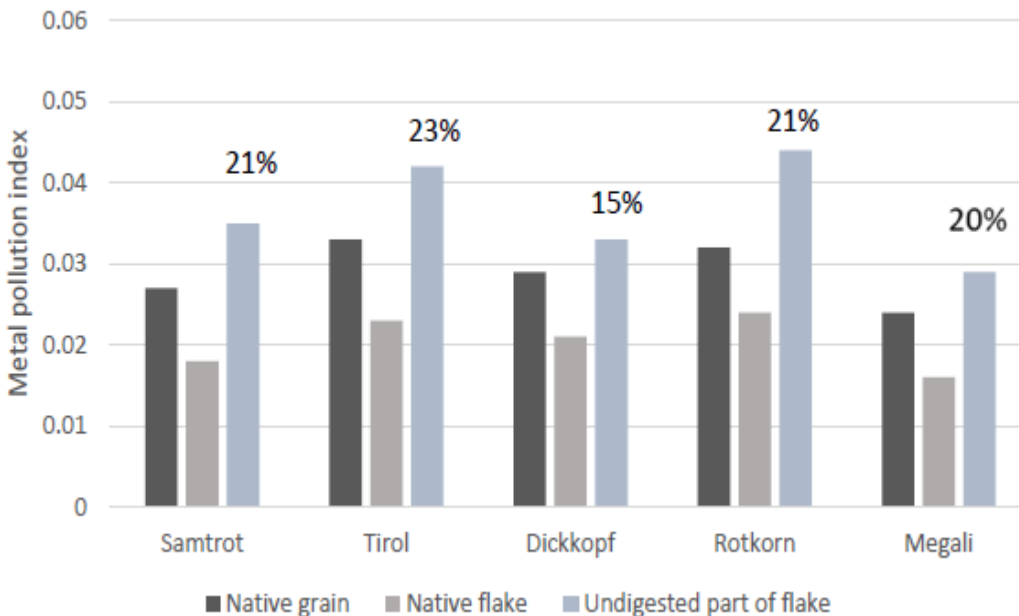
Daniela Sumczynski ^{1,*}, Miroslav Fišera ¹, Richardos Nikolaos Salek ² and Jana Orsavová ³

¹ Department of Food Analysis and Chemistry, Tomas Bata University in Zlín, Vavrečkova 5669, 760 01 Zlín, Czech Republic

² Department of Food Technology, Tomas Bata University in Zlín, Vavrečkova 5669, 760 01 Zlín, Czech Republic

³ Language Centre, Tomas Bata University in Zlín, Štefánikova 5670, 760 01 Zlín, Czech Republic

* Correspondence: sumczynski@utb.cz



Graf 3 Index znečištění kovy (MPI) stanovený pro vzorky ořechů a semen

ZÁVĚRY

- **Potvrzuje se význam speciální analýzy v různých oblastech**
- **Porozumění biochemickým a metabolickým procesům**
- **Potravní řetězec (biodostupnost, toxicita)**
- **Životní prostředí (osudy kontaminantů)**
- **Tlak na legislativu**

Děkuji za pozornost.

