



**WIKTOR LORENC**

**Badanie specjacji pierwiastków toksycznych  
w próbkach żywności ciekłej i stałej  
technikami sprzężonymi LC/ICP-DRC-MS i ESI-MS/MS**

PRACA DOKTORSKA WYKONANA W  
ZAKŁADZIE ANALIZY ŚLADOWEJ  
WYDZIAŁU CHEMII  
UNIWERSYTETU IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

PROMOTOR: PROF. DR HAB. DANUTA BARAŁKIEWICZ

POZNAŃ 2020



**Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:**

**Pani Profesor Danucie Barańkiewicz**

za cenne rady, zaangażowanie i pomoc oraz opiekę nad niniejszą rozprawą doktorską,

**Koleżankom i Kolegom z Zakładu Analizy Śladowej**

za serdeczną atmosferę, życzliwość i okazane wsparcie,

**Żonie Marcie**

za wytrwałość oraz zaangażowanie,

**Rodzicom**

za nieślabnące wsparcie.

Praca częściowo finansowana w ramach grantu:

NCN OPUS 2017/25/B/ST4/00374

„Wielopierwiastkowa analiza specjacyjna ciekłych i stałych próbek żywności zaawansowaną techniką sprzężoną HPLC/ICP-DRC-MS. Nowe procedury analityczne dla oznaczania toksycznych form specjacyjnych pierwiastków: As, Pb, Cd, Cr i Sb”

# Spis treści

<b>Wykaz stosowanych akronimów .....</b>	<b>7</b>
<b>Wstęp .....</b>	<b>9</b>
<b>Część teoretyczna .....</b>	<b>11</b>
1. <i>Wybrane pierwiastki chemiczne w analizie żywności .....</i>	<i>13</i>
1.1 Pierwiastki toksyczne.....	13
1.1.1 Arsen .....	13
1.1.2 Antymon .....	16
1.1.3 Chrom .....	17
1.1.4 Ołów.....	18
1.1.5 Kadm .....	19
1.1.6 Nikiel .....	20
1.1.7 Rtęć .....	21
1.1.8 Cyna .....	22
1.2 Pierwiastki niezbędne.....	23
1.2.1 Selen .....	23
1.2.2 Cynk .....	25
1.2.3 Miedź .....	27
2. <i>Rodzaje próbek żywności w badaniach specjacji pierwiastków chemicznych przy zastosowaniu techniki sprzężonej LC/ICP-MS oraz technik komplementarnych .....</i>	<i>29</i>
2.1 Żywność pochodzenia wodnego.....	29
2.2 Żywność pochodzenia roślinnego.....	30
2.3 Pozostałe produkty żywnościowe.....	31
3. <i>Wybrane techniki analityczne w badaniu specjacji pierwiastków chemicznych w żywności.....</i>	<i>31</i>
3.1 LC/ICP-MS .....	32
3.2 Techniki komplementarne.....	32
4. <i>Uregulowania prawne dotyczące zawartości pierwiastków chemicznych w żywności.....</i>	<i>39</i>
<b>Cel pracy.....</b>	<b>44</b>
<b>Część eksperymentalna .....</b>	<b>45</b>
5. <i>Aparatura i sprzęt laboratoryjny, odczynniki, materiał badawczy.....</i>	<i>47</i>
5.1 Aparatura i sprzęt laboratoryjny .....	47
5.2 Odczynniki, materiały odniesienia, gazy.....	47
5.3 Materiał badawczy .....	49
6. <i>Wyniki i dyskusja .....</i>	<i>57</i>
6.1 Badanie specjacji pierwiastków chemicznych w próbkach żywności ciekłej .....	57
6.1.1 Badanie wpływu materiału i koloru opakowania na specjację As, Cr i Sb w butelkowanych wodach mineralnych .....	57
6.1.1.1 Procedura analityczna badania specjacji As, Cr i Sb w butelkowanych wodach mineralnych .....	58
6.1.1.2 Zapewnienie i kontrola jakości wyników pomiarów .....	59
6.1.1.3 Wyniki badania specjacji As, Cr i Sb w butelkowanych wodach mineralnych.....	64
6.1.2 Badanie specjacji arsenu, chromu i antymonu w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych .....	67

6.1.2.1	Procedury analityczne badania specjacji As, Cr i Sb w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych .....	67
6.1.2.2	Zapewnienie i kontrola jakości wyników pomiarów .....	73
6.1.2.3	Wyniki badania specjacji As, Cr i Sb w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych .....	77
6.2	Badanie specjacji pierwiastków chemicznych w próbkach żywności stałej .....	98
6.2.1	Analiza specjacyjna arsenu w algach i produktach żywnościowych z alg .....	99
6.2.1.1	Przygotowanie próbek alg oraz produktów żywnościowych z alg do analizy .....	100
6.2.1.2	Procedury analityczne badania specjacji arsenu w algach i produktach żywnościowych z alg .....	103
6.2.1.3	Zapewnienie i kontrola jakości wyników pomiarów .....	105
6.2.1.4	Wyniki badania specjacji arsenu w algach i produktach żywnościowych z alg .....	107
	<b>Podsumowanie i wnioski .....</b>	<b>115</b>
	<b>Literatura .....</b>	<b>118</b>
	<b>Streszczenie .....</b>	<b>132</b>
	<b>Summary .....</b>	<b>135</b>
	<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>138</b>
	<b>Spis dorobku naukowego .....</b>	<b>139</b>

## Wykaz stosowanych akronimów

### Techniki analityczne

$\mu$ XANES	Absorbpcja rentgenowska, mikro- rentgenowska absorpcyjna struktura przy krawędziowa
CSP	Chiralna faza stacjonarna
AX	Chromatografia anionowymienna
LC	Chromatografia cieczowa
CX	Chromatografia kationowymienna
RP	Chromatografia w odwróconym układzie faz
SEC	Chromatografia wykluczania (żelowa)
DRC	Dynamiczna komora reakcyjna
SPE	Ekstrakcja do fazy stałej
ME	Ekstrakcja wspomagana mikrofalami
UE	Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami
CE	Elektroforeza kapilarna
SDS-PAGE	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym
XRF	Fluorescencja rentgenowska
MALDI-MS	Jonizacja/desorpcja laserowej wspomagana matrycą połączona ze spektrometrią mas
SR- $\mu$ XRF	Mikro-spektrometria fluorescencji rentgenowskiej, oparta na promieniowaniu synchrotronowym
ASE	Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika
APCI-MS	Spektrometria mas z jonizacją chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym
ESI-MS	Spektrometria mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie
ICP-MS	Spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie
MS/MS	Tandemowa spektrometria mas
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa

### Instytucje

ICH	Międzynarodowa Rady Harmonizacji
IUPAC	Międzynarodowa Unia Chemii Czystej I Stosowanej
IARC	Międzynarodową agencję badań nad rakiem
NMIJ	Narodowy Instytut Metrologii Japonii
NIST	Narodowy Instytut Standardów I Technologii
FAO	Organizacja Narodów Zjednoczonych Do Spraw Wyżywienia I Rolnictwa
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia
EU	Unia Europejska
UNESDA	Unia Europejskich Stowarzyszeń Napojów

### Związki chemiczne

AsB	Arsenobetaina
AsC	Arsenocholina
TMSbCl <sub>2</sub>	Dichlorek trimetylantymonu
DMA	Dimetyloarsyna
GPAsC	Glicerofosfoarsenocholina
TMA	Jon trimetyloarsyny
As(GS) <sub>3</sub>	Kompleks GSH (glutation zredukowany) z As(III)
Cd(GS) <sub>4</sub>	Kompleksy GSH (glutation zredukowany) z Cd(II)
methyl-N-AHPAA	Kwas 3-acetamido-4-hydroksyfenylarsonowy
methyl-3-AHPAA	Kwas 3-amino-4-hydroksyfenylarsonowy
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy
DMAcA	Kwas dimetyloarsynooctowy
DMAS	Kwas dimetylarsynotioinowy
DMSb	Kwas dimetyloantymonowy
DMAB	Kwas dimetyloarsenobutanowy
DMAP	Kwas dimetyloarsenopropanowy
DMAA	Kwas dimetyloarsenowy

methyl-ROX	Kwas metylo-3-nitro-4-hydroksyfenyloarsonowy
MMSb	Kwas monometyloantymonowy
MMAA	Kwas monometyloarsenowy
NAHAA	Kwas N-acetylo-4-hydroksy-m-arsanilowy
MeHg	Metylortęć
MeSe-pentoza-heksoza	Metyloselena-Se-pentoza-heksoza
MMA	Monometyloarsyna
N-Acetyl-CysSeMet	N-acetylo-cysteinyloselenometionina
As-cukry	Pochodne cukrów zawierające arsen
As-lipidy	Pochodne tłuszczów zawierające arsen
SeHLan	Selenohomolantionina
SeOMet	Se-tlenek selenometioniny
MeSeCys	Se-metylo-selenocysteina
TMAO	Tlenek trimetyloarsenu
TEL	Trietylołów
TMA	Trimetyloarsyna
TML	Trimetylołów
GluMeSeCys	γ- glutamylo-Se-metylo-selenocysteina
<b>Inne</b>	
tSb	Antymon całkowity
tAs	Arsen całkowity
Ex tAs	Arsen całkowity w ekstraktach z alg
iAs	Arsen nieorganiczny
CRM	Certyfikowany materiał odniesienia
tCr	Chrom całkowity
iSn	Cyna nieorganiczna
RT	Czas retencji
LD <sub>50</sub>	Dawka śmiertelna
LOQ	Granica oznaczalności
LOD	Granica wykrywalności
THQ	Iloraz całkowitego ryzyka
NDS	Najwyższe dopuszczalne stężenie
uAs	Nieznane formy specjacyjne arsenu
SD	Odchylenie standardowe
Rpa	Parametr wykluczania a
Rpq	Parametr wykluczania q
PCV	Poli(chlorek winylu)
PET	Poli(tereftalan etylenu)
PGC	Porowaty węgiel grafitowy
SRM	Standardowy materiał odniesienia
EDI	Szacunkowe dzienne spożycie
MR	Średnia rozdzielczość
HI	Wskaźnik zagrożenia
HR	Wysoka rozdzielczość



## Wstęp

Bezpieczeństwo i jakość żywności zależą od wielu, zarówno biologicznych jak i chemicznych, czynników. Jednym z tych czynników jest obecność w produktach żywnościowych pierwiastków chemicznych, zarówno toksycznych jak i niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu ludzkiego. Toksyczność oraz biodostępność pierwiastków chemicznych zależy nie tylko od dawki czy drogi podania danego pierwiastka, ale także od formy chemicznej w jakiej pierwiastek ten występuje. W związku z powyższym oznaczenie tylko całkowitej zawartości pierwiastków chemicznych w próbce żywności nie jest wystarczające w ocenie jakości produktów żywnościowych. Informacje o formach chemicznych pierwiastków występujących w próbce można uzyskać dzięki zastosowaniu analizy specjacyjnej.

Analiza specjacyjna jest jedną z najważniejszych dziedzin współczesnej chemii analitycznej, najczęściej badane w analizie specjacyjnej matryce to woda, żywność, próbki kliniczne oraz osady, gleby i popioły. Jednym z powodów dynamicznego rozwoju w dziedzinie analizy specjacyjnej jest równie dynamiczny rozwój nowoczesnych technik analitycznych takich jak spektrometria mas czy chromatografia. Niemniej istotny czynnik motywujący do aktywnych badań nad specjacją pierwiastków chemicznych w żywności jest potrzeba uwzględnienia różnorodności form chemicznych pierwiastków w uregulowaniach prawnych dotyczących między innymi produktów żywnościowych. W znacznej większości norm prawnych obowiązujących na całym świecie najwyższe dopuszczalne zawartości pierwiastków chemicznych w produktach żywnościowych odnoszą się do całkowitych zawartości tych pierwiastków. W przypadku toksycznych pierwiastków takich jak arsen, chrom, antymon, cyna, rtęć, kadm czy ołów oznaczenie dużej całkowitej zawartości tych pierwiastków w próbce żywności nie musi świadczyć o niebezpieczeństwie związanym z konsumpcją takiej próbki. Jest to związane z diametralnymi różnicami w toksyczności wymienionych pierwiastków chemicznych w zależności od stopnia utlenienia czy obecności pierwiastka w formie nieorganicznej lub organicznej. Analiza specjacyjna znajduje zastosowanie nie tylko w odniesieniu do pierwiastków chemicznych mogących wykazywać negatywny wpływ na organizm ludzi, ale także w odniesieniu do badania niezbędnych do życia mikroelementów. Pierwiastki takie jak miedź, cynk, chrom czy selen uznawane są za niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Specjacja tych pierwiastków może mieć istotny wpływ na zdolność przyswajania przez organizm ludzki bądź nawet determinować między toksycznym (chrom na szóstym stopniu utlenienia) bądź pożądanym (chrom na trzecim stopniu utlenienia) działaniem. Obie te kwestie stają się niezwykle istotne w odniesieniu do żywności funkcjonalnej czy modyfikowanej w celu zwiększenia suplementacji niezbędnych do życia pierwiastków. Wielopierwiastkowa analiza specjacyjna możliwa jest dzięki zastosowaniu nowoczesnej, zaawansowanej techniki sprzężonej: chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (LC/ICP-MS, ang. Liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry). Uniwersalny charakter chromatografii cieczowej pozwala na stosowanie w ramach jednego układu chromatograficznego wielu różnych technik rozdzielania. Możliwości analityczne techniki sprzężonej LC/ICP-MS takie jak wysoka czułość, niskie wartości granicy wykrywalności oraz wysoka precyzja pomiarów umożliwiają analizę wielopierwiastkową na poziomach stężeń  $\text{pg L}^{-1}$ . Analiza specjacyjna przy użyciu techniki sprzężonej LC/ICP-MS mimo swoich niewątpliwych zalet nie jest jednak w stanie dostarczyć analitykowi kompletnych informacji na temat form specjacyjnych pierwiastków chemicznych występujących w próbce. Identyfikacja form specjacyjnych pierwiastków może opierać się tylko na porównaniu czasów retencji z substancją wzorcową. W przypadku braku dostępności

wzorców poszczególnych substancji niemożliwa jest identyfikacja formy specyficjnej pierwiastka przy zastosowaniu tylko techniki sprzężonej LC/ICP-MS. W takim przypadku konieczne jest zastosowanie technik komplementarnych pozwalających na identyfikację złożonych form chemicznych pierwiastków. Najczęściej stosowaną techniką pozwalającą na identyfikację zarówno nieorganicznych jak i organicznych form chemicznych pierwiastków jest spektrometria mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ESI-MS, ang. electrospray ionisation mass spectrometry). Zastosowanie technik komplementarnych w analizie żywności pozwala na uzyskanie pełnego obrazu specjacji pierwiastków chemicznych w próbce i tym samym umożliwia rzetelne wnioskowanie na temat bezpieczeństwa i jakości produktów żywnościowych.

## **Część teoretyczna**



## 1. Wybrane pierwiastki chemiczne w analizie żywności

Pierwiastki chemiczne są wszechobecne w środowisku naturalnym, ich pochodzenie może być zarówno naturalne jak i antropogeniczne. Do źródeł naturalnych zaliczyć można przede wszystkim wietrzenie skał. Zdecydowanie większy wpływ na emisję pierwiastków chemicznych do środowiska naturalnego mają jednak źródła antropogeniczne takie jak przemysł, transport czy rolnictwo. W konsekwencji uwalniania pierwiastków chemicznych do powietrza, gleb i wód naturalnych, które stają się integralnym elementem łańcucha pokarmowego, którego ostatnim elementem jest człowiek. Ze względu na coraz większe zanieczyszczenie środowiska kwestie związane z bezpieczeństwem żywności zyskują na znaczeniu [1]. Pierwiastki chemiczne można podzielić na dwie grupy ze względu na ich działanie na organizm ludzki, pierwiastki toksyczne oraz pierwiastki niezbędne do życia. W przypadku pierwiastków niezbędnych do życia ich rola może być niezwykle różnorodna. Pierwiastki chemiczne mogą stanowić materiał budulcowy ludzkiego ciała, brać udział w przemianach metabolicznych, regulować równowagę elektrolitową czy w końcu stanowić istotny element enzymów oraz hormonów. Podstawowym kryterium determinującym toksyczny lub pożądany wpływ pierwiastka chemicznego na organizm człowieka stanowi dawka, nawet w przypadku niezbędnych mikro- i makroelementów zbyt wysoka dawka może wywoływać toksyczne działanie [2,3].

Przy obecnym stanie wiedzy nie można jednak mówić o toksycznym bądź nietoksycznym działaniu pierwiastków chemicznych jedynie w odniesieniu do dawki czy drogi wprowadzenia do organizmu. Powszechnie wiadomym jest, że działanie pierwiastków chemicznych na organizm ludzki zależy w dużej mierze od formy chemicznej w jakiej dany pierwiastek występuje [4,5]. Badanie specjacji pierwiastków chemicznych jest szczególnie istotne w odniesieniu do bezpieczeństwa i jakości produktów żywnościowych. Diametralnie różne oddziaływanie na organizm ludzki różnych form specjacyjnych pierwiastków takich jak arsen, chrom, antymon, cyna, rtęć, kadm czy ołów jednoznacznie wskazuje, że oznaczanie tylko całkowitej zawartości tych pierwiastków nie jest wystarczające. Równie duże znaczenie wykazuje analiza specjacyjna w odniesieniu do mikroelementów niezbędnych do życia takich jak miedź, cynk, chrom czy selen. Bioprzyswajalność tych pierwiastków chemicznych zależy od formy w jakiej są one dostarczane organizmowi. Badanie specjacji pierwiastków niezbędnych do życia dostarcza istotnych informacji, które następnie mogą zostać wykorzystane w celu efektywnej suplementacji tych pierwiastków za pomocą żywności funkcjonalnej i modyfikowanej.

### 1.1 Pierwiastki toksyczne

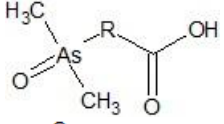
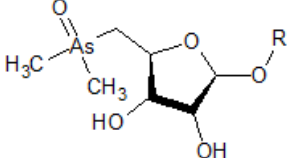
#### 1.1.1 Arsen

Arsen jest pierwiastkiem naturalnie występującym w znacznych ilościach w glebie w zakresie od 0,1 do 48 mg kg<sup>-1</sup> oraz w wodzie morskiej na poziomie 1,45 x 10<sup>-3</sup> mg kg<sup>-1</sup>. Zdecydowanie mniejsze ilości arsenu można znaleźć w wodzie słodkiej, od 0,1 do 800 ng g<sup>-1</sup> [6]. Wysoka zawartość arsenu w środowisku wynika z faktu, że pierwiastek ten jest składnikiem ponad 245 minerałów spośród których największe znaczenie mają piryty [7]. Istotne znaczenie na obecność tego pierwiastka w środowisku naturalnym mają także źródła antropogeniczne. Ze względu na swoją toksyczność arsen był powszechnie stosowany jako składnik pestycydów, herbicydów oraz insektycydów, ale także w środkach do konserwacji drewna. Również w przemyśle można odnaleźć źródła emisji arsenu do środowiska naturalnego takie jak: produkcja elektroniki, produkcja szkła ale także przetwórstwo metali czy przemysł energetyczny [7,8].

W środowisku wodnym arsen występuje głównie w formie arsenianów (III) w wodach podziemnych oraz arsenianów (V) w wodach powierzchniowych. Równowaga form specyficjnych arsenu w wodzie zależy głównie od pH oraz obecności mikroorganizmów mogących przekształcać nieorganiczny arsen do prostych form organicznych takich jak dimetyloarsyna (DMA) czy monometyloarsyna (MMA). Podwyższona obecność organicznych form arsenu może mieć swoje źródło w silnym zanieczyszczeniu wód gruntowych przez przemysł lub rolnictwo. W przypadku gleby dominującą formą specyficzną arsenu są arseniany (V) oraz kwas arsenowy (III). Podobnie jak w przypadku wody również w glebie zachodzi możliwość transformacji nieorganicznego arsenu przez mikroorganizmy. Równowaga form specyficjnych oraz rozpuszczalność arsenu znajdującego się w glebie silnie zależy od właściwości redukująco-utleniających gleby. Obecność jonów takich jak  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  limituje pochłanianie arsenu w glebie. Arsen może dostawać się do atmosfery zarówno w wyniku procesów naturalnych (wietrzenie skał, erupcje wulkaniczne) oraz działań antropogenicznych (przetwórstwo metali, spalanie paliw kopalnych) głównie w formie trójtlenku arsenu. Zanieczyszczenie powietrza arsenem może prowadzić do wtórnego zanieczyszczenia wierzchnich warstw gleby (ok. 5 cm) [6,7].

W badaniach próbek biologicznych zidentyfikowano do tej pory ponad 25 form specyficjnych arsenu, zaczynając od prostych nieorganicznych takich jak arsenowódor kończąc na złożonych organicznych arsenocukrach. Wybrane formy specyficjne arsenu oraz odpowiadające im wartości dawki śmiertelnej ( $\text{LD}_{50}$ , ang. Lethal dose) zebrano w tabeli 1 [7].

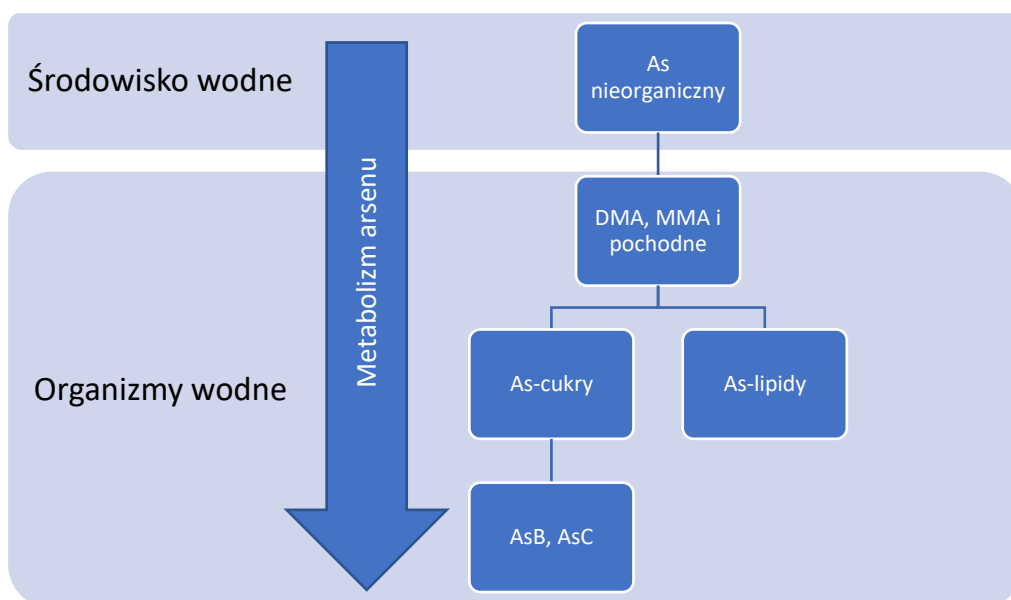
Tabela 1. Wybrane formy specyficjne arsenu wraz z wartościami  $\text{LD}_{50}$  [7].

Forma specyficjna	$\text{LD}_{50}$ [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]	Wzór chemiczny
Arsen pierwiastkowy	763	As
<b>Nieorganiczne formy specyficjne</b>		
Tlenek arsenu (III)	14	$\text{As}_2\text{O}_3$
Kwas arsenowy (III)	14	$\text{H}_3\text{AsO}_3$
Arseniany (III)	14	$\text{AsO}_3^{3-}$
Chlorek arsenu	14	$\text{AsCl}_3$
Siarczek arsenu	14	$\text{As}_2\text{S}_3$
Wodorek arsenu (arszenik)	3	$\text{AsH}_3$
Tlenek arsenu (V)	20	$\text{As}_2\text{O}_5$
Kwas arsenowy (V)	20	$\text{H}_3\text{AsO}_4$
Kwas metaarsenowy (V)	20	$\text{HASO}_3$
Arseniany (V)	20	$\text{AsO}_4^{3-}$
<b>Organiczne formy specyficjne</b>		
Monometyloarsyna (MMA)	-	$\text{CH}_3\text{AsH}_2$
Dimetyloarsyna (DMA)	-	$(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$
Trimetyloarsyna (TMA)	-	$(\text{CH}_3)_3\text{As}$
Kwas monometyloarsenowy (MMAA)	1800	$\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$
Kwas dimetyloarsenowy (DMAA)	2600	$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$
Tlenek trimetyloarsenu (TMAO)	-	$(\text{CH}_3)_3\text{AsO}$
Arsenobetaina (AsB)	-	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+ \text{CH}_2\text{COOH}$
Arsenocholina (AsC)	-	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
2-dimetyloarsynoetanol	-	$(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
Pochodne tłuszczów zawierające arsen (As-lipidy)	-	
Pochodne cukrów zawierające arsen (As-cukry)	-	

W literaturze można znaleźć informacje opisujące pozytywny wpływ arsenu na wybrane gatunki roślin oraz zwierząt [9,10]. Zdecydowanie większa ilość doniesień literaturowych określa jednak wpływ arsenu na organizmy roślin i zwierząt jako toksyczny [7,8].

Znaczenie arsenu dla prawidłowego funkcjonowania ludzkiego organizmu nie zostało do tej pory potwierdzone. Przeprowadzone badania sugerują zapotrzebowanie na arsen na poziomie około 25 do 50 ng/g As pożywienia nie mniej wartości te nie mogą być traktowane jako zalecane spożycie arsenu w diecie. Zakłada się, że dzienne spożycie arsenu związane z pożywieniem oraz wodą zawiera się na poziomie zbliżonym do powyższych wartości. Toksyczność arsenu dla organizmów ludzkich silnie zależy od formy specjacyjnej. Kancerogenne właściwości nieorganicznych związków arsenu w stosunku do człowieka zostały udokumentowane i zakwalifikowane przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC, ang. International Agency for Resarch on Cancer) do Grupy 1 – czynnik rakotwórczy dla człowieka [11]. Uważa się, że formy nieorganiczne arsenu są dużo bardziej toksyczne od prostych form organicznych takich jak DMA, MMA i ich pochodne. Złożone formy organiczne jak AsC czy AsB są uważane za nietoksyczne. Kwestią dyskusyjną wymagającą dalszych badań jest działanie toksyczne As-cukrów i As-lipidów [7].

Ze względu na wszystkie powyższe właściwości arsenu badanie zawartości tego pierwiastka w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi oraz w produktach żywnościowych jest szczególnie istotne. Najwyższe stężenia arsenu wykrywane są w wodnych formach życia u których występuje zjawisko akumulacji tego pierwiastka z otoczenia. Często prowadzi to do obecności wyższych stężeń tego pierwiastka w tkankach organizmów żywych niż w otaczającym je środowisku wodnym. Równie istotny jest jednak fakt, że wykrywany w tych organizmach arsen występuje głównie w mniej toksycznych formach organicznych [7,12,13]. Przebieg metabolizmu arsenu w organizmach wodnych przedstawiono schematycznie na rysunku 1.



Rysunek 1. Schemat metabolizmu arsenu w organizmach wodnych.

W przypadku roślin skłonności do pochłaniania i akumulacji arsenu są ściśle związane z podobieństwem tego pierwiastka do fosforu. Nieorganiczne formy arsenu są zwykle pobierane i akumulowane w części korzeniowej rośliny, formy organiczne z kolei mogą być wchłaniane za

pomocą liści lub kory drzew. Tendencje do akumulacji arsenu są różne dla różnych grup roślin, większość zbóż nie wykazuje tendencji do akumulowania tego pierwiastka, z kolei ryż, warzywa czy owoce uprawiane na glebach bogatych w arsen mogą wykazywać znacznie podwyższone zawartości związków arsenu [7]. Zwierzęta lądowe pobierają arsen przede wszystkim wraz z pokarmem lub suplementami takimi jak, obecnie w Europie zakazany, kwas 4-hydroksy-3-nitrobenzenoarsenowy (roksarson, ang. Roxarsone) [14,15].

Badanie specjacji arsenu skupia się obecnie przede wszystkim na próbkach wód naturalnych oraz przeznaczonych do spożycia przez ludzi, próbkach organizmów wodnych oraz próbkach moczu. Rzadziej spotykane rodzaje próbek poddawane analizie specjacyjnej arsenu to rośliny, zwierzęta, gleba i osady dennie oraz popioły lotne. Mimo relatywnie małej różnorodności próbek arsen jest jednym z najczęściej poddawanych analizie specjacyjnej pierwiastków [16].

### 1.1.2 Antymon

Antymon jest uznawany za jedno z najistotniejszych obecnie zanieczyszczeń środowiska. Antymon występuje naturalnie w glebie w zakresie od 0,01 do 1,0 mg kg<sup>-1</sup>, punktowo jednak pomiary wykazywały zawartości sięgające aż 500 mg kg<sup>-1</sup> [6,7]. W wodzie antymon występuje w stężeniach poniżej 1 µg L<sup>-1</sup> [7]. Antymon może być także uwalniany do środowiska ze źródeł antropogenicznych, przede wszystkim związanych z przemysłem. Istotnym zastosowaniem antymonu jest dodatek do szerokiej gamy materiałów ogniotrwałych. Pierwiastek ten znajduje także zastosowanie w produkcji ceramiki i szkła a także jako dodatek stopowy do ołowiu. Najbardziej istotnym z perspektywy zanieczyszczenia środowiska zastosowaniem antymonu jest produkcja szerokiej gamy tworzyw sztucznych takich jak guma, żywice poliestrowe czy poliolefiny, w której pierwiastek ten jest stosowany jako katalizator i stabilizator procesu. Podobnie jak w przypadku arsenu również antymon jest emitowany do środowiska naturalnego podczas spalania paliw kopalnych. Mniej istotnym z perspektywy zanieczyszczenia środowiska jednak wartym odnotowania zastosowaniem antymonu jest jego wykorzystanie w lekach, głównie stosowanych do leczenia tropikalnych chorób pasożytniczych [7,8].

W aktualnej literaturze nie ma wielu informacji na temat specjacji antymonu w środowisku naturalnym, wątkiem przewodnim w dostępnych badaniach są podobieństwa chemiczne antymonu i arsenu. W glebie antymon występuje głównie w formie nieorganicznej na piątym i trzecim stopniu utlenienia, niektórzy naukowcy donoszą także o obecności metylowanych związków antymonu w powierzchniowych warstwach gleby. Niezależnie od formy występowania antymon jest trudno ekstrahowany z gleby [7,17,18]. Analogicznie jak w glebach kształtuje się specjacja antymonu w wodach naturalnych, w tym przypadku naukowcy również raportują tylko obecność form nieorganicznych oraz metylowanych tego pierwiastka [17,19]. Rośliny mogą pobierać i akumulować antymon zarówno z gleby jak i wody. Do tej pory w próbkach roślin zidentyfikowano jedynie formy nieorganiczne oraz metylowane antymonu. Wybrane formy specjacyjne antymonu zebrano w tabeli 2 [20,21].

Tabela 2. Wybrane formy specjacyjne antymonu [20,21].

Forma specjacyjna	Wzór chemiczny
Antymonowodór	SbH <sub>3</sub>
Tlenek antymonu	Sb <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Chlorek antymonu	SbCl <sub>3</sub>
Antymoniany (III)	Sb(OH) <sub>2</sub> <sup>+</sup> lub Sb(OH) <sub>4</sub> <sup>-</sup>
Antymoniany (V)	Sb(OH) <sub>6</sub> <sup>-</sup> lub SbO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Kwas monometyloantymonowy (MMSb)	CH <sub>3</sub> SbO(OH) <sub>2</sub>
Kwas dimetyloantymonowy (DMSb)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SbO(OH)
Trimetylostibina	Sb(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Dichlorek trimetylantymonu (TMSbCl <sub>2</sub> )	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> SbCl <sub>2</sub>



Antymon uznawany jest za pierwiastek toksyczny jednak uważa się, że jego toksyczność jest około 10-krotnie niższa niż toksyczność arsenu. Podobnie jak w przypadku arsenu stopień toksyczności antymonu zależy od formy specjacyjnej tego pierwiastka. Nieorganiczne formy antymonu (a w szczególności antymon pierwiastkowy) uważane są za najbardziej toksyczne, przy czym antymon na trzecim stopniu utlenienia (oraz jego związki) jest zdecydowanie bardziej toksyczny niż antymon na piątym stopniu utlenienia. Formy metylowane antymonu uważane są za mniej toksyczne od form nieorganicznych [7].

Badanie specjacji antymonu skupia się obecnie przede wszystkim na próbkach środowiskowych takich jak wody naturalne, osady czy gleby [7]. Ze względu na zastosowanie antymonu w produkcji tworzyw sztucznych oczywistym kierunkiem badania specjacji tego pierwiastka wydają się produkty spożywcze do których pakowania wykorzystywane są polimery. W literaturze można znaleźć prace potwierdzające uwalnianie antymonu z opakowania do wody butelkowanej [22,23]. Obecność nieorganicznego antymonu oraz jego kompleksów z kwasem cytrynowym i kwasem mlekowym została potwierdzona w próbkach soków z owoców cytrusowych i jogurtu przechowywanych w pojemnikach z tworzyw sztucznych [24,25].

### 1.1.3 Chrom

Chrom w środowisku naturalnym występuje przede wszystkim w formie minerału o nazwie chromit (tlenek żelaza i chromu -  $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ). Zawartość chromu w glebie waha się od  $5,5 \text{ mg kg}^{-1}$  do nawet  $710 \text{ mg kg}^{-1}$  w przypadku gleb zanieczyszczonych tym pierwiastkiem. Średnią zawartość chromu w glebach szacuje się na  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  [26]. Średnia zawartość chromu w wodzie słonej kształtuje się na poziomie  $0,16 \mu\text{g L}^{-1}$  a w wodzie słodkiej na  $0,18 \mu\text{g L}^{-1}$  [6]. Chrom znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle metalurgicznym, w tym w produkcji stali, który to proces jest głównym źródłem emisji chromu do środowiska naturalnego. Ponadto chrom znajduje także zastosowanie w przemyśle garbarskim, przy produkcji barwników oraz jako składnik impregnatów do drewna [7,8].

Chrom występuje w środowisku naturalnym przede wszystkim na dwóch stopniach utlenienia: Cr(III) oraz Cr(VI), stabilność obu tych form zależy przede wszystkim od potencjału redox. Naturalnie występującą formą w środowisku jest Cr(III), która w warunkach wysokiego pH oraz obecności utleniaczy może zostać utleniona do formy Cr(VI). Prawidłowości te odnoszą się zarówno do chromu znajdującego się w glebie i wodzie [7].

Do tej pory nie potwierdzono żeby chrom odgrywał jakąkolwiek rolę biologiczną w fizjologii roślin. Nadmiar tego pierwiastka może z kolei prowokować procesy morfofizjologiczne i biochemiczne u roślin. Mimo, że pierwiastek ten jest potencjalnie toksyczny dla roślin może on być pobierany z gleby za pośrednictwem kompleksów tworzonych z kwasem cytrynowym, kwasem asparaginowym lub kwasem szczawiowym [27,28].

Toksyczność chromu silnie zależy od stopnia utlenienia tego pierwiastka. Cr(III) uznawany jest za mikroelement niezbędny do prawidłowego metabolizmu lipidów, glukozy i białek u ssaków. Cr(VI) z kolei wykazuje silne działanie mutagenne i genotoksyczne i dlatego został zakwalifikowany przez IARC do Grupy 1 – kancerogen dla człowieka, natomiast Cr(III) do grupy 3 [11]. Przyjmuje się, że Cr(VI) przyjmowany z pożywieniem zostanie zredukowany do formy na III stopniu utlenienia w warunkach panujących w żołądku, nie mniej obecna w pożywieniu toksyczna forma może wchłaniać się jeszcze przed osiągnięciem żołądka [29]. Obecność chromu w żywności i wodzie może wynikać z procesu przetwarzania oraz przechowywania żywności i wody. Ponieważ chrom jest składnikiem wielu stopów, w tym stali, pierwiastek ten może być

wprowadzany do żywności w procesie jej przetwórstwa z wykorzystaniem różnego rodzaju metalowych narzędzi takich jak noże, młyny czy kadzie [29]. Źródłem chromu w wodzie butelkowanej może być pojemnik w którym woda ta jest przechowywana. W literaturze można znaleźć prace potwierdzające zanieczyszczenie chromem wody butelkowanej sprzedawanej w butelkach koloru zielonego [22,30]. Fakt ten może wynikać z zastosowania chromu w produkcji barwników.

Ze względu na diametralne różnice w toksyczności dwóch form chemicznych chromu badanie specjacji tego pierwiastka w żywności cały czas pozostaje istotnym zagadnieniem naukowym.

#### 1.1.4 Ołów

Problematyka zanieczyszczenia środowiska naturalnego ołowiem jest znana od kilkudziesięciu lat. Najbardziej istotnym antropogenicznym źródłem emisji ołowiu do atmosfery i w konsekwencji gleby oraz wody był fakt, że pierwiastek ten był stosowany jako dodatek do paliwa. W związku z emisją ołowiu związaną ze spalaniem paliwa w silnikach spalinowych poziom zawartości tego pierwiastka w glebach i wodzie wzrastał drastycznie w terenach zurbanizowanych powyżej wartości odniesienia, które szacuje się na około  $17 \text{ mg kg}^{-1}$  w niezanieczyszczonej glebie oraz  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  w wodzie słodkiej. Ołów może być także wprowadzany do środowiska z innych źródeł, które jednak mają zdecydowanie mniejsze znaczenie niż wspomniane wcześniej paliwa. Ołów stosowany jest w produkcji środków grzybobójczych, farb antyporostowych, jako katalizator oraz stabilizator w produkcji tworzyw sztucznych, w produkcji szkliwa oraz ceramiki, w akumulatorach kwasowo-ołowiowych, w produkcji farb i barwników oraz jako dodatek do materiałów ogniotrwałych czy chroniących przed promieniowaniem. Ponadto ze względu na wysoką gęstość ołów stosowany jest w produkcji odważników np.: wędkarskich. Wiele z wymienionych źródeł emisji ołowiu przyczynia się nie tylko do wprowadzania tego pierwiastka do środowiska ale także powoduje bezpośrednie narażenie na zatrucie ołowiem pracowników lub mieszkańców związanych z danym źródłem emisji. Ołów może być także emitowany do środowiska za pośrednictwem przemysłu kopalnianego oraz podczas spalania paliw kopalnych [7,8,28]. Spośród naturalnych źródeł emisji ołowiu największe znaczenie mają erupcje wulkaniczne i wietrzenie geochemiczne. Toksyczność ołowiu maleje w szeregu: złożone związki ołowioorganiczne  $\rightarrow \text{R}_4\text{Pb} \rightarrow \text{R}_3\text{Pb}^+ \rightarrow \text{R}_2\text{Pb}^{2+} \rightarrow \text{Pb}^{2+}$  (gdzie R to grupa metylowa lub etylowa) [7].

Ołów w środowisku rzadko występuje w formie pierwiastkowej, w wodzie może tworzyć kompleksy takie jak  $\text{Pb}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Pb}(\text{OH})_3^-$ ,  $\text{Pb}_2(\text{OH})_3^+$  czy  $\text{Pb}_4(\text{OH})_4^{4+}$  lub występować w postaci nierozpuszczalnych związków  $\text{PbO}$ ,  $\text{PbCO}_3$  oraz  $\text{PbSO}_4$ . Zidentyfikowano szereg kompleksów organicznych ołowiu, zarówno związanego z prostymi grupami organicznymi takimi jak grupy metylowe i etylowe jak i z bardziej złożonymi związkami takimi jak kwasy humusowy i kwas fulwowy [7,28]. Ołów w organizmach żywych może być także wiązany, w ramach mechanizmów obrony przed toksycznym działaniem tego pierwiastka, przez metalotioneiny, fitochelatyny oraz białka [31–34].

Badanie specjacji ołowiu w środowisku naturalnym jest obszernie opisane w literaturze naukowej jednak podobne publikacje dotyczące produktów żywnościowych są dużo rzadsze. Ołów nie jest łatwo przyswajany przez rośliny w związku z faktem, że zazwyczaj pierwiastek ten jest silnie związany z glebą za pośrednictwem materii organicznej [28]. W związku z tym transport ołowiu w łańcuchu pokarmowym może być ograniczony. Ze względu na niską mobilność ołowiu w roślinach największe ilości tego pierwiastka mogą kumulować się w

roślinach korzeniowych. Istotne znaczenie, z perspektywy bezpieczeństwa żywności, ma specjacja ołowiu w kakao i jego produktach, których istotnymi konsumentami są dzieci szczególnie narażone na zatrucie ołowiem [28]. Podobnie jak w przypadku arsenu, ołów może być akumulowany przez organizmy morskie takie jak małże, ryby czy algi do poziomów przewyższających stężenia tego pierwiastka w wodzie [35].

Specjacja ołowiu ma istotne znaczenie w odniesieniu do wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, co związane jest z faktem, że pierwiastek ten był kiedyś używany przy produkcji rur oraz zbiorników. Równie ważny jest problem zanieczyszczenia ołowiu wina, związane zarówno z zawartością tego pierwiastka w glebie ale także z samym procesem produkcji wina oraz jakością materiałów użytych podczas produkcji czy nawet z zanieczyszczeniem powietrza [7]. Badania specjacji tego pierwiastka w winach wykazały obecność kompleksów ołowiu z polisacharydami oraz polifenolami [36,37]. Tego typu kompleksy ołowiu uważane są za słabo przyswajalne przez organizm ludzki.

Zanieczyszczenie środowiska ołowiem systematycznie maleje w związku z zaprzestaniem stosowania związków ołowioorganicznych w paliwach. Mimo to badanie specjacji tego pierwiastka zarówno w próbkach środowiskowych jak i w próbkach żywności powinno nadal być traktowane priorytetowo ze względu na silnie toksyczne działanie tego pierwiastka oraz ze względu na wymienione na początku tego rozdziału liczne źródła bezpośredniego narażenia na zatrucie ołowiem.

#### **1.1.5 Kadm**

Kadm jest pierwiastkiem o bardzo silnej toksyczności, przyjęcie nawet małych dawek tego pierwiastka może skutkować poważnymi skutkami zdrowotnymi. Fakt ten przekłada się na silnie zainteresowanie specjacją tego pierwiastka w środowisku oraz żywności.

Głównym źródłem emisji kadmu są przemysłowe zastosowania tego pierwiastka takie jak: produkcja baterii niklowo-kadmowych, produkcja barwników i stopów oraz spalanie paliw kopalnych. Kadm jest także stosowany jako materiał chroniący przed korozją między innymi w samolotach. Dodatkowe zagrożenie związane z kadmem jest spowodowane tym, że pierwiastek ten działa toksycznie zarówno po przyjęciu za pośrednictwem układu pokarmowego ale także oddechowego a ponadto może akumulować się w płucach. Źródłem tego pierwiastka w żywności i wodzie mogą być instalacje wodociągowe i urządzenia grzewcze niskiej jakości bądź ceramika, w której przechowywane są produkty żywnościowe o niskim pH. Podobnie jak w przypadku pozostałych opisywanych pierwiastków głównymi naturalnymi źródłami kadmu są erupcje wulkaniczne oraz wietrzenie skał [7,38]. Zawartość kadmu w niezanieczyszczonej glebie waha się między 0,1 a 1 mg kg<sup>-1</sup>, pierwiastek ten jest w glebie głównie związany z ligandami nieorganicznymi: Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, F<sup>-</sup> oraz organicznymi: aminokwasy, cytryniany, szczawiany, salicylany i kwasy humusowe oraz fulwowe [28,39]. Zawartość kadmu w wodzie morskiej szacuje się na 0,05 µg kg<sup>-1</sup> w wodzie powierzchniowej [8]. Specjacja kadmu w wodzie słodkiej silnie zależy od warunków środowiskowych oraz źródła zanieczyszczenia, w przypadku obecności ligandów organicznych kadm występuje głównie w formie związanej z tymi ligandami. W przypadku kadmu pochodzącego ze źródeł antropogenicznych dominującą formą tego pierwiastka w wodzie jest jon kadmu na drugim stopniu utlenienia (Cd<sup>2+</sup>). W wodzie morskiej udało się zidentyfikować dwie dominujące formy specjacyjne kadmu: Cd<sup>2+</sup> oraz jon monometylo-Cd<sup>+</sup>. Udowodniono ponadto, że wraz ze wzrostem głębokości wzrasta stężenie metylowanej formy kadmu [7].

Przyjmuje się, że za toksyczne działanie kadmu odpowiada przede wszystkim jon  $Cd^{2+}$  do którego kadm jest przekształcany po wprowadzeniu do organizmu związków tego pierwiastka. Forma specyjacyjna w jakiej kadm występuje w pożywieniu bądź środowisku może wpływać na poziom wchłaniania tego pierwiastka bądź jego drogę migracji w organizmie. Do tej pory nie wykazano wprost zależności między stopniem toksyczności a formą specyjacyjną kadmu wprowadzaną do organizmu. Udało się jednak zidentyfikować mechanizm obrony organizmów żywych na toksyczne działanie kadmu, podobnie jak w przypadku ołowiu, mechanizm ten opiera się na wiązaniu kadmu przez metalotioneiny i fitochelatyny [7,40].

Badanie specjacji kadmu w próbkach żywności wykazało obecność tego pierwiastka w formie związanej z metalotioneinami oraz proteinami w żywności pochodzenia zwierzęcego, zarówno dla zwierząt wodnych jak i lądowych [7]. W przypadku organizmów morskich potwierdzony został fakt akumulacji tego pierwiastka w tkankach ryb i owoców morza. Poziom zawartości kadmu i zdolność jego akumulacji w organizmach morskich silnie zależy od konkretnego gatunku ale także od czynników środowiskowych i geograficznych [39]. U ssaków kadm odkłada się przede wszystkim w wątrobie i nerkach, co skutkuje podwyższonym ryzykiem zatrucia tym pierwiastkiem w przypadku konsumpcji podrobów [7]. Funkcja biologiczna kadmu w roślinach nie została do tej pory zidentyfikowana, potwierdzono jednak fakt, że pierwiastek ten jest pobierany z gleby i wody, może być akumulowany w korzeniu oraz transportowany do pozostałych części roślin. Podobnie jak w przypadku organizmów zwierzęcych kadm w roślinach jest wiązany przez organiczne ligandy, są to między innymi fitochelatyny, białka i aminokwasy. W literaturze można ponadto znaleźć szereg publikacji opisujących analizę specyjacyjną kadmu związanego z niezidentyfikowanymi ligandami organicznymi o szerokim zakresie mas od kilku do kilkuset tysięcy Daltonów. Dokładny mechanizm wiązania kadmu zależy od konkretnego gatunku rośliny. Kadm może być także wchłaniany za pośrednictwem liści. Wszystkie wymienione mechanizmy wchłaniania i translokacji kadmu w roślinach mogą prowadzić do akumulacji tego pierwiastka w częściach jadalnych [7,28,39].

Ze względu na bardzo wysoką toksyczność kadmu, oraz wysokie narażenie na przewlekłe zatrucie tym pierwiastkiem wśród pracowników gałęzi przemysłu wymienionych na początku tego rozdziału, ale także osoby palące papierosy, istotną wydaje się potrzeba badania zawartości tego pierwiastka w żywności. Ze względu na różnice w przyswajaniu dla różnych form specyjacyjnych kadmu badanie specjacji tego pierwiastka może dostarczyć istotnych informacji w kwestii bezpieczeństwa żywności.

### **1.1.6 Nikiel**

Nikiel jest pierwiastkiem niezbędnym dla niektórych roślin oraz zwierząt, przyjmuje się także, że jest on niezbędnym mikroelementem dla człowieka nie mniej dokładna rola tego pierwiastka w biochemii organizmów ludzkich nie została do tej pory zdefiniowana. Podstawowym źródłem emisji niklu do środowiska naturalnego jest przemysł metalurgiczny, metal ten jest składnikiem stopów, jest także stosowany do pokrywania powierzchni innych metali. Nikiel znajduje zastosowanie w produkcji ogniw paliwowych, barwników, baterii niklowo-kadmowych i katalizatorów. Nikiel jest także emitowany do środowiska przez przemysł kopalniany oraz spalanie paliw kopalnych. Istotnym z perspektywy toksyczności niklu zastosowaniem tego pierwiastka jest jego obecność w stopach wykorzystywanych w produkcji biżuterii, elementów ubrań i bilonu. Naturalny poziom niklu w glebie szacuje się między 5 a 500  $mg\ kg^{-1}$ , pierwiastek ten w skorupie ziemskiej występuje głównie w postaci minerałów siarczkowych, tlenkowych i krzemianowych. W wodzie słodkiej zawartość niklu waha się między 5 a 50  $\mu g\ L^{-1}$ . Najbardziej

rozpowszechnioną formą niklu w środowisku wodnym jest kation  $\text{Ni}^{2+}$  związany najczęściej z prostymi nieorganicznymi anionami ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  i  $\text{NO}_3^-$ ) spośród których z punktu widzenia bioprzyswajalności najważniejszy jest anion  $\text{OH}^-$ . Nikiel w środowisku wodnym może być także kompleksowany przez rozpuszczone substancje organiczne, identyfikacja dokładnej struktury tych kompleksów nie zawsze jest możliwa. We frakcji organicznej zawierającej nikiel wykryto związki podobne do kompleksów tego pierwiastka z kwasem fulwowym i nitrooctowym. Kwestie specjacji niklu w środowisku wodnym są istotne ze względu na zasadnicze różnice w toksyczności, biodostępności oraz mobilności różnych form chemicznych tego pierwiastka. Kation  $\text{Ni}^{2+}$  jest uznawany za najlepiej przyswajaną formę niklu. Nikiel może być przyswajany przez ludzi za pośrednictwem układu pokarmowego, oddechowego ale także przez skórę. W zależności od formy specjacyjnej pierwiastek ten może być wydalany z organizmu lub jest kumulowany w płucach, tarczycy i nadnerczach. W kontakcie ze skórą nikiel może wywoływać reakcje alergiczne [7].

W organizmach żywych nikiel może być kompleksowany przez szereg ligandów organicznych takich jak kwasy karboksylowe, aminokwasy, peptydy, białka, trójfosforan adenozyliny i kwas deoksyrybonukleinowy (DNA, ang. deoxyribonucleic acid). Nikiel, jako niezbędny mikroelement dla roślin, może być łatwo wchłaniany z gleby, co w konsekwencji prowadzi do akumulacji tego pierwiastka w tkankach roślin. Podobnie jak w przypadku kadmu, nikiel w roślinach może być kompleksowany przez szereg ligandów o różnych masach cząsteczkowych, w przypadku niklu są to jednak zdecydowanie mniejsze kompleksy organiczne. Ze względu na akumulację niklu w roślinach problem zanieczyszczenia tym pierwiastkiem może pojawiać się w przypadku żywności pochodzenia roślinnego. Produkty z owoców kakaowca oraz orzechy mogą zawierać znaczne ilości niklu (nawet do około  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Ponieważ nikiel jest elementem stopów, w tym stali nierdzewnej, pierwiastek ten może być uwalniany do żywności podczas jej przetwarzania, zarówno przemysłowego jak i domowego, na przykład z niskiej jakości garnków. Również stalowe opakowania, takie jak puszki, mogą uwalniać nikiel do przechowywanej żywności.

W obecnie dostępnej literaturze nie ma wielu danych na temat specjacji niklu w produktach żywnościowych. Doniesienia literaturowe skupiają się przede wszystkim na specjacji niklu w herbacie, kakao i soi. W obu przypadkach zidentyfikowano zarówno nikiel w postaci  $\text{Ni}^{2+}$  jak i związany z ligandami organicznymi takimi jak kwas chinowy, kwas cytrynowy i kwas glukonowy [7,41,42]. Lavradas i inni odkryli, że nikiel obecny w małżach gatunku *Perna perna* został wyekstrahowany wraz z termo-stabilną frakcją metaloprotein [43].

### 1.1.7 Rtęć

Rtęć uznawana jest za jeden z ważniejszych pierwiastków chemicznych w odniesieniu do zanieczyszczenia środowiska naturalnego, ponadto jest ona silnie akumulowana w łańcuchu pokarmowym człowieka. Toksyczność rtęci jest silnie zależna od formy w jakiej jest ona przyswajana, przy czym warto podkreślić, że za najbardziej toksyczne uznaje się formy metylowane rtęci a nie rtęć metaliczną czy jej nieorganiczne związki. Mimo zdecydowanie mniejszej toksyczności, nieorganiczne formy rtęci nadal uważane są za silne trucizny. Różnice w toksyczności między różnymi formami rtęci wynikają głównie z ich rozpuszczalności w wodzie a co za tym idzie stopniem przyswajania przez organizm ludzki. Obecnie największe narażenie na rtęć jest związane z przyjmowaniem tego pierwiastka wraz z pokarmem, w którym zdecydowana większość rtęci występuje w formie o dużej toksyczności – metylortęci [7].

Mimo aktywnego działania na rzecz zmniejszenia emisji rtęci do środowiska pierwiastek ten nadal znajduje zastosowanie w produkcji farb i papieru, jako środek bakterio- i grzybobójczy jest także uwalniana podczas spalania paliw kopalnych w elektrowniach. Do naturalnych źródeł emisji rtęci można zaliczyć przede wszystkim erupcje wulkaniczne, pierwiastek ten był także wykrywany w gazach i wodach geotermalnych [7]. Zawartość rtęci w wodzie morskiej i słodkiej szacuje się na poziomie 0,05 oraz 0,07  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . W wodzie słodkiej rtęć może być przekształcana do formy metylowanej w zakresie od kilku do kilkudziesięciu procent zawartości rtęci całkowitej. W wodzie morskiej z kolei rtęć występuje przede wszystkim w postaci kationu  $\text{Hg}^{2+}$  kompleksowanego przez jony chlorkowe [7,8]. Średnią zawartość rtęci w glebie szacuje się na 0,3  $\text{mg kg}^{-1}$ . Rtęć w glebie jest najczęściej związana z materią humusową w warstwie próchnicznej gleby. Proces metylowania rtęci znajdującej się w glebie skutkuje zwiększeniem mobilności i w konsekwencji uwalnianiem rtęci z gleby [7].

Rtęć może być akumulowana przez organizmy wodne zarówno żyjące w wodzie słodkiej jak i słonej. Pierwiastek ten akumuluje się przede wszystkim w tkance mięśniowej w formie metylowanej, zdecydowanie mniejsze ilości rtęci oznaczano w wątrobie czy nerkach. W konsekwencji rtęć nie jest łatwo wydalana i może akumulować się wraz z przebiegiem łańcucha pokarmowego. W literaturze można także znaleźć publikacje wykazujące możliwość wiązania metylortęci przez białka w organizmach ryb [44]. Zaobserwowano także podwyższone stężenia rtęci w niektórych gatunkach drapieżnych ryb i ptaków żywiących się różnymi organizmami morskimi [7]. Rośliny mogą pobierać rtęć z gleby zarówno w formie  $\text{Hg}^{2+}$  jak i w formie metylowanej. Transport rtęci z korzenia do nadziemnych części roślin jest zależy od gatunku, nie mniej, przyjmuje się, że większość rtęci jest akumulowana w korzeniu. Wynika to przede wszystkim z faktu, że rtęć wykazuje działanie toksyczne także w przypadku roślin. Mechanizmy obronne roślin przed toksycznym działaniem rtęci opierają się na wiązaniu tego pierwiastka za pomocą glutationu, fitochelatyn oraz prostszych związków organicznych, np.: kwas askorbinowy czy salicylowy [45].

Za najważniejsze źródło narażenia na zatrucie rtęcią uznaje się przyjmowanie tego pierwiastka wraz z pożywieniem. Głównym źródłem narażenia na rtęć w diecie są ryby i owoce morza a kolejno pokarm pochodzenia roślinnego [7,45]. Rtęć jest pierwiastkiem, którego specjacja jest badana od wielu lat, nie mniej nadal istnieje potrzeba prowadzenia analizy specjacyjnej rtęci, szczególnie w żywności.

### 1.1.8 Cyna

Zawartość cyny w skorupie ziemskiej szacuje się na 2,2  $\text{mg kg}^{-1}$ , pierwiastek ten był znany i stosowany już w epoce brązu. Ze względu na właściwości zbliżone do węgla, cyna może tworzyć stabilne wiązania z tym pierwiastkiem, w konsekwencji czego wyróżnić można dużą liczbę związków cynoorganicznych. Najbardziej istotny z perspektywy toksykologii jest fakt, że cyna metaliczna i jej nieorganiczne związki nie wykazują działania szkodliwego dla ludzi, w przeciwieństwie do związków cynoorganicznych. Zawartość cyny w glebach szacuje się na zakres od 0,3 do 200  $\text{mg kg}^{-1}$ , w wodzie morskiej i słodkiej stężenia cyny są bardzo niskie, na poziomie 0,01 i 0,06  $\mu\text{g kg}^{-1}$  [6,8]. Cyna metaliczna jest stosowana głównie w przemyśle metalurgicznym, jako element stopów metali lub do pokrywania powierzchni stali. Cyna znajduje także zastosowanie w elektronice oraz produkcji baterii. Dużo więcej zastosowań znajdują związki cynoorganiczne, można wyróżnić wśród nich: stabilizatory PCV, katalizatory w produkcji tworzyw sztucznych, środki grzybobójcze, antypasożytnicze, insektycydy, pestycydy i inne. Z perspektywy bezpieczeństwa produktów żywnościowych i wody istotne jest zastosowanie

związków cyny jako stabilizatorów w materiałach przeznaczonych do kontaktu z żywnością i wodą przeznaczoną do spożycia przez ludzi takich jak opakowania czy instalacje wodociągowe z poli(chlorku winylu) (PCV, ang. Polyvinyl chloride). Związki cynoorganiczne znajdują także zastosowanie w powłokach antyporostowych którymi pokrywane są kadłuby statków. Wszystkie wymienione powyżej zastosowania mogą prowadzić do uwalniania licznych ilości toksycznych związków cynoorganicznych do środowiska naturalnego [7,8].

Obecne w środowisku związki cynoorganiczne mogą rozkładać się do cyny nieorganicznej pod wpływem czynników naturalnych takich jak promieniowanie UV lub poprzez działanie bakterii i mikroalg. Degradacja związków cynoorganicznych jest jednak tylko jednym z możliwych scenariuszy, związki te mogą także ulegać bioakumulacji w organizmach żywych. W środowisku wodnym związki te akumulują się głównie w organizmach mięczaków i skorupiaków oraz żywiących się nimi ptaków. Ponadto związki cynoorganiczne mogą akumulować się w organizmach ssaków morskich. Nie stwierdzono akumulacji dużych ilości związków cynoorganicznych w rybach. Alternatywnym mechanizmem prowadzącym do powstawania związków cynoorganicznych w środowisku naturalnym jest biometylowanie cyny nieorganicznej. Za procesy te odpowiedzialne są przede wszystkim bakterie oraz algi [7].

Transport związków cynoorganicznych w ramach łańcucha pokarmowego nie został do tej pory dostatecznie zbadany. Co za tym idzie nie ma obecnie wystarczającej liczby dostępnych danych pozwalających wnioskować w kwestii narażenia na zatrucie związkami cynoorganicznymi ze spożywanego jedzenia. Kwestia ta wydaje się jednak niezwykle istotna w świetle faktu narażenia na związki cynoorganiczne wynikającego z ich szerokich zastosowań.

## **1.2 Pierwiastki niezbędne**

### **1.2.1 Selen**

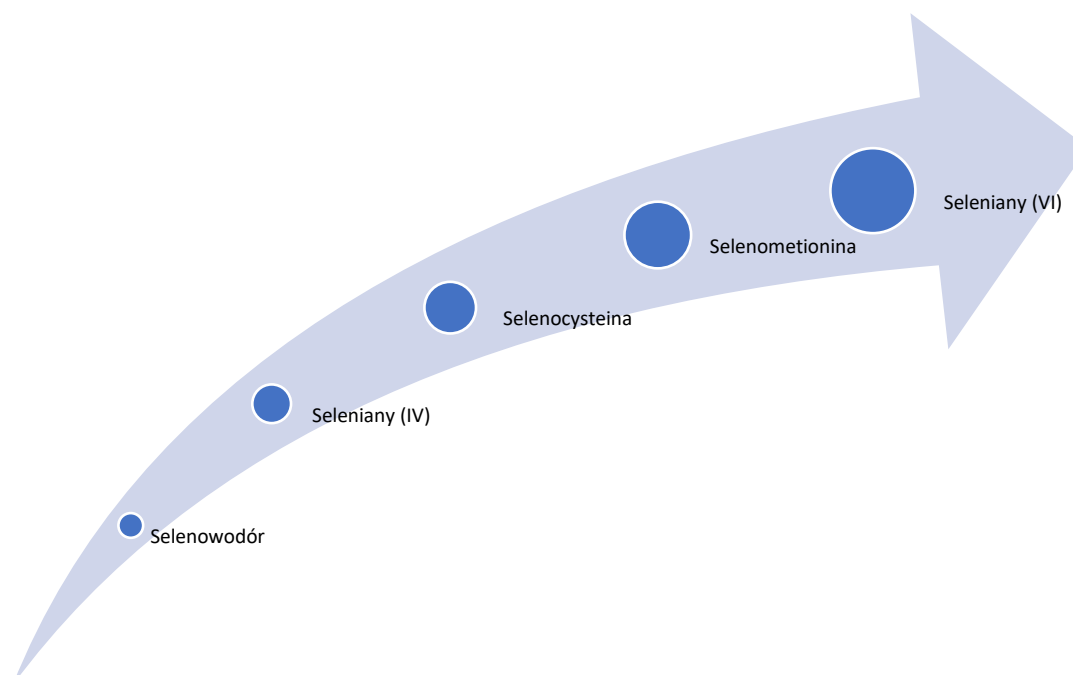
Selen jest niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania organizmu mikroelementem, który jednak może także wykazywać działanie toksyczne jeśli dostarczany jest do organizmu w nadmiarze. Istotnym jest fakt, że różnica w dawce niezbędnej oraz toksycznej dla selenu jest relatywnie mała, przyjmuje się, że zalecane dzienne spożycie selenu to 55  $\mu\text{g}$  z kolei górny, tolerowany poziom spożycia ustalony został na 400  $\mu\text{g}$  [46]. Za bardziej toksyczne uznaje się formy nieorganiczne selenu, ze względu na ich reaktywność ze związkami organicznymi siarki, co w konsekwencji prowadzi do powstania rodników tlenowych [47]. Ze względu na tak niewielkie różnice w dawkach zalecanej oraz maksymalnej selenu oraz fakt, że pierwiastek ten może występować w wielu formach specjacyjnych o różnym działaniu oraz stopniu przyswajania przez organizm ludzki analiza specjacyjna w odniesieniu do selenu jest niezwykle istotna.

Selen występuje w glebie w zawartościach między 0,1 a 2  $\text{mg kg}^{-1}$ , podwyższone zawartości selenu obserwuje się w glebach na terenach w pobliżu wulkanów. Selen w glebie może występować zarówno w formach organicznych, nieorganicznych i w formie metalicznej. Nieorganiczny selen występuje w glebie przede wszystkim jako seleniany (IV), seleniany (VI) i selenki (Se(II)). W przypadku związków selenoorganicznych w glebie zidentyfikowano jony trimetyloselenowe, selenki metylu i selenoaminokwasy [7,47,48]. W środowisku wodnym selen dominuje w formach nieorganicznych  $\text{SeO}_4^{2-}$ ,  $\text{SeO}_3^{2-}$  oraz  $\text{Se}^{2-}$  [47,49,50]. W literaturze można także znaleźć nieliczne doniesienia potwierdzające obecność metylowanych form selenu w wodach słodkich, słonych oraz gruntowych [49,51,52]. Wybrane formy specjacyjne selenu zebrano w tabeli 3 [7]

Tabela 3. Wybrane formy specjacyjne selenu [7].

Forma specjacyjna	Wzór chemiczny
Selenowodór	$\text{SeH}_2$
Seleniany (IV)	$\text{SeO}_3^{2-}$
Seleniany (VI)	$\text{SeO}_4^{2-}$
Selenocyjaniany	$\text{SeCN}^-$
Kwas metylseleninowy	$(\text{CH}_3)\text{Se}(\text{O})\text{OH}$
Kwas metyloselenowy	$(\text{CH}_3)\text{SeOH}$
Dimetyloselenian	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}$
Dimetylodiselenian	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$
Metyloselenol	$(\text{CH}_3)\text{SeH}$
Kation trimetylselenoniowy	$(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$
Selenocysteina	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}(\text{COO}^-)-\text{CH}_2-\text{SeH}$
Selenocystyna	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}(\text{COO}^-)-\text{CH}_2-\text{Se}-\text{Se}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COO}^-)-\text{NH}_3^+$
Selenometionina	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}(\text{COO}^-)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Se}-\text{CH}_3$

Żywność jest głównym źródłem selenu dostarczanego do organizmu ludzkiego (odpowiada nawet za około 80% przyswajanego selenu) [47]. Najlepiej przyswajalne przez organizm ludzki są organiczne formy selenu, w związku z tym badanie specjacji tego pierwiastka w różnego rodzaju produktach żywnościowych jest niezwykle istotne [48]. Zdolność roślin do pobierania i akumulowania selenu w tkankach silnie zależy zarówno od formy w jakiej pierwiastek ten jest obecny w glebie i wodzie ale także od gatunku rośliny. Zdolność do akumulowania wysokich zawartości selenu, nawet do kilku tysięcy mg na kg suchej masy, potwierdzono w przypadku rodzin: Astrowatych (*Asteraceae Dum., Compositae Gis.*), Bobowatych (*Fabaceae Lindl., Papilionaceae Giseke*), Kapustowatych (*Brassicaceae Burnett, Cruciferae Juss.*) i Amarylkowatych (*Amaryllidaceae J. St.-Hil.*). Rośliny te nazywa się hiperakumulatorami selenu [7]. Biodostępność selenu w glebie dla roślin przedstawiono na rysunku 2 [48].



Rysunek 2. Schemat biodostępności wybranych form specjacyjnych selenu w glebie dla roślin (biodostępność rośnie od lewej do prawej) [48].



Badania specjacji selenu w roślinach potwierdzają obecność zarówno form specjacyjnych tego pierwiastka, które rośliny pobierają z gleby lub wody ale także wtórnych metabolitów selenu. W przypadku metabolitów wtórnych selen występuje przede wszystkim w połączeniu z aminokwasami, cysteiną oraz metioniną [7,49,50]. Ze względu na zdolność do hiperakumulacji, oraz metabolizm nieorganicznego selenu do form organicznych rośliny z wymienionych powyżej rodzin mogą stanowić doskonałe źródło selenu w diecie. Zwierzęta mogą pobierać selen zarówno z wody jak i ze zjadanych roślin. Możliwa jest także suplementacja selenem zwierząt hodowlanych [47]. W tkankach zwierząt lądowych dominującą formą selenu jest selenocysteina. Również w przypadku specjacji selenu w rybach potwierdzono obecność tego pierwiastka w połączeniu z aminokwasami. Przyjmuje się, że zawartość selenu w żywności zwiększa się wraz ze wzrostem zawartości białka [47,53].

Poprzez badanie specjacji oraz metabolizmu selenu w roślinach oraz zwierzętach możliwa jest precyzyjna suplementacja tego pierwiastka, co jest szczególnie istotne w kontekście niewielkich różnic w dawkach zalecanej oraz maksymalnej selenu w diecie. W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania nad uprawą roślin wzbogaconych selenem. Szczególne znaczenie w tym kontekście mają dwie rośliny: czosnek (*Allium Sativum*) i brokuły (*Brassica oleracea botrytis*). W przypadku obydwu roślin istotna jest wysoka zawartość aminokwasów zawierających siarkę, które jak wspomniano wcześniej mogą wiązać selen w formy lepiej przyswajalne [7]. Alternatywnym podejściem mogą być suplementy diety produkowane na bazie wzbogaconych selenem drożdży, w których dominującą formą selenu jest selenometionina [50].

Różnice w działaniu różnych form specjacyjnych selenu, ich różna bioprzyswajalność oraz niewielkie różnice w dawce zalecanej oraz maksymalnej selenu w diecie stanowią o istotności badania specjacji tego pierwiastka w produktach żywnościowych.

### 1.2.2 Cynk

Cynk występuje naturalnie w szerokiej gamie próbek środowiskowych oraz biologicznych. Stężenia cynku w wodzie, powietrzu oraz glebie są silnie zależne od warunków geologicznych. W wodzie słodkiej oraz słonej stężenia cynku mieszczą się odpowiednio w zakresach od  $<0,1$  do  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  oraz od  $<0,002$  do  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ . W glebie zawartość cynku szacuje się na zakres od 10 do  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  suchej masy. Głównym naturalnym źródłem cynku jest erozja skał, erupcje wulkaniczne oraz pożary lasów. Cynk metaliczny znajduje zastosowanie w przemyśle metalurgicznym jako składnik stopów oraz jako powłoka ochronna dla innych metali. Pierwiastek ten stosowany jest także w produkcji barwników oraz w przemyśle budowlanym. Nieorganiczne związki cynku są stosowane przede wszystkim w produkcji wyposażenia samochodów i baterii ale znajdują także zastosowanie w medycynie i stomatologii. Organiczne związki cynku są stosowane jako środki grzybobójcze oraz smary. Wartości emisji naturalnej oraz antropogenicznej cynku są porównywalne [7,54].

Cynk jest obecny we wszystkich rodzajach tkanek różnych organizmów żywych. Pierwiastek ten jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania roślin, zwierząt oraz ludzi. Cynk jest składnikiem ponad 200 enzymów. Zawartość cynku w produktach żywnościowych waha się zarówno ze względu na rodzaj produktów żywnościowych ale także ze względu na ich pochodzenie [54]. Dzielne dietetyczne spożycie cynku u osób dorosłych szacuje się w zakresie od 9 do 18 mg. Zalecane dziennie spożycie cynku przez osoby dorosłe wynosi 8 mg na dzień dla kobiet oraz 11 mg na dzień dla mężczyzn. Górny, tolerowany poziom spożycia cynku przez osoby dorosłe ustalony został na poziomie 40 mg na dzień [55]. Zarówno niedobór jak i nadmierne

spożycie cynku może prowadzić do negatywnych efektów zdrowotnych u ludzi. Zawartości cynku w wybranych produktach żywnościowych zebrano w tabeli 4 [54].

Tabela 4. Zawartość cynku w wybranych produktach żywnościowych [54].

Rodzaj żywności	Zawartość cynku w części jadalnej [mg kg <sup>-1</sup> ]
<b>Mięso</b>	
Wołowina	31,7 (25,9 – 42,1)
Baranina	31
Wieprzowina	19 (14 – 62)
Wątroba	44 (jagnięcina), 84 (cielęcina)
Nerki	3,7 (wieprzowina) – 28 (jagnięcina)
<b>Drób</b>	
Kurczak	8,5; 32 (wątroba)
Jaja kurze	8 – 20
Indyk	17 – 23
<b>Ryby i owoce morza</b>	
Ryby morskie	5 (plamiak) – 14 (anchois)
Ryby słodkowodne	4,8 (pstrąg) – 12 (węgorz)
Ostrygi	65 – 1600
Krewetki	23,1
<b>Nabiał</b>	
Masło	2,3
Mleko krowie	3,8
Mleko w proszku	21
Ser	11 – 106
<b>Owoce</b>	
Jabłko	0,4 – 2,2
Banan	2,2
Figa	2,5
Owoce pestkowe	0,2 (brzoskwinia) – 1,5 (wiśnia)
Jagody	0,8 (winogrono) – 2,5 (porzeczka)
Owoce tropikalne	0,8 (mandarynka) – 9 (gujawa)
Orzechy	5 (kokos) – 48 (orzechy nerkowca)
<b>Warzywa</b>	
Warzywa/owoce	10 – 30
Liście, łodygi, kwiaty	13 (rabarbar) – 140 (cebula)
Korzenie i bulwy	2,7 (ziemniak) – 170 (taro)
Rośliny strączkowe i nasiona oleiste	124 (groch włoski) – 550 (fasola mungo)
Marchew	1,8 – 2,1
Pomidor	0 – 2,5
Salata, kapusta	1,6 – 15
Grzyby	2,8 – 5
<b>Produkty zbożowe</b>	
Ziarna	13 (żyto) – 45 (owies)
Mąka	7,7 (żyto) – 34 (pszenica pełnoziarnista)
Kiełki	120 (pszenica) – 208 (żyto)
Chleb żytni	5,9 – 12
Chleb pszenny	2 – 8
Płatki kukurydziane	3
Płatki owsiane	35 – 69
Drożdże piwowskie	80
Makaron	10 -22

W środowisku wodnym zdecydowana większość cynku jest związana przez ligandy organiczne takie jak kwas cytrynowy, kwas humusowy, glicyna i cysteina. Poza organicznymi formami cynku

pierwiastek ten w wodzie występuje także w związkach nieorganicznych na drugim stopniu utleniania. Równowaga form specjacyjnych cynku w środowisku wodnym zależy przede wszystkim od pH. Cynk jest składnikiem licznych minerałów, i co za tym idzie występuje w glebie w różnorodnych frakcjach. Można wyróżnić cynk rozpuszczony w wodzie, związany z cząsteczkami gleby, związany z frakcją organiczną oraz związany z minerałami. Formy nieorganiczne cynku w glebie to przede wszystkim chlorki, fosforany, azotany oraz siarczany. W odniesieniu do organicznych form cynku możemy wyróżnić kwasy huminowe i fulwowe. Podobnie jak w przypadku cynku w środowisku wodnym, formy organiczne są dominujące także w glebie. Równowaga form specjacyjnych cynku w glebie zależy od pH i potencjału redox gleby [7,54].

Rośliny mogą pobierać cynk zarówno z gleby jak i wody. Biodostępność cynku dla roślin zależy od formy specjacyjnej tego pierwiastka ale także od warunków środowiskowych takich jak pH gleby, zawartość materii organicznej i nieorganicznej oraz wilgotność. Rośliny pobierają cynk z gleby głównie w formie jonu  $Zn^{2+}$ , który może być metabolizowany do form organicznych tego pierwiastka. W częściach jadalnych różnych gatunków roślin cynk został oznaczony w kompleksach organicznych o masach w zakresach od  $<5000$  Da do  $>30000$  Da. Spośród licznych ligandów mogących wiązać cynk zidentyfikowano: białka, peptydy i aminokwasy, karotenoidy, alkohole, związki fenolowe, flawonole, glikozydy i stilbenoidy [7,56,57]. Organizmy wodne pobierają cynk głównie z wody, dużo mniejsze znaczenie ma cynk dostarczany wraz z pożywieniem. Biodostępność cynku dla organizmów wodnych jest zależna od formy specjacyjnej tego pierwiastka. W owocach morza zidentyfikowano cynk związany z proteinami oraz metalotioneinami. Pierwiastek ten nie ulega znacznej bioakumulacji w organizmach żywych [7,43,58]. W przypadku zwierząt lądowych cynk może być pobierany z wody oraz wraz z pożywieniem. Pierwiastek ten może akumulować się w kościach, wątrobie oraz nerkach. Brak w literaturze dowodów na biometylowanie cynku w organizmach żywych [54].

Badanie specjacji cynku jest ważne w kontekście zapotrzebowania na ten pierwiastek w diecie człowieka oraz w przypadku konieczności suplementacji. Ponieważ bioprzyswajalność cynku zależy od źródła tego pierwiastka (rodzaju pożywienia) oraz jego formy w jakiej jest on wprowadzany do organizmu informacje o specjacji są szczególnie istotne.

### **1.2.3 Miedź**

Miedź jest pierwiastkiem o szerokim zakresie zastosowań oraz stale rosnącym zapotrzebowaniu ze strony przemysłu. Miedź znajduje zastosowanie przede wszystkim w produkcji elektroniki. Pierwiastek ten stosuje się także do ochrony przed korozją instalacji wodociągowych, jako składnik stopów, do produkcji maszyn przemysłowych i amunicji. Miedź i jej związki znajdują zastosowanie jako środki grzybo- i algobójcze oraz w produkcji farb i barwników. Pierwiastek ten znajduje także zastosowanie w rzeźbiarstwie. Głównymi źródłami emisji miedzi są górnictwo miedziowe oraz wymienione wcześniej zastosowania przemysłowe. Zawartość miedzi w glebie szacuje się na zakres od 2 do 100 mg  $kg^{-1}$ . Miedź występuje w glebie głównie w formie kationu  $Cu^{2+}$  zaadsorbowanego na powierzchni obecnych w glebie minerałów. W optymalnych warunkach miedź w glebie może także występować w formie siarczanów, węglanów i wodorotlenków. Pierwiastek ten może być także kompleksowany przez materię organiczną obecną w glebie, podobnie jak w przypadku cynku, miedź jest związana przede wszystkim z kwasami huminowymi i fulwowymi. Obecność organicznych form miedzi znacząco zmniejsza biodostępność tego pierwiastka w glebie. Nie mniej formy organiczne miedzi są formami dominującymi w glebach bogatych w materię organiczną. W wodach naturalnych stężenie

miedzi szacuje się na  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  w wodzie słodkiej oraz  $6 \mu\text{g L}^{-1}$  w wodzie słonej. Podobnie jak w przypadku gleby dominującą formą miedzi w środowisku wodnym jest forma jonowa  $\text{Cu}^{2+}$ . Kation ten występuje przede wszystkim w formie związków nieorganicznych takich jak węglany i wodorotlenki a także w połączeniu z aminami. Dane literaturowe potwierdzają, że w przypadku obecności w wodzie rozpuszczonej materii humusowej nawet ponad 90% miedzi będzie występować w formie związanej z materią organiczną [7,59].

Miedź jest niezbędnym mikroelementem dla roślin, pierwiastek ten ma kluczową rolę w szeregu procesów biologicznych takich jak fotosynteza czy metabolizm węglowodorów. Rośliny pobierają miedź z gleby w formie  $\text{Cu}^{2+}$ . Wraz z transportem miedzi do części nadziemnych może ona być metabolizowana do form organicznych, podobnie jak w przypadku cynku mogą to być związki takie jak białka, peptydy i aminokwasy, karotenoidy, alkohole, związki fenolowe, flawonole, glikozydy i stilbenoidy [7,56,57]. Nadmierna ekspozycja roślin na związki miedzi, na przykład poprzez stosowanie środków grzybobójczych zawierających w składzie miedź. Organizmy wodne mogą pobierać miedź rozpuszczoną w wodzie lub za pośrednictwem pożywienia. Dane literaturowe potwierdzają zdolność akumulacji miedzi przez algi oraz rośliny wodne. Bioakumulacja miedzi została także potwierdzona u szeregu przebadanych gatunków bezkręgowców oraz ryb narażonych na podwyższone stężenia miedzi w wodzie. Toksyczne działanie tego pierwiastka na organizmy wodne zostało potwierdzone w przypadku niektórych gatunków ryb i bezkręgowców [7,59].

W przypadku człowieka toksyczne działanie miedzi ogranicza się do łatwo rozpuszczalnych nieorganicznych związków miedzi na drugim i pierwszym stopniu utlenienia. Toksyczne działanie miedzi wymaga jednorazowego przyjęcia wysokiej dawki tego pierwiastka lub długotrwałego ciągłego narażenia [7,59]. Zalecane dzienne spożycie miedzi wynosi  $900 \mu\text{g}$  na dzień z kolei tolerowany poziom spożycia miedzi wynosi  $10 \text{mg}$  na dzień, obie wartości odnoszą się do osób dorosłych [55]. Podobnie jak w przypadku cynku, zawartość miedzi w produktach żywnościowych zależy od rodzaju żywności oraz jej pochodzenia. Miedź może być także uwalniana do żywności i wody podczas procesu przetwórstwa, transportu i przechowywania tych produktów. Zawartości miedzi w wybranych produktach żywnościowych zebrano w tabeli 5 [59].

Tabela 5. Zawartość miedzi w wybranych produktach żywnościowych [59].

Rodzaj żywności	Zawartość miedzi [ $\text{mg kg}^{-1}$ ] świeżej masy
<b>Mięso</b>	
Wołowina	0,8 – 1,1
Wieprzowina	0,9 – 1,4
Jagnięcina	1,6
<b>Wątroba</b>	
Wołowa	39
Wieprzowa	9,0
Jagnięca	97
<b>Nerki</b>	
Wołowe	3,7
Wieprzowe	6,1
<b>Owoce</b>	
Jabłko	0,25
Gruszka	0,81
Banan	0,95 – 0,96

<b>Warzywa</b>	
Ziemniak	0,72 – 0,96
Marchew	0,40 – 0,61
Sałata	0,47 – 0,72
Pomidor	0,36 – 0,55
<b>Ryby</b>	
Dorsz	0,19
Tuńczyk	0,64
<b>Pszenica</b>	
Mąka	1,5
Chleb	1,5
<b>Mleko</b>	
Krowie	0,06
Ludzkie	0,54
Kakao w proszku	36,4

Mimo bardzo niskiej toksyczności miedzi badanie specjacji tego pierwiastka nadal powinno być postrzegane jako ważny problem naukowy. Rosnące zapotrzebowanie na miedź w przemyśle oraz stale rosnące wykorzystanie tego pierwiastka w produkcji elektroniki może skutkować rosnącym narażeniem człowieka na miedź.

## **2. Rodzaje próbek żywności w badaniach specjacji pierwiastków chemicznych przy zastosowaniu techniki sprzężonej LC/ICP-MS oraz technik komplementarnych**

Analiza specjacyjna pierwiastków chemicznych jest obecnie jednym z podstawowych narzędzi w ocenie jakości i bezpieczeństwa żywności. Poznanie dokładnego składu pierwiastkowego produktów żywnościowych, oraz specjacji oznaczonych pierwiastków pozwala na precyzyjną ocenę ryzyka związanego z obecnością toksycznych pierwiastków w diecie człowieka. Z drugiej strony badanie specjacji pierwiastków chemicznych w roślinach czy zwierzętach pozwala na poszerzenie wiedzy na temat ich bioakumulacji oraz metabolizmu. W przypadku pierwiastków niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka analiza specjacyjna żywności pozwala na lepszą kontrolę nad ilością i stopniem przyswajania tych pierwiastków w diecie. Do tej pory badanie specjacji pierwiastków chemicznych w żywności z wykorzystaniem techniki sprzężonej LC/ICP-MS skupia się przede wszystkim na żywności pochodzenia wodnego i roślinnego.

### **2.1 Żywność pochodzenia wodnego**

Organizmy wodne akumulują pierwiastki chemiczne przede wszystkim bezpośrednio ze środowiska wodnego oraz, w przypadku zwierząt, wraz z przebiegiem łańcucha pokarmowego. Organizmy wodne mogą akumulować pierwiastki takie jak: As, Se, Pb, Hg, Cd lub Ni. Spośród żywności pochodzenia wodnego możemy wyróżnić trzy główne grupy próbek poddawanych badaniu specjacji: ryby, algi oraz mięczaki. Ponadto w literaturze odnaleźć można nieliczne artykuły dotyczące tematu żywności przetworzonej (w postaci gotowych posiłków) [60,61]. Istotnym elementem badań specjacji pierwiastków chemicznych w żywności pochodzenia wodnego jest analiza olei rybnych. W świetle szeroko omawianego zdrowotnego działania takich

olei należy pamiętać o kwestii możliwej akumulacji związków arsenoorganicznych w olejach rybnych [62–64].

Arsen jest pierwiastkiem najczęściej opisywanym w literaturze dotyczącej badania specjacji pierwiastków chemicznych w próbkach żywności pochodzenia wodnego [43,58]. Do tej pory w żywności tego typu zidentyfikowano szerokie spektrum form specjacyjnych arsenu, poczynając od arsenu nieorganicznego (As(III) i As(V)) oraz prostych związków organicznych takich jak MMA i DMA oraz ich pochodne. W żywności pochodzenia wodnego zidentyfikowano jednak także złożone związki arsenoorganiczne, AsB i AsC oraz As-cukry i As-lipidy [65,66]. Specjacja arsenu w organizmach wodnych zależy jest zarówno od czynników środowiskowych takich jak chociażby specjacja tego pierwiastka w środowisku czy warunki geograficzne ale także od specyfiki organizmów wodnych. Z jednej strony w literaturze naukowej odnotowano dużą różnorodność form specjacyjnych arsenu nie tylko pomiędzy różnymi organizmami morskimi ale także w odniesieniu do różnych gatunków ryb czy alg [67–69]. Z drugiej strony Garcia-Sartal i inni przeanalizowali specjację arsenu w czterech gatunkach jadalnych alg: *Undaria pinnatifida*, *Laminaria ochroleuca*, *Porphyra umbilicalis* oraz *Ulva rigida* i potwierdzili, że specjacja arsenu jest podobna w przypadku wszystkich próbek [70]. Niektóre rodzaje żywności pochodzenia wodnego mogą być spożywane bez uprzedniego przetworzenia, które może wpływać zarówno na całkowitą zawartość pierwiastka w żywności ale także na jego specjację. Taleshi i inni przeprowadzili analizę specjacyjną arsenu w próbce tuńczyka klasy sashimi, który ze względu na wysoką zawartość tłuszczu może akumulować znaczne ilości arsenu i jest spożywany na surowo, co zapewnia niezmienną specjację arsenu przed spożyciem [71].

Pierwiastki toksyczne takie jak Hg, Cd i Ni są istotnym obiektem badań nad specjacją w próbkach żywności pochodzenia wodnego. Prace omawiające specjację tych pierwiastków są jednak mniej powszechne niż prace dotyczące arsenu [43,44,58,72].

## 2.2 Żywność pochodzenia roślinnego

Żywność pochodzenia roślinnego może być narażona na zanieczyszczenie pierwiastkami chemicznymi z różnych źródeł, takich jak gleba, woda lub powietrze. Rośliny mają tendencję do wchłaniania toksycznych pierwiastków, takich jak As, Te, Cd lub Ni, wraz z niezbędnymi mikroelementami takimi jak Se, Cu i Zn.

Selen należy do najczęściej badanych pierwiastków w żywności pochodzenia roślinnego. Z jednej strony pierwiastek ten jest niezbędnym dla człowieka mikroelementem i występuje w naturze w stosunkowo niskim stężeniu. Z drugiej strony jednak stosunkowo niewielkie przekroczenie zalecanego spożycia selenu może prowadzić do toksycznego działania tego pierwiastka. Istotnym elementem badania specjacji selenu są rośliny z rodziny amarylkowatych oraz drożdże celowo wzbogacane o selen w celach dietetycznych [73]. Selen jest także niezbędnym mikroelementem dla prawidłowego funkcjonowania roślin i jako taki występuje w nich naturalnie. Co za tym idzie, również naturalnie występujący w roślinach selen jest przedmiotem analizy specjacyjnej. Organiczne kompleksy selenu zidentyfikowano w różnych gatunkach orzechów [74–77]. Jedne z najpopularniejszych zbóż uprawnych, pszenica oraz ryż, mogą akumulować selen, głównie w postaci związanej z białkami [78,79]. Obecność selenu potwierdzono także w fasoli (*Arabidopsis thaliana*) [80]. We wszystkich tych próbkach zidentyfikowano dużą różnorodność form specjacyjnych selenu, od prostych form nieorganicznych (Se(IV) i Se(VI)) do kompleksów selenu z aminokwasami, białkami, peptydami, fitochelatynami i glutationem. Ze względu na tak dużą różnorodność wykrywanych form

specjacyjnych selenu w roślinach można wnioskować o znaczących różnicach w metabolizmie tego pierwiastka w zależności od gatunku lub warunków środowiskowych.

Nie tylko selen ale także inne niezbędne mikroelementy, takie jak cynk i miedź stanowią istotny element literatury poświęconej specjacji pierwiastków chemicznych w roślinach. W przypadku tych dwóch pierwiastków badania koncentrują się przede wszystkim na ocenie biodostępności. Dotychczasowe badania koncentrowały się na identyfikacji ligandów wiążących Zn i Cu w żywności pochodzenia roślinnego. Wyniki badań prowadzonych na próbkach jagód goji dostarczyły informację, że zarówno cynk, jak i miedź mogą być kompleksowane przez dużą liczbę ligandów organicznych takich jak białka, peptydy i aminokwasy, karotenoidy, alkohole, związki fenolowe, flawonole, glikozydy i stilbenoidy [7,56,57].

Badanie specjacji pierwiastków toksycznych w żywności pochodzenia roślinnego skupia się w literaturze naukowej na pierwiastkach takich jak As, Ni, Te i Cd. Potwierdzono, że w przypadku wszystkich tych pierwiastków poza niklem w roślinach występują mechanizmy obronne polegające na kompleksowaniu pierwiastków toksycznych za pomocą fitochelatyn, glutationu oraz peptydów [81–83].

### **2.3 Pozostałe produkty żywnościowe**

W literaturze naukowej można znaleźć stosunkowo mało prac podejmujących tematykę badania specjacji pierwiastków chemicznych w żywności pochodzenia zwierzęcego. W odniesieniu do specjacji arsenu roksarson i jego metabolity zostały zidentyfikowane w próbkach kurczaków, którym podawany był ten dodatek paszowy [14,15]. Nie ma również zbyt wielu prac poświęconych analizie specjacyjnej pierwiastków w napojach pochodzenia roślinnego lub zawierających dodatki roślinne takich jak soki czy wody smakowe i funkcjonalne. Prace te skupiały się przede wszystkim nad specjacją antymonu w sokach oraz niklu w naparach z herbaty i kakao [25,42,84,85].

## **3. Wybrane techniki analityczne w badaniu specjacji pierwiastków chemicznych w żywności**

ICP-MS jest jedną z najważniejszych technik analitycznych w analizie specjacyjnej pierwiastków chemicznych. Połączenie niskich wartości granic wykrywalności z dobrą czułością i selektywnością to podstawowe zalety techniki ICP-MS. Podstawowym zastosowaniem ICP-MS w analizie specjacyjnej jest oznaczanie całkowitej zawartości badanego pierwiastka. ICP-MS stanowi doskonały detektor do badania specjacji pierwiastków chemicznych, który w połączeniu z LC stanowi jedną z najważniejszych technik w analizie specjacyjnej. Możliwość połączenia rozdzielania chromatograficznego z detekcją za pomocą ICP-MS daje szerokie spektrum możliwości oznaczania form specjacyjnych wielu pierwiastków. Podstawowym ograniczeniem techniki sprzężonej LC/ICP-MS jest fakt, że pozwala ona na identyfikację oznaczanych form specjacyjnych tylko na podstawie porównania czasów retencji z kolumny chromatograficznej, w przypadku braku dostępnych wzorców oznaczanych substancji nie jest możliwa pełna identyfikacja tych substancji. Ze względu na ważność identyfikacji złożonych organicznych form specjacyjnych pierwiastków chemicznych w ostatnich latach metody analizy specjacyjnej dążą do równoległego stosowania techniki sprzężonej LC/ICP-MS oraz technik komplementarnych, które pozwalają na identyfikację wykrywanych substancji nawet w przypadku braku substancji wzorcowych. Najpopularniejszą obecnie techniką komplementarną do techniki sprzężonej LC/ICP-MS jest LC/ESI-MS. Technika ta pozwala na identyfikację szerokiego spektrum związków

organicznych oraz nieorganicznych za pośrednictwem wyznaczenia dokładnej masy atomowej analizowanego związku oraz obserwacji jego ścieżki fragmentacji [34,86,87].

### 3.1 LC/ICP-MS

Zastosowanie techniki sprzężonej LC/ICP-MS pozwala na prowadzenie wielopierwiastkowej analizy specjacyjnej z możliwością oznaczania kilku form specjacyjnych wielu pierwiastków w ramach jednej analizy. Uniwersalny charakter chromatografii cieczowej pozwala na stosowanie w ramach jednego układu chromatograficznego wielu różnych technik rozdzielania, w tym chromatografii wykluczania, chromatografii jonowymiennej i chromatografii w układzie faz odwróconych. W analizie specjacyjnej pierwiastków chemicznych zastosowanie znajdują zarówno niskorozdzielcze jak i wysokorozdzielcze instrumenty ICP-MS [62,80,88]. Technika sprzężona LC/ICP-MS posiada także ograniczenia, takie jak interferencje spektralne i niespektralne oraz niska tolerancja na obecność w próbce rozpuszczonych soli czy węgla organicznego. Ograniczenia te są jednak systematycznie eliminowane wraz z rozwojem aparatury [61,69,89]. Najważniejszym ograniczeniem techniki sprzężonej LC/ICP-MS jest fakt, że identyfikacja oznaczanych form specjacyjnych możliwa jest tylko poprzez porównanie czasów retencji z substancjami wzorcowymi. Przy braku dostępności substancji wzorcowych identyfikacja nie jest możliwa.

W badaniach specjacji pierwiastków chemicznych znajduje także zastosowanie metoda ablacji laserowej połączonej z ICP-MS. Dzięki zastosowaniu technik rozdzielania takich jak elektroforeza żelowa czy ogniskowanie izoelektryczne możliwe jest rozdzielanie frakcji białkowych o różnych masach cząsteczkowych. Następnie korzystając z mikro próbkowania za pomocą ablacji laserowej możliwe jest oznaczenie wybranych pierwiastków w rozdzielonych wcześniej frakcjach [78,79].

### 3.2 Techniki komplementarne

ESI-MS, podobnie jak ICP-MS, można połączyć z wieloma różnymi technikami rozdzielania chromatograficznego. Kompatybilność spektrometrów ESI-MS z technikami chromatograficznymi czyni je doskonałym uzupełnieniem ICP-MS w analizie specjacyjnej. Istotnym wyzwaniem związanym ze stosowaniem technik sprzężonych LC/ICP-MS oraz LC/ESI-MS w roli technik komplementarnych jest wybór stosowanych eluentów. W technice sprzężonej LC/ICP-MS zastosowanie znajdują przede wszystkim bufora nieorganiczne, z kolei w przypadku techniki sprzężonej LC/ESI-MS stosowane są głównie rozpuszczalniki organiczne. Różnice te znacząco utrudniają proces przygotowania próbki do analizy oraz ograniczają możliwość zastosowania tej samej techniki chromatograficznej w analizie z zastosowaniem obu metod. Obecnie dostępne są już spektrometry ICP umożliwiające stosowanie organicznych faz ruchomych co znacząco ułatwią analizę specjacyjną przy zastosowaniu technik sprzężonych LC/ICP-MS oraz LC/ESI-MS [61,69,89]. Alternatywą dla techniki LC może być zastosowanie elektroforezy kapilarnej, która także jest kompatybilna zarówno z aparaturą ICP-MS jak i ESI-MS [90]. W przypadku zastosowania nowoczesnej aparatury pomiarowej oraz urządzeń pozwalających na rozdzielanie wycieku z kolumny chromatograficznej na dwa detektory możliwa jest jednoczesna analiza próbki z wykorzystaniem techniki sprzężonych LC/ICP-MS oraz LC/ESI-MS w trybie on-line [61,69,91]. ESI-MS może także być stosowane z bezpośrednim dozowaniem próbki do źródła jonów. Konfiguracja taka znajduje zastosowania głównie w sytuacji, kiedy rozdzielanie chromatograficzne zostało przeprowadzone w trybie off-line ze zbieraniem rozdzielonych frakcji. Mimo że ESI-MS zapewnia informację o masie cząsteczkowej i



schemacie fragmentacji analizowanych substancji uzyskane informacje nie zawsze pozwalają na dokładne określenie struktury związku chemicznego. Analiza ilościowa nowo zidentyfikowanych substancji za pomocą ESI-MS, w przypadku braku dostępności wzorców tych substancji, wymaga zastosowania zastępczych wzorców kalibracyjnych, jak na przykład kalibracja oparta na DMA w analizie As-lipidów [62,80]. Technika sprzężona LC/ESI-MS jest najczęściej stosowaną wraz z LC/ICP-MS techniką komplementarną. Zastosowanie obu tych technik sprzężonych w analizie specyficjnej pierwiastków chemicznych w żywności umożliwiło identyfikację różnych organicznych ligandów, takich jak cukry, lipidy, białka, peptydy, fitochelatyny, glutation, karotenoidy, alkohole, związki fenolowe, flawonole, glikozydy i stilbenoidy.

W badaniach specyficjacji pierwiastków chemicznych w żywności zastosowanie znajdują także inne niż LC/ESI-MS techniki komplementarne, nie mniej liczba ich zastosowań jest zdecydowanie mniejsza. Metoda jonizacji/desorpcji laserowej wspomagana matrycą połączona ze spektrometrią mas (MALDI-MS, ang. matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry) znalazła zastosowanie w badaniu białek zawierających selen w orzechach (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). W badaniach tych zastosowano technikę sprzężoną LC/ICP-MS oraz równolegle techniki LC/ESI-MS i MALDI/MS. Wyniki prowadzonych analiz wykazały znaczne różnice w efektywności jonizacji wybranych peptydów, a co za tym idzie czułości pomiarów, dla dwóch metod spektrometrii cząsteczkowej. Część peptydów zdecydowanie lepiej jonizowała przy zastosowaniu techniki sprzężonej LC/ESI-MS podczas gdy pozostałe peptydy ulegały efektywniejszej jonizacji przy zastosowaniu MALDI/MS. W konsekwencji autorzy badań zwracają uwagę na możliwość zastosowania obu technik spektrometrii cząsteczkowej do analizy tych samych próbek [74,76]. Również w odniesieniu do analizy specyficjnej selenu zastosowanie znalazła technika spektrometrii mas z jonizacją chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI-MS, ang. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry). Technika ta, w połączeniu z chromatografią ciekową została zastosowana w analizie peptydów zawierających selen w próbkach żywności pochodzenia roślinnego [75]. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE, ang. sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) została zastosowana w wielopierwiastkowej analizie specyficjnej (Cu, Zn, As, Ni, Pb, Cd, i Se) tkanki mięśniowej i gruczołów trawiennych małży z gatunku *Perna* [43]. Również spektrometria rentgenowska znalazła zastosowanie w analizie specyficjnej pierwiastków chemicznych w próbkach żywności. Trzy różne techniki spektrometrii rentgenowskiej zostały zastosowane równolegle z HPLC/ICP-MS (HPLC, wysokosprawna chromatografia ciekowa, ang. High-performance liquid chromatography) w analizie specyficjnej arsenu w krewetkach (*Acetes* sp.). Przenośny spektrometr fluorescencji rentgenowskiej (XRF, ang. X-ray fluorescence) został zastosowany do oznaczania arsenu całkowitego w miejscu pobierania próbek. Następnie, również w miejscu pobierania próbek, zastosowana została mikro-spektrometria fluorescencji rentgenowskiej, oparta na promieniowaniu synchrotronowym (SR- $\mu$ XRF, ang. synchrotron radiation-induced micro X-ray fluorescence analysis), która umożliwiła przestrzenne mapowanie As w próbce. Finalnie wykonana została analiza specyficjna As(III), As(V), AsB, AsC, DMA i MMA w próbkach krewetek za pomocą techniki absorpcji rentgenowskiej, mikro- rentgenowskiej absorpcyjnej struktury przy krawędziowej ( $\mu$ XANES, ang. micro-X-ray absorption near-edge structure) [92].

W tabeli 6 przedstawiono zestawienie najważniejszych publikacji omawiających zagadnienia analizy specyficjnej pierwiastków chemicznych w próbkach żywności przy zastosowaniu techniki sprzężonej LC/ICP-MS oraz technik komplementarnych.

Tabela 6. Zestawienie publikacji naukowych omawiających tematykę analizy specjacyjnej pierwiastków chemicznych w próbkach żywności techniką sprzężoną LC/ICP-MS oraz metodami komplementarnymi.

Analizowana próbka/próbki	Analizowane pierwiastki chemiczne	Analizowane formy specjacyjne	Techniki analityczne: rozdzielanie/detekcja	Odwołanie literaturowe
<b>Żywność pochodzenia zwierzęcego</b>				
Owoce morza (Skorupiaki)	As	As(III), As(V), AsB, DMA, MMA, Hydroksy-dimetylo-As-cukier	AX/ICP-MS ESI-MS	[93]
Owoce morza ( <i>Perna perna</i> )	Cu, Zn, As, Ni, Pb, Cd, Se	Cu, Zn, As, Ni, Pb, Cd, Se termo-stabilne metaloproteiny	SEC/ICP-MS SDS-PAGE	[43]
Owoce morza ( <i>Anemonia sulcata</i> )	As	As(III), As(V), AsB, AsC, DMA, MMA, TMA, TMAO, GPAsC, DMAS	AX, CE/ICP-MS AX/ESI-MS Przenośny XRF	[94]
Owoce morza (krewetki, <i>Acetes sp.</i> )	As	As(III), As(V), AsB, AsC, DMA, MMA	SR- $\mu$ XRF $\mu$ XANES AX/ICP-MS	[92]
Ryby ( <i>Clupea harengus</i> )	As	As(III), As(V), AsB, DMA, As-lipidy	AX/ICP-MS CX/ESI-MS RP/ICP-MS	[95]
Ryby ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Cd, Cu, Zn, Pb	Cd-, Cu-, Zn- i Pb-metalotioneiny	RP/ESI-MS	[58]
Żywność pochodzenia morskiego (Ryby, skorupiaki, krewetki)	Pb	Pb(II), TML, TEL	CE/ICP-MS CE/ESI-MS	[72]
Ryby ( <i>Thunnus thynnus</i> )	Hg	MeHg <sup>+</sup> -białka	SEC, RP/ICP-MS RP/ESI-MS SDS-PAGE	[44]
Ryby ( <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> )	Se	SeMet, SeCys	RP/ICP-MS RP/ESI-MS	[96]
Gotowe posiłki z ryb, algi	As	As-lipidy	RP/(MR)ICP-MS RP/(HR)ESI-MS	[60]

Gotowe posiłki z ryb ( <i>Mallotus villosus</i> )	As	As-lipidy	RP/(MR)ICP-MS RP/(HR)ESI-MS	[61]
Olej z ryb morskich (głównie <i>Engraulis ringens</i> )	As	As-lipidy	RP/ICP-MS RP/(HR)ESI-MS	[62]
Tran z dorsza	As	DMA, MMA, DMAP, DMAB, As-lipidy	RP, CX/(HR)ICP-MS RP, CX/(HR)ESI-MS	[63]
Oleje z różnych gatunków ryb	As	As-lipidy	RP/ICP-MS RP/ESI-MS	[64]
Wątroba z dorsza	As	As-lipidy	RP/ICP-MS RP/ESI-MS	[91]
Ostrygi	As	As(V), AsB, AsC, DMA, TMA As-cukry (B, D)	AX, CX, RP, SEC/ICP-MS ESI-MS	[66]
Ryby ( <i>Sardina pilchardus</i> , <i>Scombers combrus</i> , <i>Mullus surmuletus</i> , <i>Scophthalmus rhombus</i> )	As	As-lipidy	RP/(HR)ICP-MS RP/(HR)ESI-MS	[69]
Tuńczyk klasy sashimi	As	As-lipidy	CX, RP/ICP-MS RP/(HR)ESI-MS	[71]
Mięso z kurczaka	As	As(III), As(V), AsB, DMA, MMA, roksarson, NAHAA	AX/ICP-MS AX/ESI-MS HPLC/ICP-MS	[15]
Wątroba z kurczaka	As	methyl-ROX, methyl-3-AHPAA, methyl-N-AHPAA	HPLC/ESI-MS (Typ chromatografii niesprecyzowany)	[14]
<b>Żywność pochodzenia roślinnego</b>				
Algi ( <i>Laminaria japonica</i> , <i>Porphyra crispate</i> , <i>Eucheuma denticulatum</i> )	As	As(V), AsB, DMA, TMAO, TMA, As-cukry (409, 393, 483, 329)	AX, CX/ICP-MS AX/ESI-MS	[97]

Algi ( <i>Alaria marginata</i> )	As	As(III), As(V), AsB, DMA, As-cukry (329, 483, 393)	AX/ICP-MS AX/ESI-MS	[98]
Rzodkiewnik pospolity ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	As, Se	Kompleksy As i Se z PC i -GSH, Se-peptydy	AX/(MR)ICP-MS AX/(HR)ESI-MS	[80]
Kapusta sitowata ( <i>Brassica juncea</i> )	As	As-PC <sub>4</sub>	SEC/ICP-MS SEC/ESI-MS	[88]
Kapusta sitowata ( <i>Brassica juncea</i> )	As, Cd	As(GS) <sub>3</sub> , Cd(GS) <sub>4</sub>	SEC/ICP-MS ESI-MS	[83]
Sok z cytrusów	Sb	Sb(III), Sb(V), cytrynian Sb(III) i Sb(V)	AX/ICP-MS AX/ESI-MS	[25]
Kapusta właściwa chińska ( <i>Brassica chinensis</i> )	Cd	Kompleksy Cd-PC	SEC/ICP-MS RP/ESI-MS	[81]
Groch zwyczajny ( <i>Pisum sativum</i> )	Cd, Pb	Kompleksy Cd-, Pb-PC	SEC/ICP-MS SEC, RP/ESI-MS	[32]
Napar z herbaty	Ni	Ni(II), Ni- kwas chinowy	AX/ICP-MS (HR)ESI-MS	[42]
Napar z kakao	Ni	Ni(II), Ni- glukonian, Ni-cytrynian	AX/ICP-MS (HR)ESI-MS	[41]
Czosnek ( <i>Allium sativum</i> )	Te	Te(VI), MeTeCysO, MeTeSCys	SEC/ICP-MS SEC/(HR)ESI-MS	[82]
Czosnek ( <i>Allium sativum</i> ), szalotka ( <i>Allium ascalonicum</i> )	Se	SeMet, MeSeCys, GluMeSeCys	SEC/ICP-MS SEC/ESI-MS	[73]
Czosnek, kielki rzodkiewki, kielki słonecznika	Se	SeHLan, MeSeCys, SeOMet, Diaminohydroksy-SeHLan, GluMeSeCys, N-Acetyl-CysSeMet, MeSe-pentoza-heksoza, SeMet, Se-metylo-selenoglutation, 2,3-dihydroksypropionylo- selenocysteina-cysteina-alanina, 2,3-dihydroksypropionylo- selenocysteina-cysteina, Metylotio-selenoglutation, 2,3- dihydroksypropionylo-selenolantionina, C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> Se <sup>+</sup> , C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> Se <sup>+</sup>	AX/ICP-MS PGC/ESI-MS	[99]

Zielona cebula ( <i>Allium fistulosum</i> )	Se	iSe, SeCys, SeMet, MeSeCys, GluMeSeCys	SEC, RP-IP/ICP-MS ESI-MS IEF, SDS-PAGE/LA-ICP-MS	[100]
Ryż	Se	Se-białka	RP/ICP-MS (HR)ESI-MS	[79]
Fasola zwykła ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Se	MeSeCys, GluMeSeCys	AX, RP/ICP-MS RP, RP-IP/(HR)ESI-MS	[89]
Oliwa z oliwek (extra vergine)	Se	Se-aminokwasy	ICP-MS(Se całkowity) CSP/ESI-MS	[101]
Jagody Goji ( <i>Lycium barbarum</i> )	Zn	Zn: glicyna, metionina, kwas galakturonowy, kwas kawowy, pterostylben, piceatannol, zeaksantyna, izoramnetyna Zn: zeaksantyna, kwas kawowy, resweratrol	CE/ICP-MS CE/ESI-MS	[90]
Jagody Goji ( <i>Lycium barbarum</i> )	Cu, Zn	Cu: kwercetyna 3-O-(6''-acetylo) galaktozyd, cyjanidyna 3-O-(6''-malonylo) glukozyd, daidzeina-7''-O-glukozyd, tryptofan, ornityna, resweratrol, kwas ferulowy	SEC/ICP-MS RP/ESI-MS	[57]
Algi ( <i>Ascophyllum, Laminaria and Fucus</i> )	As	As(V), AsB, AsC, DMA, MMA, DMAcA, TMA, TMAO, As-cukry	AX/ICP-MS AX, CX/ESI-MS	[65]
Algi ( <i>Laminaria digitate, Ascophyllum nodosum</i> )	As	As(V), MMA, DMA	AX/ICP-MS AX/ESI-MS	[67]
Algi ( <i>Undaria pinnatifida, Laminaria japonica, Sargassum cristaefolium, Porphyra dentata</i> )	As	As(III), As(V), AsB, AsC, DMA, MMA, TMA, As-cukry (329, 483), As-lipidy	AX/ICP-MS AX/ESI-MS	[68]
Algi ( <i>Undaria pinnatifida, Laminaria ochroleuca, Porphyra umbilicalis, Ulva rigida</i> )	As	As(III), As(V), AsB, DMA, MMA, As-cukry (329, 393, 409, 483)	EC, AX/ICP-MS AX/ESI-MS	[70]
Orzechy ( <i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.)	Se	Se-białka	SEC/ICP-MS MALDI-MS RP/ESI-MS	[74]

Orzechy ( <i>Bertholletia excelsa</i> ), miechunka peruwiańska ( <i>Physalis peruviana</i> ), euterpa jadalna ( <i>Euterpe edulis</i> )	Se	Se(IV), Se(VI), SeMet, SeCys <sub>2</sub> , SeOMet	AX/ICP-MS RP/(HR)APCI-MS	[75]
Orzechy ( <i>Bertholletia excelsa</i> )	Se	Se-peptydy	SEC/ICP-MS RP/ESI-MS MALDI-MS	[76]
Orzechy ( <i>Bertholletia excelsa</i> )	Se	SeMet, SeCys <sub>2</sub>	RP/ICP-MS RP/ESI-MS RP/ICP-MS	[77]
Pszenica	Se	Se-białka	IEF, SDS-PAGE/LA-ICP-MS RP/(HR)ESI-MS	[78]

Skróty zastosowane w tabeli 6:

#### Związki chemiczne

GPAsC	Glicerofosfoarsenocholina
TMA	Jon trimetyloarsyny
As(GS) <sub>3</sub>	Kompleksy GSH (glutation zredukowany) z As(III)
Cd(GS) <sub>4</sub>	Kompleksy GSH (glutation zredukowany) z Cd(II)
methyl-N-AHPAA	Kwas 3-acetamido-4-hydroksyfenylarsonowy
methyl-3-AHPAA	Kwas 3-amino-4-hydroksyfenylarsonowy
DMAcA	Kwas dimetyloarsynooctowy
DMAS	Kwas dimetylarsynotioinowy
DMAB	Kwas dimetyloarsenobutanowy
DMAP	Kwas dimetyloarsenopropanowy
methyl-ROX	Kwas metylo-3-nitro-4-hydroksyfenylarsonowy
NAHAA	Kwas N-acetylo-4-hydroksy-m-arsanilowy
MeHg	Metylortęć
MeSe-pentoza-heksoza	Metyloselena-Se-pentoza-heksoza
N-Acetyl-CysSeMet	N-acetylo-cysteinyloselenometionina
SeHLan	Selenohomolantionina

SeOMet	Se-tlenek selenometioniny
MeSeCys	Se-metylo-selenocysteina
TMAO	Tlenek trimetyloarsenu
TEL	Trietylołów
TML	Trimetylołów
GluMeSeCys	γ-glutamyl-Se-metylo-selenocysteina

#### Techniki rozdzielania

AX	Chromatografia anionowymienna
CX	Chromatografia kationowymienna
RP	Chromatografia w odwróconym układzie faz
SEC	Chromatografia wykluczania (żelowa)
CE	Elektroforeza kapilarna
PGC	Porowaty węgiel grafitowy
<b>Inne</b>	
CSP	Chiralna faza stacjonarna
MR	Średnia rozdzielczość
HR	Wysoka rozdzielczość

Postępy w technikach analitycznych stosowanych w analizie specjacyjnej są ogromne. Obecne trendy literaturowe wyraźnie pokazują, że zmienia się podejście metodyczne do prowadzenia analizy specjacyjnej. Zastosowanie jednej techniki do analizy badanej próbki stało się niewystarczające, coraz powszechniejsze staje się stosowanie wielu technik komplementarnych w celu uzyskania większej ilości informacji o występujących formach chemicznych pierwiastków w badanej próbce. Widoczna jest także potrzeba opracowywania nowych, zwalidowanych procedur analitycznych, które pozwolą nie tylko poszerzyć naszą wiedzę o specjacji pierwiastków chemicznych w żywności, ale także pomogą w opracowaniu nowych, bardziej szczegółowych norm prawnych. Na tym etapie trudno przewidzieć, które podejście do analizy specjacyjnej będzie dominować w przyszłości, ponieważ nie zależy to wyłącznie od potrzeb badań naukowych. Zakres prowadzenia analizy specjacyjnej w żywności będzie w dużej mierze zależał od potrzeb rutynowych badań. Koniecznym bodźcem może okazać się ustanowienie przepisów dotyczących żywności, które wymagają badania specjacji, a nie pomiarów zawartości całkowitych pierwiastków. Uregulowania takie już się pojawiają, ale ustawodawstwo postępuje bardzo powoli i zostanie wprowadzone dopiero po spełnieniu trzech warunków: 1) dowody toksycznego działania poszczególnych form specjacyjnych pierwiastków chemicznych na organizmy ludzkie, 2) dostęp do zwalidowanych procedur analitycznych pozwalających oznaczać i identyfikować poszczególne formy specjacyjne pierwiastków chemicznych, 3) możliwość rutynowego oznaczania zawartości form specjacyjnych pierwiastków chemicznych w różnych obiektach i środowisku w trakcie całej procedury analitycznej.

#### **4. Uregulowania prawne dotyczące zawartości pierwiastków chemicznych w żywności**

Najważniejszym międzynarodowym dokumentem dotyczącym jakości żywności jest Ogólny standard dla zanieczyszczeń i toksyn w żywności i paszy, który jest częścią Codex Alimentarius autorstwa Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO, ang. Food and Agriculture Organization of the United Nations) oraz Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. World Health Organization). Codex Alimentarius gromadzi uznane na całym świecie normy, wytyczne, kodeksy postępowania i różne zalecenia związane z jakością, produkcją, bezpieczeństwem i handlem żywnością. Dokument ten, w założeniu organizacji autorskich, nie ma być substytutem ani alternatywą dla ustawodawstwa krajowego, ale raczej dokumentem odniesienia stosowanym jako podstawa do opracowania norm krajowych. Istnieje wiele krajowych i międzynarodowych norm prawnych dotyczących najwyższych dopuszczalnych stężeń (NDS) zanieczyszczeń w żywności, a większość z tych przepisów znacznie różni się od wytycznych zebranych w Codex Alimentarius.

W niniejszym rozdziale rozprawy doktorskiej opisane zostaną trzy lokalne akty prawne dotyczące dopuszczalnych stężeń pierwiastków chemicznych w żywności: ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. (Unia Europejska, EU, ang. European Union), norma dotycząca najwyższych dopuszczalnych poziomów zanieczyszczeń w żywności (Chiny) i najwyższe dopuszczalne poziomy dla zanieczyszczeń chemicznych w żywności (Kanada) a także Ogólny standard dla zanieczyszczeń i toksyn w żywności i paszy (FAO/WHO). Wytyczne zawarte w wyżej wymienionych aktach prawnych różnią się istotnie pod względem liczby uwzględnionych pierwiastków chemicznych jak i różnorodności produktów żywnościowych [102–106]. Zestawienie wartości NDS pierwiastków chemicznych w wybranych produktach żywnościowych zgodnie z aktami prawnymi opisywanymi powyżej przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Zestawienie wartości NDS pierwiastków chemicznych w wybranych produktach żywnościowych.

Produkt żywnościowy (i przetwory)		Stężenie [mg kg <sup>-1</sup> ] (jako całkowita zawartość pierwiastka chemicznego, chyba, że zaznaczono inaczej)						
		As	Pb	Sn	Ni	Cr	Hg	Cd
Żywność pochodzenia zwierzęcego	Zwierzęta wodne i owoce morza (w tym wodorosty)	3,5 (D) 0,1 (C)	<b>0,3 (A)</b> 0,3 – 1,5 (B) 0,5 – 2 (C) 0,5 (D)	-	-	2 (C)	<b>1,2 – 1,7 MeHg (A)</b> 0,5 – 1 MeHg (C) 0,5 – 1 (D)	<b>2 (A)</b> 0,05 – 1 (B) 0,1 – 2 (C)
	Jadalna mączka kostna	1,0 (D)	10 (D)	-	-	-	-	-
	Mięso (w tym podroby)	0,5 (C)	<b>0,1 – 0,5 (A)</b> 0,1 – 0,5 (B) 0,2 – 0,5 (C)	<b>50 (A)</b>	-	1 (C)	0,05 (C)	0,05 – 1 (B) 0,1 – 1 (C)
	Jajka	-	0,2 – 0,5 (C)	-	-	-	0,01 (C)	0,05 (C)
	Alkohol (wyłączając wino)	-	0,2 – 0,5 (C)	-	-	-	-	-
Żywność pochodzenia roślinnego	Napoje, soki i nektary	0,1 (D)	<b>0,03 – 0,04 (A)</b> 0,2 (B) 0,03 – 0,05 (C)	150 iSn (C)	-	-	-	0,003 – 0,005 (C)
	Zboża	0,5 (C)	<b>0,2 (A)</b> 0,05 – 0,2 (B) 0,2 – 0,5 (C) 1,5 (D)	-	-	1 (C)	0,02 (C)	<b>0,1 – 0,2 (A,B,C)</b>



Żywność pochodzenia roślinnego	Kakao, czekolada, słodczyce	0,5 (C)	0,3 – 0,5 (C)	-	-	-	-	<b>0,8 – 0,9 (A)</b> 0,1 – 0,8 (B)
	Owoce	-	<b>0,2 (A)</b> 0,15 - 0,2 (B)	-	-	-	-	0,05 – 0,2 (B) 0,05 (C)
	Grzyby	0,5 (C)	<b>0,3 (A)</b> 1 (C)	-	-	-	0,1 (C)	1 (B) 0,2 – 0,5 (C)
	Miód	-	0,1 (B) 0,5 – 1 (C)	-	-	-	-	-
	Orzechy i nasiona (w tym kawa)	-	0,2 – 0,5 (C)	-	-	-	-	0,5 (C)
	Ryż	<b>0,2 – 0,35 iAs (A)</b> 0,1 – 0,3 iAs (B) 0,2 iAs (C)	-	-	-	-	-	<b>0,4 (A)</b>
	Przyprawy (w tym zioła)	<b>0,5 (A)</b> 0,5 tAs, 0,1 – 0,5 iAs (C)	<b>1 (A)</b> 1 – 3 (C)	-	-	-	0,1 (C,D)	<b>0,5 (A)</b> 0,1 – 0,5 (C)
	Herbata	-	2 – 5 (C)	-	-	-	-	-
	Warzywa	0,5 (C)	<b>0,05 – 0,4 (A)</b> 0,05 – 0,3 (B) 1 (C) 0,5 (D)	-	-	0,5 – 1 (C)	0,01 (C)	<b>0,05 – 0,2 (A,B,C)</b>
	Wino	-	<b>0,2 (A)</b> 0,15 - 0,2 (B)	-	-	-	-	-

Inne typy żywności	Tłuszcze i oleje	0,1 (A,C)	0,08 – 0,4 (A) 0,1 (B) 0,2 (C)	-	1 (C)	-	-	-
	Żywność i napoje w puszkach	-	-	150 – 250 (A) 50 iSn (B) 200 – 25 iSn (C) 250 (D)	-	-	-	-
	Preparaty dla niemowląt	-	0,01 (A) 0,05 – 1,5 (B) 0,08 (D)	50 iSn (C)	-	-	-	0,005 – 0,2 (B)
	Mleko	0,1 – 0,5 (C)	0,02 (B) 0,05 – 0,5 (C) 0,15 (D)	-	-	0,3 – 2 (C)	0,01 (C)	-
	Żywność specjalnego przeznaczenia	0,2 – 0,5 (C)	-	-	-	-	0,2 (żywność puszkowana) (C)	-
	Żywność specjalnego przeznaczenia dla niemowląt i małych dzieci	0,1 – 0,3 iAs (C)	0,01 – 0,05 (B) 0,05 – 0,5 (C)	-	-	-	-	-

Cztery pierwiastki, As, Pb, Sn i Hg zawarte są we wszystkich czterech dokumentach. Kadm nie został uwzględniony w ROZPORZĄDZENIU KOMISJI (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r., a Ni i Cr występują tylko w normie dotyczącej najwyższych dopuszczalnych poziomów zanieczyszczeń w żywności (Chiny). We wszystkich aktach prawnych, z wyjątkiem kanadyjskiego, NDS dla As podane jest w odniesieniu do arsenu nieorganicznego (EU) lub z rozróżnieniem na arsen całkowity i nieorganiczny (Chiny, FAO/WHO). Również dla cyny, w uregulowaniach prawnych Chin oraz Unii Europejskiej, NDS podane jest z podziałem na cynę całkowitą i nieorganiczną. W przypadku rtęci chińska norma prawna, oraz Ogólny standard dla zanieczyszczeń i toksyn w żywności i paszy (FAO/WHO) podają NDS w odniesieniu do metylortęci [102–106].

Porównując wszystkie omawiane akty prawne można zauważyć duże różnice w odniesieniu do liczby produktów żywnościowych dla których podano NDS dla pierwiastków chemicznych. NDS dla arsenu w dokumencie KE podano tylko dla ryżu, podczas gdy w innych aktach prawnych istnieje większa liczba produktów żywnościowych dla których oszacowano NDS arsenu. Warto również zaznaczyć, że niektóre rodzaje żywności, takie jak mięso, warzywa czy owoce morza, zostały podzielone na mniejsze podgrupy w oparciu o grupę systematyczną czy nawet gatunek. Uwzględniono także żywność surową lub przetworzoną czy też podział na określone jadalne części ciała, takie jak podroby czy mięso mięśniowe. Do każdej z wyszczególnionych podgrup może być przypisana inna wartość NDS danego pierwiastka ze względu na różne tendencje dotyczące akumulacji pierwiastków chemicznych.

## **Cel pracy**

Główną ideą niniejszej rozprawy doktorskiej było badanie specjacji arsenu, chromu i antymonu w próbkach żywności ciekłej (wody mineralne, smakowe oraz funkcjonalne) i stałej (algi). Istotnym elementem wszystkich prowadzonych badań było także zapewnienie jakości wyników poprzez prowadzenie walidacji stosowanych metod analitycznych, szacowanie niepewności wyników analitycznych oraz zapewnienie spójności pomiarowej wyników pomiarów. Do badania specjacji zastosowano zaawansowane techniki sprzężone LC/ICP-DRC-MS oraz ESI-MS/MS.

## **Część eksperymentalna**



## 5. Aparatura i sprzęt laboratoryjny, odczynniki, materiał badawczy

### 5.1 Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- Chromatograf ciekłowy (Perkin Elmer Sciex, Kanada) składający się z: automatycznego podajnika próbek (model Series 225), pompy (model Series 200) i termostatu kolumny (model Series 200) oraz degazera (model Series 200),
- kwadrupolowy spektrometr mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie wyposażony w dynamiczną komorę reakcyjną, model Elan DRC II (Perkin Elmer Sciex, Kanada),
- chromatograf ciekłowy, model Acquity UPLC system (Waters, USA) składający się z: automatycznego podajnika próbek, pompy i termostatu kolumny,
- spektrometr mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie, model Q Exactive (Thermo Fisher, USA),
- system mineralizacji wspomaganą mikrofalami wyposażony w naczynka kwarcowe i bomby teflonowe, model Ethos One (Milestone, Włochy),
- kolumny chromatograficzne:
  - kolumna anionowymienna, PRP-X100 (4,6 x 150 mm) (Hamilton Company, Szwajcaria),
  - kolumna żelowa, Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, USA),
  - kolumna typu C-18, ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 mm x 100 mm) (Waters, USA)
- łaźnia ultradźwiękowa (Polsonic, Polska),
- wirówka laboratoryjna (MPW, Polska).
- suszarka laboratoryjna SLW 32 STD INOX/G (Pol-Eko, Polska),
- waga analityczna ABS/ABJ (Kern, Niemcy),
- system oczyszczania wody Direct-Q 3 UV (Merck Millipore, USA),
- pipety automatyczne Research Plus o różnych zakresach pojemności od 0,5  $\mu\text{L}$  do 10000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Niemcy),
- moździerz z tłuczkiem, agatowy,
- naczynia laboratoryjne miarowe ze szkła oraz tworzyw sztucznych,
- drobny sprzęt laboratoryjny ze szkła oraz tworzyw sztucznych.

### 5.2 Odczynniki, materiały odniesienia, gazy

Odczynniki:

- Roztwór wzorcowy wielopierwiastkowy (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ : Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, In, K, Li,  $\mu\text{g}$ , Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, U, V, Zn), (Perkin Elmer Sciex, Kanada),
- roztwory wzorcowe jednopierwiastkowe:
  - (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Sb), (Perkin Elmer Sciex, Kanada),
  - (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Sc), (Perkin Elmer Sciex, Kanada),
  - (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Ge), (Perkin Elmer Sciex, Kanada),
  - (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Rh), (Perkin Elmer Sciex, Kanada),
  - (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Y), (Perkin Elmer Sciex, Kanada),
  - (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Tb), (Perkin Elmer Sciex, Kanada),
- kwas dimetyloarsenowy, (Sigma-Aldrich, USA),
- sól sodowa kwasu monometyloarsenowego, (Sigma-Aldrich, USA),

- arsenobetaina, (Sigma-Aldrich, USA),
- roztwór wzorcowy As(V) ( $994 \pm 6$ ) mg L<sup>-1</sup>, (Inorganic ventures, USA),
- roztwór wzorcowy As(III) ( $1002 \pm 5$ ) mg L<sup>-1</sup>, (Inorganic ventures, USA),
- roztwór wzorcowy Cr(VI) ( $997 \pm 5$ ) mg L<sup>-1</sup>, (Inorganic ventures, USA),
- roztwór wzorcowy Cr(III) ( $1000 \pm 4$ ) mg L<sup>-1</sup>, (Merck, Niemcy),
- heksahydroksoantymonian (V) potasu, (Sigma-Aldrich, USA),
- winian antymonu (III), hydrat, (Sigma-Aldrich, USA),
- Zestaw do kalibracji kolumny żelowej, niskie masy cząsteczkowe (Skład: Aprotynina, rybonukleaza A, anhydraza węglowa, albumina jaja kurzego, konalbumina, niebieski dekstran 2000), (GE Healthcare, USA),
- kwas azotowy(V) 65%, Suprapur (Merck, Niemcy),
- kwas chlorowodorowy 30%, Suprapur (Merck, Niemcy),
- roztwór amoniaku 25%, Suprapur (Merck, Niemcy),
- wodorotlenek sodu, pastylki, trace metals basis (Merck, Niemcy),
- chlorek sodu, proszek, trace metals basis (Merck, Niemcy),
- sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego, (Sigma-Aldrich, Niemcy),
- azotan (V) amonu, (Sigma-Aldrich, Niemcy),
- diwodorofosforan (V) amonu, (Sigma-Aldrich, Niemcy),
- wodorofosforan (V) sodu, trace metals basis (Merck, Niemcy),
- metanol, HPLC Gradient Grade, (J. T. Baker, Niemcy),
- etanol, Suprapur, (Merck, Niemcy),
- roztwór do codziennej optymalizacji spektrometru ICP-MS o stężeniu 10 µg L<sup>-1</sup> Ba i 1 µg L<sup>-1</sup> Mg, Co, Fe, Be, In, Ce, Pb, U, Th w 0,5% HNO<sub>3</sub> Smart Tune Solution – Elan DRC II/plus (Perkin Elmer Sciex, Kanada),
- roztwory buforowe do kalibracji pH-metru o pH: 4,18; 6,87 oraz 9,18 (Schott Instruments, Niemcy),

#### Materiały odniesienia:

- SLRS-5 River water reference material for trace metals (National Research Council, Kanada),
- SRM 1643d - Trace Elements in Water (National Institute of Standards and Technology, USA),
- TM27.3 Trace element fortified calibration standard CRM (National Water Research Institute, Kanada),
- TM 28.4 A low level fortified sample for trace elements, (National Water Research Institute, Kanada),
- CRM 7405-a: Trace Elements and Arsenic Compounds in Seaweed (National Metrology Institute of Japan, Japonia),
- SRM 3232 - Kelp Powder (*Thallus laminariae*), (National Institute of Standards and Technology, USA).

#### Gazy:

- Argon sprężony o czystości >99,999%, (Linde Gaz Polska, Polska),
- tlen sprężony o czystości >99,999%, (Linde Gaz Polska, Polska).



### 5.3 Materiał badawczy

*Badanie wpływu materiału i koloru opakowania na specjację As, Cr i Sb w butelkowanych wodach mineralnych*

Zakupiono 35 próbek butelkowanych wód mineralnych o zróżnicowanej zawartości składników rozpuszczonych (w zakresie od 216 mg L<sup>-1</sup> do 7390 mg L<sup>-1</sup>). Wszystkie badane próbki zostały zakupione w tym samym sklepie oraz, jeśli było to możliwe, posiadały podobną datę przydatności do spożycia. Część z badanych próbek (oznaczone jako X.1, X.2, X.3 itd. w tabeli 8) należało do tej samej marki wód (w sumie przebadano 19 marek wód) ale różniły się parametrami takimi jak nasycenie CO<sub>2</sub> oraz materiałem lub kolorem opakowania, w którym były przechowywane. Próbki były przechowywane w oryginalnych opakowaniach, w temperaturze 4°C bez dostępu światła słonecznego. Badane próbki bezpośrednio przed analizą zostały przefiltrowane przez filtr strzykawkowy (0,2 mm), próbki o zawartości substancji rozpuszczonych powyżej 1200 mg L<sup>-1</sup> zostały rozcieńczone do stężenia substancji rozpuszczonych około 1000 mg L<sup>-1</sup>. Zestawienie badanych próbek przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Charakterystyka badanych próbek butelkowanych wód mineralnych.

Oznaczenie próbki wody mineralnej	Zawartość substancji rozpuszczonych [mg L <sup>-1</sup> ]	Nasycenie CO <sub>2</sub>	pH	Materiał opakowania	Kolor opakowania	Rozcieńczenie
1	216	NG	7,4	PET	Jasnoróżowy	
2	347	NG	8,0	PET	Bezbarwny	
3.1	420	NG	7,0	PET	Jasnoniebieski	
3.2	420	LG	5,6	PET	Jasnoniebieski	
4.1	500	G	5,5	PET	Ciemnoniebieski	
4.2	500	G	5,3	Szkło	Zielony	
4.3	500	NG	7,2	Szkło	Zielony	
5.1	509	NG	8,0	PET	Jasnoniebieski	
5.2	509	G	5,2	Szkło	Zielony	
5.3	509	LG	5,6	PET	Jasnozielony	
6	556	NG	7,0	PET	Jasnoniebieski	
7	650	NG	7,5	PET	Jasnoniebieski	
8.1	630	G	5,5	PET	Bezbarwny	
8.2	630	G	5,2	Szkło	Zielony	
9.1	742	NG	7,5	PET	Jasnozielony	
9.2	742	NG	7,3	Szkło	Zielony	
9.3	742	SG	5,2	Szkło	Zielony	

9.4	683	G	6,2	Aluminium	Srebrny	
9.5	742	G	6,0	Szkło	Ciemnoniebieski	
9.6	742	G	5,5	PET	Ciemnoniebieski	
10.1	675	G	5,2	Szkło	Zielony	
10.2	675	G	5,2	PET	Zielony	
11.1	998	LG	5,1	PET	Zielony	
11.2	998	LG	5,1	Szkło	Zielony	
12.1	1357	NG	6,1	Szkło	Zielony	1:1
12.2	1357	NG	6,1	PET	Zielony	1:1
13.1	1320	NG	6,5	PET	Jasnoniebieski	1:1
13.2	2199	G	6,0	PET	Zielony	1:1
14	2157	G	5,7	Szkło	Zielony	1:1
15	2200	G	5,9	Szkło	Bezbarwny	1:1
16	3700	G	5,9	Szkło	Zielony	1:2
17	5225	LG	6,4	Szkło	Zielony	1:3
18	5800	SG	6,3	Szkło	Bezbarwny	1:4
29.1	7390	G	5,1	Szkło	Bezbarwny	1:4
19.2	7390	G	5,1	PET	Bezbarwny	1:4

\*G – woda gazowana, NG – woda niegazowana, LG – woda lekko gazowana, SG – woda silnie gazowana

#### *Badanie specjacji arsenu, chromu i antymonu w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych*

W sumie badaniom poddano 42 próbki butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych spośród których 30 było wód smakowych oraz 12 wód funkcjonalnych. Wszystkie badane próbki zostały zakupione w tym samym sklepie oraz, jeśli było to możliwe, posiadały podobną datę przydatności do spożycia. Próbki zostały pogrupowane ze względu na markę, wody tej samej marki oznaczono jako X.1, X.2, X.3... w tabeli 9. Badane próbki różniły się smakiem, składem i dodatkami funkcjonalnymi i nasyceniem CO<sub>2</sub>. Dla wszystkich marek wód dla której było to możliwe zakupiono także próbkę wody mineralnej bez dodatków smakowych oraz funkcjonalnych. Próbki te traktowano jako próbki referencyjne dla odpowiadającej im marki wód smakowych i funkcjonalnych. W sumie zakupiono 8 wód mineralnych, próbki te oznaczono \* w tabeli 9 oraz we wszystkich tabelach z wynikami pomiarów. Wszystkie zakupione wody były przechowywane w butelkach z poli(tereftalanu etylenu) (PET, ang. Polyethylene terephthalate). Badane próbki były przechowywane zgodnie z zaleceniami producentów oraz otwarte bezpośrednio przed rozpoczęciem analiz. Szczegółowe zestawienie badanych próbek przedstawiono w tabeli 9, informacje dotyczące smaku oraz składu badanych wód zostały zaczerpnięte z etykiet zamieszczonych na butelkach.

Tabela 9. Zestawienie badanych próbek butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych.

Oznaczenie próbki	Smak	Woda gazowana (G)/niegazowana(NG)	pH	Zawartość składników rozpuszczonych [mg L <sup>-1</sup> ]	Kolor butelki	Skład (dodatki funkcjonalne pogrubiono)
A.1*	Woda mineralna	NG	6,52	1670,9	Bezbarwny	-
A.2	Cytryna	NG	5,91	1670,9	Jasnoniebieski	Woda mineralna, naturalny aromat cytrynowy wraz z innymi naturalnymi aromatami
B.1*	Woda mineralna	NG	7,27	230	Jasnoniebieski	-
B.2*	Woda mineralna	G	4,84	311,5	Niebieski	-
B.3	Jabłko	G	2,89	-	Bezbarwny	Woda mineralna, cukier, sok jabłkowy z koncentratu, ekstrakt jabłkowy, kwas cytrynowy, aromaty naturalne
B.4	Pomarańcza	G	3,03	-	Bezbarwny	Woda źródłana, cukier, sok pomarańczowy z koncentratu, kwas cytrynowy, guma arabska, kwas askorbinowy, barwniki (karoteny), sorbinian potasu, aromaty naturalne
B.5	Cytryna	G	2,75	-	Bezbarwny	Woda źródłana, cukier, sok cytrynowy z koncentratu, kwas cytrynowy, guma arabska, kwas askorbinowy, barwniki (karoteny), sorbinian potasu, aromaty naturalne
B.6	Truskawka	NG	3,02	-	Jasnoniebieski	Woda mineralna, cukier, kwas cytrynowy, naturalny aromat truskawkowy wraz z innymi aromatami naturalnymi
B.7	Jabłko	NG	3,04	-	Jasnoniebieski	Woda źródłana, cukier, kwas cytrynowy, aromat naturalny, sok jabłkowy z koncentratu
B.8	Truskawka	NG	2,89	-	Jasnoniebieski	Woda źródłana, cukier, kwas cytrynowy, aromat naturalny, sok truskawkowy z koncentratu
B.9	Cytryna	NG	2,74	-	Jasnoniebieski	Woda źródłana, cukier, kwas cytrynowy, naturalny aromat cytrynowy wraz z innymi naturalnymi aromatami
B.10	Brzoskwinia	NG	3,01	-	Jasnoniebieski	Woda źródłana, cukier, kwas cytrynowy, benzoesan sodu, naturalny aromat brzoskwiiniowy wraz z innymi naturalnymi aromatami

B.11	Wiśnia	NG	2,90	-	Jasnoniebieski	Woda źródłana, cukier, kwas cytrynowy, benzoesan sodu, naturalny aromat wiśniowy wraz z innymi naturalnymi aromatami
B.12	Wiśnia	NG	3,05	-	Bezbarwny	Woda mineralna, cukier, sok wiśniowy z koncentratu, sok jabłkowy z koncentratu, kwas cytrynowy, koncentrat soku z czarnej marchwi, aromaty naturalne
B.13	Cytryna	NG	2,83	-	Bezbarwny	Woda mineralna, cukier, sok cytrynowy z koncentratu, sok jabłkowy z koncentratu, kwas cytrynowy, guma arabska, kwas askorbinowy, naturalny aromat cytrynowy wraz z innymi naturalnymi aromatami
C.1	Truskawka	NG	2,63	-	Bezbarwny	Woda, cukier, sok jabłkowy z koncentratu, kwas cytrynowy, sok truskawkowy z koncentratu, aromat naturalny
C.2	Cytryna	NG	2,65	-	Bezbarwny	Woda, cukier, sok cytrynowy z koncentratu, kwas cytrynowy, aromat naturalny, kwas askorbinowy
D.1	Cytryna	NG	3,64	775,2	Żółty	Woda mineralna, cukier, sok cytrynowy z koncentratu, sok winogronowy z koncentratu, aromat, kwas cytrynowy, cytrynian sodu, kwas askorbinowy
D.2	Jabłko	NG	3,42	775,2	Zielony	Woda mineralna, cukier, sok jabłkowy z koncentratu, sok winogronowy z koncentratu, aromat, kwas cytrynowy, kwas askorbinowy
D.3	Malina	NG	3,47	775,2	Czerwony	Woda mineralna, cukier, sok malinowy z koncentratu, sok winogronowy z koncentratu, aromat, kwas cytrynowy, cytrynian sodu, kwas askorbinowy
E.1*	Woda mineralna	NG	6,50	1010	Jasnoniebieski	-
E.2	Truskawka	NG	2,79	-	Niebieski	Woda, cukier, kwas cytrynowy, sok truskawkowy z koncentratu, kwas askorbinowy, aromat
E.3*	Woda mineralna	G	5,53	1010	Jasnozielony	-

E.4	Truskawka	G	3,77	-	Bezbarwny	Woda mineralna, kwas cytrynowy, naturalny aromat truskawkowy wraz z innymi naturalnymi aromatami, słodzik (sacharyna, cyklaminian)
E.5	Cytryna	G	4,2	-	Bezbarwny	Woda mineralna, kwas cytrynowy, naturalny aromat cytrynowy wraz z innymi naturalnymi aromatami, słodzik (sacharyna, cyklaminian)
F.1	Truskawka	NG	3,2	-	Bezbarwny	Woda mineralna, cukier, kwas cytrynowy, naturalny aromat truskawkowy wraz z innymi naturalnymi aromatami, benzoesan sodu, sorbinian potasu, słodzik (sacharyna, cyklaminian, acesulfam k, aspartam)
F.2	Cytryna	NG	2,99	-	Bezbarwny	Woda mineralna, cukier, kwas cytrynowy, naturalny aromat cytrynowy wraz z innymi naturalnymi aromatami, benzoesan sodu, sorbinian potasu, słodzik (sacharyna, cyklaminian, acesulfam k, aspartam)
G.1*	Woda mineralna	G	5,32	646,5	Jasnozielony	-
G.2	Pomarańcza i cytryna	G	3,32	-	Jasnozielony	Woda mineralna, syrop glukozowo-fruktozowy, cukier, kwas cytrynowy, naturalny aromat cytrusowy wraz z innymi naturalnymi aromatami, naturalny aromat pomarańczowy, sorbinian potasu, słodzik (acesulfam k, sukraloza)
G.3	Brzoskwinia i jabłko	G	3,37	-	Jasnozielony	Woda mineralna, syrop glukozowo-fruktozowy, cukier, kwas cytrynowy, naturalny aromat brzoskwiniowy wraz z innymi naturalnymi aromatami, naturalny aromat jabłkowy, sorbinian potasu, słodzik (acesulfam k, sukraloza)
G.4*	Woda mineralna	NG	7,05	-	Jasnoniebieski	-
G.5	Truskawka	NG	3,47	-	Jasnoniebieski	Woda mineralna, syrop glukozowo-fruktozowy, cukier, kwas cytrynowy, naturalny aromat truskawkowy wraz z innymi naturalnymi aromatami, słodzik (acesulfam k, sukraloza)
G.6	Cytryna	NG	3,26	-	Jasnoniebieski	Woda mineralna, syrop glukozowo-fruktozowy, cukier, kwas cytrynowy, naturalny aromat

							cytrynowy wraz z innymi naturalnymi aromatami, naturalny aromat grejpfrutowy, słodzik (acesulfam k, sukraloza)
H.1	Cytryna	NG	3,08	-		Bezbarwny	Woda, cukier, sok cytrynowy z koncentratu, aromat
H.2	Porzeczka	NG	3,14	-		Bezbarwny	Woda, cukier, sok cytrynowy z koncentratu, sok porzeczkowy z koncentratu, aromat
H.3	Malina	NG	3,12	-		Bezbarwny	Woda, cukier, sok cytrynowy z koncentratu, sok malinowy z koncentratu, aromat
I.1*	Woda mineralna	NG	7,80	387,4		Bezbarwny	-
I.2	Czerwone winogrono i pitaya	NG	2,70	-		Bezbarwny	Woda, cukier, kwas cytrynowy, koncentrat soku z czerwonej marchwi, naturalny aromat winogronowy wraz z innymi naturalnymi aromatami, <b>niacyna, wit. B6, biotyna, wit. B12, mleczan cynku</b>
I.3	Mięta, mniszek lekarski i pokrzywa	NG	3,10	-		Bezbarwny	Woda, fruktoza, kwas cytrynowy, aromat naturalny, ekstrakt z estragonu, ekstrakt z mięty, kwas askorbinowy, ekstrakt z korzenia mniszka lekarskiego, ekstrakt z korzenia pokrzywy, <b>niacyna, kwas pantotenowy, wit. B6, kwas foliowy, biotyna, wit. B12</b>
I.4	Cytryna i Pomarańcza	NG	3,70	-		Niebieski	Woda, cukier, kwas cytrynowy, aromaty naturalne, <b>niacyna, kwas pantotenowy, wit. B6, kwas foliowy, biotyna, wit. B12, węglan magnezu</b> , kwas askorbinowy
J.1	Owocowy (nie spreycyzowano)	NG	4,07	-		Bezbarwny	Woda, kwas cytrynowy, cytrynian sodu, <b>wit. C, niacyna, wit. B6, wit. B12, kwas pantotenowy, cynk</b> , cyklaminiany, sacharyna, aspartam, acesulfam K, sorbinian potasu, benzoosan sodu, guma arabska, estry glicerolu i żywicy roślinnej, aromaty, karoteny
J.2	Owocowy (nie spreycyzowano)	NG	3,90	-		Bezbarwny	Woda, kwas cytrynowy, cytrynian sodu, koncentrat soku z aronii, <b>wit. C, niacyna, wit. B6, wit. B12, kwas pantotenowy, kofeina, ekstrakt z guarany</b> , cyklaminiany, sacharyna, aspartam, acesulfam K, sorbinian potasu, benzoosan sodu, aromaty, karmel amoniakalno-siarczynowy

K.1	Malina	NG	2,98	-	Bezbarwny	Woda, cukier, sok malinowy z koncentratu, sok cytrynowy z koncentratu, aromat
K.2	Jagoda	NG	2,97	-	Bezbarwny	Woda, cukier trzcinowy, sok jagodowy z koncentratu, sok cytrynowy z koncentratu, <b>niacyna, wit. B6, kwas foliowy, wit. B12, biotyna, kwas pantotenowy</b> , aromaty
K.3	Mix cytrusów	NG	2,98	-	Bezbarwny	Woda, cukier trzcinowy, sok cytrynowy i grejpfrutowy z koncentratu, <b>niacyna, wit. B6, kwas foliowy, wit. B12, biotyna, kwas pantotenowy</b> , aromaty
L.1	Grejpfrut	NG	3,92	-	Jasnoniebieski	Woda, cukier, syrop glukozowo-fruktozowy, kwas cytrynowy, cytrynian sodu, naturalny aromat grejpfrutowy, <b>cytrynian magnezu</b> , kwas askorbinowy, benzoesan sodu
L.2	Kiwi	NG	3,37	-	Jasnoniebieski	Naturalna woda mineralna, cukier, syrop glukozowo-fruktozowy, kwas cytrynowy, cytrynian sodu, naturalny aromat kiwi, aromat, kwas askorbinowy, <b>kofeina, niacyna</b> , benzoesan sodu
L.3	Ananas	NG	3,38	-	Jasnoniebieski	Woda mineralna, kwas cytrynowy, słodzik (acesulfam k, sukraloza), naturalny aromat ananasowy, aromat, <b>siarczan cynku</b> , benzoesan sodu
L.4	Mandarynka	NG	3,24	-	Jasnoniebieski	Woda mineralna, cukier, syrop glukozowo-fruktozowy, kwas cytrynowy, cytrynian sodu, kwas askorbinowy, naturalny aromat mandarynkowy, <b>niacyna, kwas foliowy, wit. B12</b> , benzoesan sodu
L.5	Rabarbar i zielona kawa	NG	3,41	-	Jasnoniebieski	Woda, cukier, syrop glukozowo-fruktozowy, kwas cytrynowy, cytrynian sodu, sok rabarbarowy z koncentratu, <b>ekstrakt z guarany, ekstrakt z zielonej kawy</b> , kwas askorbinowy, benzoesan sodu, <b>kwas foliowy, niacyna</b>

\*- Próbkki wód mineralnych (próbki referencyjne dla odpowiadającej im marki wód smakowych i funkcjonalnych)

*Analiza specjacyjna arsenu w przetworzonych produktach żywnościowych z alg*

Badaniu specjacji arsenu poddano pięć próbek: 1) certyfikowany materiał odniesienia (CRM, ang. Certified reference material) 7405-a: Trace Elements and Arsenic Compounds in Seaweed (Hijiki), Narodowy Instytut Metrologii Japonii (NMIJ, ang. National Metrology Institute of Japan), 2) Hijiki (*Sargassum fusiforme*), ugotowane i wysuszone przez producenta, 3) Nori (*Pyropia yezoensis*) w formie płatów do sushi, 4) Morszczyn piłkowany (*Fucus serratus*), zmielone przez producenta oraz 5) standardowy materiał odniesienia (SRM, ang. Standard Reference Material) 3232 - Kelp Powder (*Thallus laminariae*), Narodowy Instytut Standardów i Technologii (NIST, ang. National Institute of Standards and Technology). Próbkę Nori zmielono w moździerz, Hijiki przygotowano jako dwie niezależne próbki: zmielone w moździerz (2) oraz zmielone w młynku kulowym (2a). Próbki NMIJ CRM 7405-a, NIST SRM 3232 - Kelp Powder (*Thallus laminariae*) i Morszczynu piłkowanego nie były poddawane mieleniu. Wykaz oraz charakterystykę badanych próbek alg przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Charakterystyka badanych próbek alg.

Oznaczenie próbki	Nazwa próbki	Sposób przetworzenia alg przez producenta	Wstępne przygotowanie próbki do mineralizacji/ekstrakcji
1	CRM 7405-a: Trace Elements and Arsenic Compounds in Seaweed (Hijiki)	Zliofilizowano i zmielono	-
2	Hijiki ( <i>Sargassum fusiforme</i> )	Ugotowano i wysuszone	Zmielono w moździerz
2a	Hijiki ( <i>Sargassum fusiforme</i> )	Ugotowano i wysuszone	Zmielono w młynku kulowym
3	Nori ( <i>Pyropia yezoensis</i> )	Przygotowano w formie płatów do sushi	Zmielono w moździerz
4	Morszczyn piłkowany ( <i>Fucus serratus</i> )	Zmielono	-
5	SRM 3232 - Kelp Powder ( <i>Thallus laminariae</i> )	Zhomogenizowano	-



## 6. Wyniki i dyskusja

W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono wyniki badań specjacji toksycznych pierwiastków chemicznych w próbkach żywności ciekłej i stałej technikami sprzężonymi LC/ICP-DRC-MS (DRC, dynamiczna komora reakcyjna, ang. Dynamic reaction cell) i LC/ESI-MS/MS (MS/MS, tandemowa spektrometria mas). Na analizę specjacyjną zazwyczaj składa się szereg etapów takich jak: 1) przygotowanie próbki do analizy, 2) oznaczanie zawartości całkowitych pierwiastków w badanej próbce, 3) oznaczanie znanych form specjacyjnych w badanej próbce, 4) szacowanie bilansu analizy specjacyjnej/zawartości całkowitej badanych pierwiastków w próbce oraz 5) identyfikacja i oznaczanie nieznanymi form specjacyjnych w badanej próbce. Obecność wszystkich tych etapów lub tylko ich części zależy od konkretnego problemu badawczego. Podejście do prowadzenia analizy specjacyjnej może się różnić w zależności od tego jakie pierwiastki i jakie formy specjacyjne tych pierwiastków badamy, ale także od tego z jakimi próbkami mamy do czynienia. W przypadku próbek żywności ciekłej przeprowadzenie analizy specjacyjnej bardzo często może być wykonane przy bardzo uproszczonym procesie przygotowania próbki, na który składa się filtrowanie oraz rozcieńczenie badanej próbki. W przypadku próbek stałych konieczne jest przeprowadzenie ekstrakcji analitów. Z tego względu uzyskane wyniki oraz ich dyskusję podzielono na indywidualne rozdziały dla badanych próbek ciekłych oraz stałych.

### 6.1 Badanie specjacji pierwiastków chemicznych w próbkach żywności ciekłej

Woda jest podstawowym elementem diety człowieka i jest niezbędna do utrzymania prawidłowego funkcjonowania organizmu. Oprócz wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi głównym źródłem wody w diecie jest woda butelkowana, której konsumpcja na świecie stale rośnie. Smakowe i funkcjonalne napoje na bazie wody są przez konsumentów często traktowane jako substytut wody mineralnej i mogą być spożywane w ilościach zbliżonych do zalecanego dziennego spożycia wody [107–109]. Istotna jest jednak kwestia bezpieczeństwa konsumpcji wody przechowywanej w różnego rodzaju opakowaniach, w odniesieniu do degradacji materiału, z którego przygotowano zostało opakowanie. Woda butelkowana sprzedawana w plastikowych lub szklanych butelkach jest często przechowywana w tych pojemnikach w trudnych do przewidzenia warunkach przez wiele miesięcy.

#### 6.1.1 Badanie wpływu materiału i koloru opakowania na specjację As, Cr i Sb w butelkowanych wodach mineralnych

Jak wspomniano we wstępie wmywanie pierwiastków chemicznych z opakowań w których przechowywana jest woda przeznaczona do spożycia przez ludzi występuje w odniesieniu do różnych rodzajów opakowań. Większość doniesień literaturowych traktuje jednak tą problematykę tylko w odniesieniu do całkowitych zawartości wmywanych pierwiastków. W niniejszej części rozprawy doktorskiej przedstawiono wyniki badań nad wpływem materiału i koloru opakowania na obecność pięciu toksycznych form specjacyjnych: As(III), As(V), Cr(VI), Sb(III) i Sb(V) w butelkowanych wodach mineralnych przechowywanych w opakowaniach z różnych materiałów i o różnych kolorach.

### 6.1.1.1 Procedura analityczna badania specjacji As, Cr i Sb w butelkowanych wodach mineralnych

W prowadzonych badaniach zastosowano oznaczania As(III), As(V), Cr(VI), Sb(III) i Sb(V) w wodzie techniką sprzężoną HPLC/ICP-DRC-MS [110]. W badaniach opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej rozszerzono możliwości zastosowania wspomnianej procedury analitycznej do wód mineralnych o szerokim zakresie zawartości substancji rozpuszczonych. W tym celu podjęto działania mające na celu eliminację efektów matrycowych oraz ponownie oszacowano wybrane parametry walidacyjne. W celu eliminacji interferencji spektralnych zastosowano DRC z tlenem jako gazem reakcyjnym. Rejestrowano sygnał dla jonów  $^{91}\text{AsO}^+$ ,  $^{52}\text{Cr}^+$ ,  $^{121}\text{Sb}^+$ . Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono przy wykorzystaniu kolumny anionowymiennej PRP-X100 (4,6 x 150 mm) (Hamilton Company, Szwajcaria). Przygotowano fazę ruchomą na którą składały się dwa eluenty: A i B. Skład obu eluentów ustalono na 3mM EDTANa<sub>2</sub> i 36mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, z kolei pH poszczególnych eluentów ustalono na 4,6 oraz 9,0 odpowiednio dla eluentu A oraz B. Zastosowano elucję gradientową. W tabeli 11 zebrano wybrane parametry procedury analitycznej oznaczania As(III), As(V), Cr(VI), Sb(III) i Sb(V) w butelkowanych wodach mineralnych.

Tabela 11. Wybrane parametry procedury analitycznej oznaczania As(III), As(V), Cr(VI), Sb(III) i Sb(V) w butelkowanych wodach mineralnych.

	Parametr	Opis/Wartość
HPLC	Rodzaj elucji	Gradientowa
	Skład fazy ruchomej	3 mM EDTANa <sub>2</sub> , 36 mM NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
	pH eluentów	Eluent A: 4,6, Eluent B: 9,0
	Przepływ fazy ruchomej	1,2 mL min <sup>-1</sup>
	Objętość nastrzyku	100 µL
	Temperatura kolumny	20°C
	Moc generatora RF	1100 - 1150 W
	Przepływ gazu rozpylającego (Ar)	0,89 – 0,91 L min <sup>-1</sup>
	Przepływ gazu pomocniczego (Ar)	1,20 L min <sup>-1</sup>
	Przepływ gazu plazmowego (Ar)	16 L min <sup>-1</sup>
ICP-MS	Materiał stożków łącnika	Pt
	Napięcie na soczewkach jonowych	8,5 – 9,5 V
	Tryb zbierania danych	Dual
	Monitorowane jony	$^{91}\text{AsO}^+$ , $^{52}\text{Cr}^+$ , $^{121}\text{Sb}^+$
	Czas zbierania danych	250 ms
	Przepływ gazu reakcyjnego w DRC (O <sub>2</sub> )	0,55 L min <sup>-1</sup>
	Rpq	0,55 V
	Rpa	0 V

Program elucji gradientowej składał się z następujących etapów:

- 0,5 min. 100% eluentu A (stabilizacja przepływu fazy ruchomej przed nastrzykiem),
- Nastrzyk próbki na kolumnę,
- 0,1 min. 100% eluentu A,
- 0,1 min. 100% eluentu B (zmiana eluentu A → B),
- 4,3 min. 100% eluentu B,
- 0,1 min. 100% eluentu A (zmiana eluentu B → A),
- 2,9 min. 100% eluentu A,
- koniec rejestrowania danych przez ICP-MS,
- 6,9 min. 100% eluentu A (kondycjonowanie kolumny po każdym nastrzyku).

Ze względu na wysoką zawartość substancji rozpuszczonych w badanych próbkach wód butelkowanych i związane z tym efekty matrycowe opracowano dwie nowe metody kalibracji: 1) kalibracja metodą serii wzorców dopasowanych matrycowo oraz 2) kalibracja metodą dodatku wzorca. W kalibracji metodą serii wzorców dopasowanych matrycowo wzorce kalibracyjne zostały przygotowane w oparciu o próbkę butelkowanej wody stołowej o zawartości składników rozpuszczonych na poziomie  $300 \text{ mg L}^{-1}$  oraz w której nie oznaczono As, Cr ani Sb. Krzywe kalibracyjne w tej metodzie zostały skonstruowane na podstawie pięciu punktów pomiarowych w następujących zakresach stężeń:  $0,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  -  $10,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  dla As(III) i As(V),  $0,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  -  $5,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  dla Sb(V) oraz  $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  -  $10,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  dla Sb(III) i Cr(VI). W kalibracji metodą dodatku wzorca krzywą kalibracyjną skonstruowano na podstawie pomiarów dla próbek rzeczywistych bez dodatku wzorca oraz z dodatkiem wzorca na dwóch poziomach stężeń:  $0,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  i  $5,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  dla As(III) i As(V),  $0,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  i  $5,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  dla Sb(V) oraz  $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  i  $5,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  dla Cr(VI). Ze względu na brak stabilności Sb(III) w badanych próbkach nie przygotowano krzywych kalibracyjnych dla tej formy specjacyjnej w kalibracji metodą dodatku wzorca. Wszystkie przygotowane krzywe kalibracyjne sporządzone zostały na podstawie średnich wartości pola powierzchni sygnałów chromatograficznych. Dla każdego punktu kalibracyjnego przygotowane zostały trzy niezależne wzorce kalibracyjne. Dla wszystkich testowanych metod kalibracji oceniono liniowość otrzymanych krzywych kalibracyjnych oraz oszacowano odzysk. Na podstawie uzyskanych wyników porównania zastosowanych metod kalibracji jako optymalną wybrano metodę dodatku wzorca. Porównanie zastosowanych strategii kalibracji przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Porównanie zastosowanych strategii kalibracji.

Metoda kalibracji	Analit*	Zakres pomiarowy [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Współczynnik determinacji	Dodatek wzorca zastosowany do oszacowania odzysku [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Odzysk [%]
Kalibracja metodą serii wzorców	As(III)	0,2-10,0	0,9987	1,0	84,4
	As(V)	0,2-10,0	0,9991	1,0	124,6
	Sb(V)	0,1-5,0	0,9999	1,0	100,0
	Cr(VI)	0,5-10,0	0,9994	1,0	127,6
Kalibracja metodą serii wzorców dopasowanych matrycowo	As(III)	0,2-10,0	0,9999	1,0	128,0
	As(V)	0,2-10,0	0,9893	1,0	110,8
	Sb(V)	0,1-5,0	1,0000	1,0	75,8
	Cr(VI)	0,5-10,0	0,9992	1,0	129,0
Metoda dodatku wzorca	As(III)	0,5-5,0	0,9998	0,5	115,0
	As(V)	0,5-5,0	0,9993	0,5	108,8
	Sb(V)	0,5-5,0	0,9999	0,5	94,1
	Cr(VI)	0,5-5,0	1,0000	0,5	96,3

\* Ze względu na brak stabilności Sb(III) w badanych próbkach nie podano wyników uzyskanych dla tej formy specjacyjnej.

### 6.1.1.2 Zapewnienie i kontrola jakości wyników pomiarów

#### Walidacja procedury analitycznej.

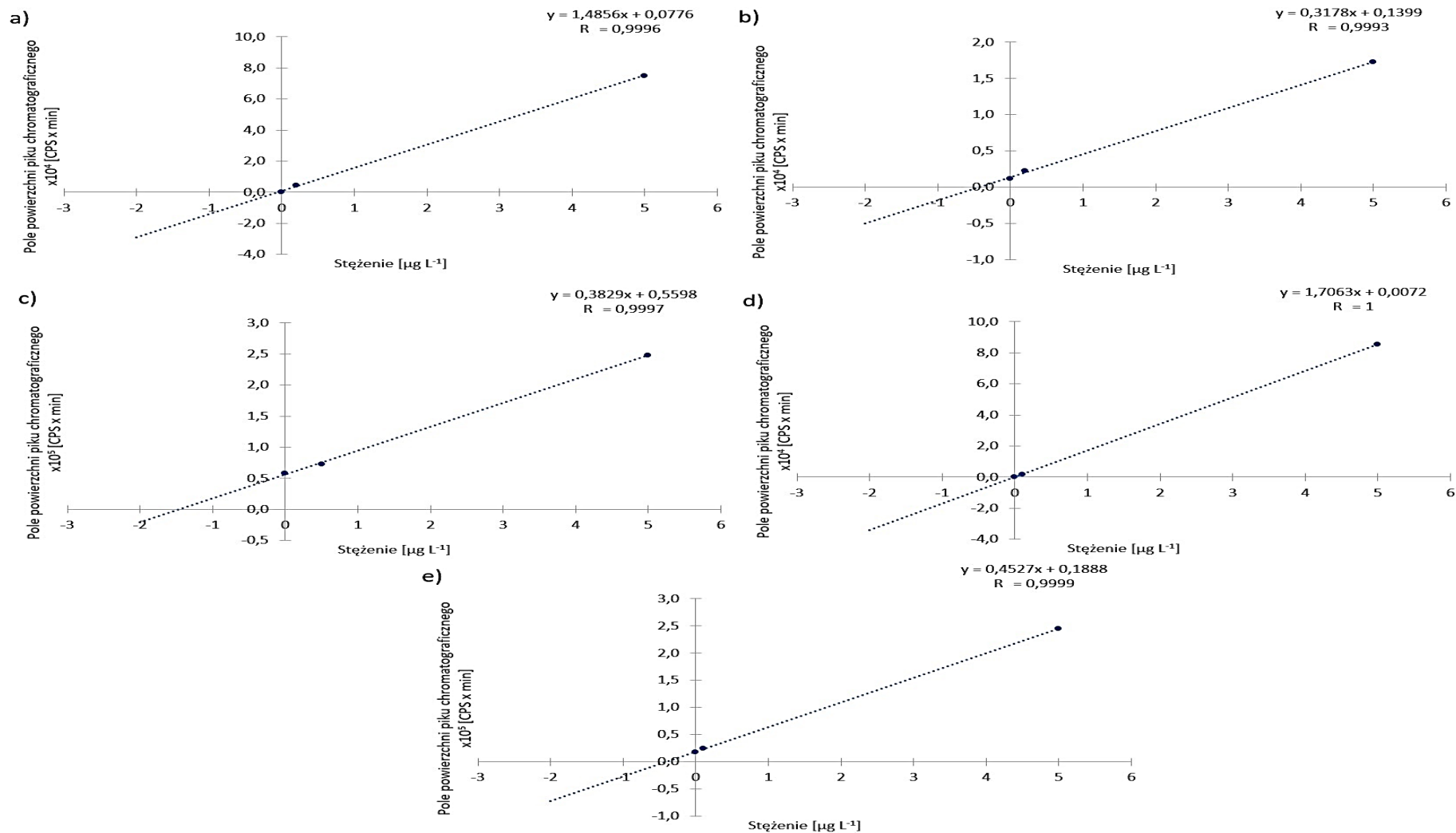
Podczas badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej oszacowano wybrane parametry walidacyjne metody analitycznej. Liniowość, poprawność oraz precyzja zostały oszacowane dla szerokiego zakresu stężeń analitów i składu matrycy. Proces walidacji został przeprowadzony z

wykorzystaniem dziewięciu próbek butelkowanych wód mineralnych o zawartości składników rozpuszczonych w zakresie od 216 mg L<sup>-1</sup> do 7390 mg L<sup>-1</sup>. Liniowość krzywych kalibracyjnych została zweryfikowana za pomocą oszacowania wartości współczynników determinacji dla wykreślonych krzywych kalibracyjnych. Poprawność metody analitycznej została oszacowana za pomocą metody dodatku wzorca do próbek rzeczywistych [111,112]. Do dziewięciu próbek butelkowanych wód mineralnych dodano roztwór zawierający wszystkie pięć oznaczanych form specjacyjnych w ilości odpowiedniej do uzyskania stężenia dodatku wzorca 0,5 µg L<sup>-1</sup> każdej z oznaczanych form specjacyjnych. W celu dodatkowej weryfikacji poprawności metody analitycznej przeprowadzono także weryfikację przy zastosowaniu dwóch CRM: 1) SLRS-5 River water reference material for trace metals i 2) SRM 1643d - Trace Elements in Water. Drugi z wymienionych materiałów odniesienia został rozcieńczony 100-krotnie w celu dopasowania zakresu stężeń badanych pierwiastków do zakresu pomiarowego metody analitycznej. Poprawność metody analitycznej wyrażono jako odzysk (R, %), którego wartość oszacowano zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Unia Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC, ang. International Union of Pure and Applied Chemistry) [113]. W celu weryfikacji czy uzyskane wartości odzysku nie różnią się w sposób statystycznie istotny od wartości optymalnej (100%) zastosowano test t-Studenta [114]. Precyzja metody analitycznej została oszacowana zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Rady Harmonizacji (ICH, ang. International Council on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) [115]. W tym celu wykorzystano dziewięć próbek butelkowanych wód mineralnych o zawartości składników rozpuszczonych w zakresie od 216 mg L<sup>-1</sup> do 7390 mg L<sup>-1</sup>. Precyzja metody analitycznej została oszacowana w warunkach precyzji powtarzalności i wyrażona jako CV [%] [111]. W przypadku Sb(III) zaobserwowano znaczący spadek intensywności sygnałów w większości badanych próbek zawierających zawartość składników rozpuszczonych powyżej 600 mg L<sup>-1</sup>. Jednocześnie nie obserwowano istotnego wzrostu intensywności sygnału dla drugiej oznaczanej formy specjacyjnej antymonu, Sb(V), w związku z tym założono, że Sb(III) ulega konwersji do niezdisocjowanej formy antymonu. Ze względu na konwersję Sb(III) poprawność oraz precyzję dla tej formy specjacyjnej oszacowano na bazie pomiarów dla trzech próbek w których forma ta była stabilna w czasie potrzebnym do przeprowadzenia pomiarów.

Uzyskane wartości współczynników determinacji dla krzywych kalibracyjnych mieściły się w zakresie od 0,9992 do 1,0000 dla wszystkich oznaczanych form specjacyjnych. Uzyskane wartości współczynników determinacji potwierdzają dobrą liniowość otrzymanych krzywych kalibracyjnych. Przykładowe krzywe kalibracyjne sporządzone metodą dodatku wzorca przedstawiono na rysunku 3. Wartości odzysku oszacowane dla wszystkich badanych form specjacyjnych mieściły się w zakresie od 84% do 117% dla próbek rzeczywistych z dodatkiem wzorca. W przypadku pomiarów dla CRM oznaczone zostały jedynie As(V) i Sb(V), odzyski oszacowane dla tych form specjacyjnych w odniesieniu do certyfikowanych stężeń całkowitych As i Sb w materiałach odniesienia wynosiły 88,0% dla As(V) i 86,0% dla Sb(V) w SRM 1643d - Trace Elements in Water oraz 76,0% dla As(V) i 97,4% dla Sb(V) w CRM SLRS-5 River water reference material for trace metals. Wyniki przeprowadzonego testu t-Studenta potwierdziły, że uzyskane wartości odzysku nie różnią się w sposób statystycznie istotny od wartości optymalnej (100%). Oszacowane wartości precyzji powtarzalności wynosiły: 4,5%, 5,6%, 4,6%, 2,4% i 1,8% odpowiednio dla As(III), As(V), Sb(V), Sb(III) i Cr(VI). Wyniki przeprowadzonej walidacji zostały zebrane w tabeli 13.

Tabela 13. Parametry walidacyjne procedury oznaczania As(III), As(V), Cr(VI), Sb(III) i Sb(V) w butelkowanych wodach mineralnych [110].

Parametr walidacyjny	As(III)	As(V)	Cr(VI)	Sb(III)	Sb(V)
Czas retencji [min]	1,5	2,1	7,1	4,6	1,7
Zakres pomiarowy [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,2-5,0	0,2-5,0	0,5-5,0	0,5-5,0	0,1-5,0
Współczynnik determinacji	0,9992-1,0000	0,9993-1,0000	0,9995-1,0000	0,9999	0,9999-1,0000
LOD [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,067	0,068	0,098	0,083	0,038
LOQ [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,20	0,20	0,29	0,25	0,11
Odzysk (metoda dodatku wzorca) [%]	95-117	100-116	92-112	84-105	95-104
Powtarzalność [%]	4,5	5,6	1,8	2,4	4,6



Rysunek 3. Przykładowe krzywe kalibracyjne metody dodatku wzorca dla procedury oznaczania: a) As(III), b) As(V), c) Cr(VI), d) Sb(III) i e) Sb(V), w butelkowanych wodach mineralnych.

### Szacowanie niepewności wyników pomiarów.

Niepewność wyników pomiarów szacowano przy zastosowaniu podejścia do szacowania niepewności wyników pomiarów z wykorzystaniem danych pochodzących z procesu walidacji w jednym laboratorium (single-lab validation approach, the Nordtest approach) [116,117]. Szacowanie niepewności wyników pomiarów zostało przeprowadzone na podstawie wyników uzyskanych dla dziewięciu próbek butelkowanych wód mineralnych o zawartości składników rozpuszczonych w zakresie od 216 mg L<sup>-1</sup> do 7390 mg L<sup>-1</sup>. Składowe niepewności zostały sklasyfikowane w dwie grupy: składowe związane z precyzją oraz składowe związane z poprawnością. Dodatkowo w przypadku próbek rozcieńczanych przed analizą do równania modelowego wprowadzona została dodatkowa składowa związana z niepewnością rozcieńczenia [116,118]. Złożone niepewności standardowe stężenia badanych analitów dla próbek rozcieńczanych  $u_c(c_r)$  oraz próbek nierozcieńczanych  $u_c(c_{nr})$  oszacowano na podstawie równań 1 i 2 [118].

$$u_c(c_r) = c_a \sqrt{u^2(p_i) + u^2(\bar{R})'} \quad (1)$$

$$u_c(c_{nr}) = c_a \sqrt{u^2(p_i) + u^2(\bar{R})' + u^2(f_{roz})} \quad (2)$$

Gdzie:  $u(p_i)$  – składowa niepewności związana z precyzją,  $u(\bar{R})'$  – składowa niepewności związana z odzyskiem,  $u(f_{roz})$  – składowa niepewności związana z rozcieńczeniem próbki przed analizą.

Składowa niepewności związana z precyzją została oszacowana na podstawie odchyłeń standardowych dla pomiarów wykonanych dla dziewięciu próbek butelkowanych wód mineralnych, pomiary wykonane zostały w trzech powtórzeniach dla każdej z próbek. Składowa niepewności związana z odzyskiem oszacowana została na podstawie poniższych równań.

$$R = \frac{\bar{c}_{wzb}}{c_{dw}} \quad (3)$$

Gdzie:  $R$  – odzysk,  $\bar{c}_{wzb}$  - wartość średnia zmierzonego stężenia dodatku wzorca w próbce,  $c_{dw}$  – teoretyczne stężenie dodatku wzorca w próbce.

Niepewność związana z wyznaczonym odzyskiem może być oszacowana na podstawie równania 4.

$$u(R) = R \sqrt{\frac{s_{wzb}^2}{3\bar{c}_{wzb}^2} + \left(\frac{u(c_{dw})}{c_{dw}}\right)^2} \quad (4)$$

Gdzie:  $s_{wzb}$  – odchylenie standardowe wyników pomiarów dla próbki z dodatkiem wzorca,  $u(c_{dw})$  – niepewność standardowa stężenia dodatku wzorca.

Ze względu na fakt, że odzysk badano dla dziewięciu próbek oszacowano średnią wartość odzysku oraz średnią niepewność związaną z wyznaczonym odzyskiem.

$$\bar{R} = \frac{1}{9} \sum_{i=1}^9 R_i \quad (5)$$

$$u(\bar{R}) = \frac{1}{9} \sqrt{\sum_{i=1}^9 u(R_i)^2} \quad (6)$$

Ponieważ w celu weryfikacji zgodności uzyskanych wartości odzysku z wartości optymalną (100%) zastosowano test t-Studenta niepewność związaną z odzyskiem oszacowano na podstawie jednego z poniższych równań [118].

$$u(\bar{R})' = \frac{t_{kr}u(\bar{R})}{1.96} \quad (7)$$

$$u(\bar{R})' = \sqrt{u(\bar{R})^2 + \left(\frac{1 - \bar{R}}{t_{kr}}\right)^2} \quad (8)$$

Składowa niepewności związana ze stężeniem dodatku wzorca została oszacowana na podstawie składowej niepewności związanej ze stężeniem roztworu podstawowego zastosowanego do przygotowania próbek z dodatkiem wzorca –  $u(c_p)$  oraz składowej niepewności związanej z rozcieńczeniem tego roztworu –  $u(f_{roz\ wz})$ .

$$\frac{u(c_{dw})}{c_{dw}} = \sqrt{\left(\frac{u(c_p)}{c_p}\right)^2 + \left(\frac{u(f_{roz\ wz})}{f_{roz\ wz}}\right)^2} \quad (9)$$

Składowe te oszacowano na podstawie źródeł niepewności związanych z czystością stosowanego odczynnika, masą odważki odczynnika i objętością roztworów odmierzanym za pomocą pipet i kolb miarowych podczas rozcieńczania roztworu podstawowego. Składowa niepewności związana z rozcieńczeniem próbki przed analizą oszacowana została na podstawie składowych niepewności związanych z zastosowanymi pipetami oraz kolbami miarowymi. Niepewności rozszerzone oszacowano przy założeniu poziomu ufności około 95% przyjmując wartość współczynnika rozszerzenia  $k=2$  [116]. Uzyskane wartości niepewności rozszerzonej ( $U$ ,  $k=2$ ) dla As(III), As(V), Sb(III), Sb(V) i Cr(VI) wyniosły odpowiednio: 8,06%, 12,6%, 6,04%, 5,70% oraz 3,28% (dla próbek nierozcieńczanych) oraz 8,12%, 12,6%, 6,32%, 6,00% oraz 3,78% (dla próbek rozcieńczanych).

*Zapewnienie spójności pomiarowej wyników pomiarów.*

Spójność pomiarową wyników pomiarów zapewniono za pomocą metody dodatku wzorca do próbek rzeczywistych oraz poprzez analizę certyfikowanych materiałów odniesienia SRM 1643d Trace Elements in Water oraz CRM SLRS-5 River water reference material for trace metals [111–113,119].

### 6.1.1.3 Wyniki badania specjacji As, Cr i Sb w butelkowanych wodach mineralnych

Badaniu poddano 35 próbek butelkowanych wód mineralnych o zróżnicowanej zawartości składników rozpuszczonych, różnym nasyceniu  $CO_2$  oraz przechowywanych w opakowaniach z różnych materiałów i w różnych kolorach. Zastosowano opracowaną procedurę do analizy próbek butelkowanych wód mineralnych o szerokim zakresie zawartości substancji rozpuszczonych. Uzyskane parametry walidacyjne potwierdziły przydatność opracowanej procedury do zakładanego zastosowania. Wyniki oznaczania As(III), As(V), Sb(III), Sb(V), i Cr(VI) w butelkowanych wodach mineralnych zestawiono w tabeli 14.



Tabela 14. Wyniki oznaczania As(III), As(V), Sb(III), Sb(V), i Cr(VI) w butelkowanych wodach mineralnych.

Próbka	Stężenie ( $c \pm U$ , $k=2$ ) [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]				
	As(III)	As(V)	Sb(III)	Sb(V)	Cr(VI)
1	<LOD	2,57±0,32	<LOD	0,288±0,016	<LOD
2	0,132±0,011*	0,455±0,057	<LOD	0,340±0,019	0,1640±0,0054*
3.1	0,0752±0,0060*	1,37±0,17	<LOD	0,401±0,023	<LOD
3.2	0,491±0,040	0,413±0,052	<LOD	0,336±0,019	<LOD
4.1	<LOD	0,340±0,043	<LOD	0,517±0,029	<LOD
4.2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
4.3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,261±0,009*
5.1	<LOD	1,10±0,39	<LOD	0,444±0,025	<LOD
5.2	0,1121±0,0090*	0,285±0,036	<LOD	0,245±0,014	0,2342±0,0077*
5.3	<LOD	0,0680±0,0086*	<LOD	0,293±0,017	<LOD
6	<LOD	1,43±0,18	<LOD	0,721±0,040	<LOD
7	<LOD	1,11±0,14	<LOD	0,410±0,023	<LOD
8.1	0,0710±0,0057*	0,418±0,053	<LOD	0,275±0,016	<LOD
8.2	0,151±0,012	0,612±0,077	<LOD	<LOD	0,1638±0,0054*
9.1	0,0820±0,0066*	0,359±0,045	<LOD	0,403±0,023	<LOD
9.2	0,085±0,068*	0,469±0,059	<LOD	0,1361±0,0078	1,462±0,048
9.3	0,0912±0,0073*	0,625±0,079	<LOD	0,0691±0,0039*	0,0980±0,0032*
9.4	<LOD	0,244±0,031	<LOD	<LOD	<LOD
9.5	<LOD	0,428±0,054	<LOD	<LOD	0,1053±0,0034*
9.6	<LOD	0,304±0,038	<LOD	0,174±0,010	<LOD
10.1	0,296±0,024	0,634±0,080	<LOD	0,0773±0,0044*	0,203±0,067*
10.2	<LOD	0,493±0,062	<LOD	0,365±0,021	<LOD
11.1	0,0720±0,0058*	1,01±0,12	<LOD	0,540±0,031	<LOD
11.2	0,0944±0,0076*	1,27±0,16	<LOD	0,191±0,011	<LOD
12.1	0,380±0,031*	0,742±0,093	<LOD	0,1322±0,0079*	0,660±0,025
12.2	0,189±0,015*	0,80±0,10	<LOD	0,209±0,013*	<LOD
13.1	0,282±0,023*	0,959±0,036	<LOD	0,361±0,022	0,2315±0,0073*

13.2	0,474±0,038	3,76±0,47	<LOD	0,357±0,021	0,389±0,015*
14	0,362±0,029*	0,82±0,10	<LOD	<LOD	<LOD
15	0,177±0,014*	0,497±0,063	<LOD	0,1321±0,0079*	<LOD
16	0,483±0,039*	0,593±0,097*	<LOD	<LOD	2,222±0,084
17	2,72±0,22	1,24±0,16	<LOD	<LOD	0,284±0,011*
18	1,040 ±0,84	0,363 ±0,046*	<LOD	<LOD	0,772±0,029
19.1	0,886±0,072*	1,39±0,18	<LOD	<LOD	<LOD
19.2	1,121±0,091	1,53±0,19	<LOD	0,456±0,027*	<LOD

\*Stężenia oznaczone pomiędzy wartością LOD i LOQ.

Spośród oznaczanych form specjacyjnych, dominującą formą w badanych próbkach butelkowanych wód mineralnych był As(V). Najwyższe oznaczone stężenia As(III) i As(V) w badanych próbkach wynosiły odpowiednio:  $(2,72 \pm 0,22) \mu\text{g L}^{-1}$  oraz  $(3,76 \pm 0,47) \mu\text{g L}^{-1}$ . W próbkach o niższym nasyceniu  $\text{CO}_2$  oznaczono zauważalnie wyższe stężenia As(V) w porównaniu do próbek wód gazowanych. W odniesieniu do materiału opakowania zaobserwowano podwyższone stężenia obu form arsenu w próbkach wód mineralnych przechowywanych w butelkach szklanych w porównaniu z butelkami z tworzywa PET. W próbce przechowywanej w aluminiowej puszcze oznaczono tylko As(V). W przypadku antymonu oznaczono tylko formę na piątym stopniu utlenienia. Sb(V) obecny był w zdecydowanej większości badanych próbek, najwyższe oznaczone stężenie tej formy specjacyjnej wyniosło  $(0,721 \pm 0,040) \mu\text{g L}^{-1}$ . Zdecydowanie wyższe stężenia Sb(V) oznaczono w wodach mineralnych przechowywanych w butelkach z tworzywa PET. Stężenie Sb(V) w próbkach butelkowanych wód mineralnych wzrastało wraz ze wzrostem pH wody. W literaturze naukowej można znaleźć publikacje naukowe potwierdzające fakt, że butelki z tworzywa PET, które są powszechnie stosowane do przechowywania wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, mogą uwalniać znaczną ilość antymonu [22,23,120–122]. W wodzie przechowywanej w butelkach z tworzyw sztucznych potwierdzono także obecność arsenu [123–126]. Zdecydowanie wyższe stężenia tego pierwiastka były jednak oznaczane w wodach przechowywanych w butelkach szklanych [22,121,127,128]. Forma specjacyjna Cr(VI) oznaczona została w 14 spośród wszystkich badanych próbek, najwyższe oznaczone stężenie tej formy specjacyjnej wyniosło  $(2,222 \pm 0,084) \mu\text{g L}^{-1}$ . Spośród próbek w których oznaczono Cr(VI) zdecydowaną większość stanowiły butelkowane wody mineralne przechowywane w butelkach szklanych oraz plastikowych koloru zielonego. Wyższe stężenia Cr(VI) oznaczono w butelkowanych wodach mineralnych o niskim nasyceniu  $\text{CO}_2$ , co jest zgodne z wyższą stabilnością chromu na VI stopniu utlenienia w pH powyżej 7. Uzyskane wyniki są zgodne z doniesieniami literaturowymi potwierdzającymi fakt, że woda przeznaczona do spożycia przez ludzi przechowywana w zielonych butelkach może zawierać większe ilości chromu w porównaniu z wodą przechowywaną w butelkach bezbarwnych [22,127].

Uzyskane wyniki potwierdziły podwyższone stężenia As(III) i As(V) w wodach przechowywanych w butelkach szklanych oraz podwyższone stężenia Sb(V) w butelkach z tworzywa PET. Niezależnie od materiału opakowania podwyższone stężenia Cr(VI) oznaczono w próbkach przechowywanych w butelkach koloru zielonego. Potwierdzono także zależność wzrostu

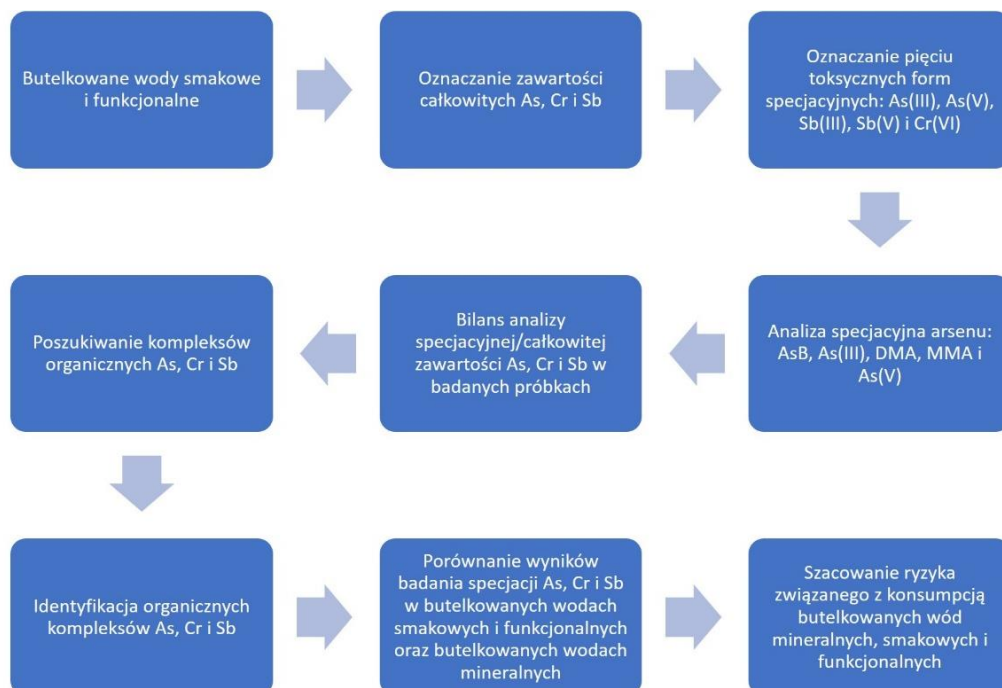
stężenia form specjacyjnych As(V), Cr(VI) oraz Sb(V) wraz ze wzrostem pH wody, a co za tym idzie, wraz ze spadkiem nasycenia CO<sub>2</sub> tej wody. Warunki przechowywania, takie jak temperatura, ekspozycja na światło słoneczne czy czas przechowywania również wpływają na wymywanie pierwiastków chemicznych z opakowania [22,120,121,127,129–132]. Stężenie żadnej z oznaczonych form specjacyjnych As, Cr i Sb nie przekraczało maksymalnych dopuszczalnych stężeń arsenu, chromu i antymonu w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi które wynoszą odpowiednio 10, 50 i 20 µg L<sup>-1</sup> [133]. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki można wnioskować, że ze spożyciem badanych wód nie wiąże się ryzyko w odniesieniu do działania toksycznego As, Cr i Sb.

### 6.1.2 Badanie specjacji arsenu, chromu i antymonu w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych

W produkcji butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych stosowana jest szeroka gama dodatków takich jak konserwanty, substancje słodzące, regulatory kwasowości, aromaty, barwniki czy dodatki funkcjonalne, a więc można spodziewać się w tego typu wodach bardziej zróżnicowanej specjacji As, Cr i Sb. Ze względu na fakt, że butelkowane wody smakowe i funkcjonalne mogą być przez konsumentów traktowane jako substytut wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi i spożywane w ilościach zbliżonych do zalecanego dziennego spożycia wody kontrola jakości tego rodzaju napojów w kontekście obecności toksycznych form specjacyjnych pierwiastków chemicznych stanowi istotny problem. W niniejszej części rozprawy doktorskiej przedstawiono wyniki badań specjacji As, Cr i Sb w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych za pomocą technik sprzężonych LC/ICP-DRC-MS oraz LC/ESI-MS/MS.

#### 6.1.2.1 Procedury analityczne badania specjacji As, Cr i Sb w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych

Badanie specjacji arsenu, chromu i antymonu w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych składało się z ośmiu etapów które przedstawiono na rysunku 4.



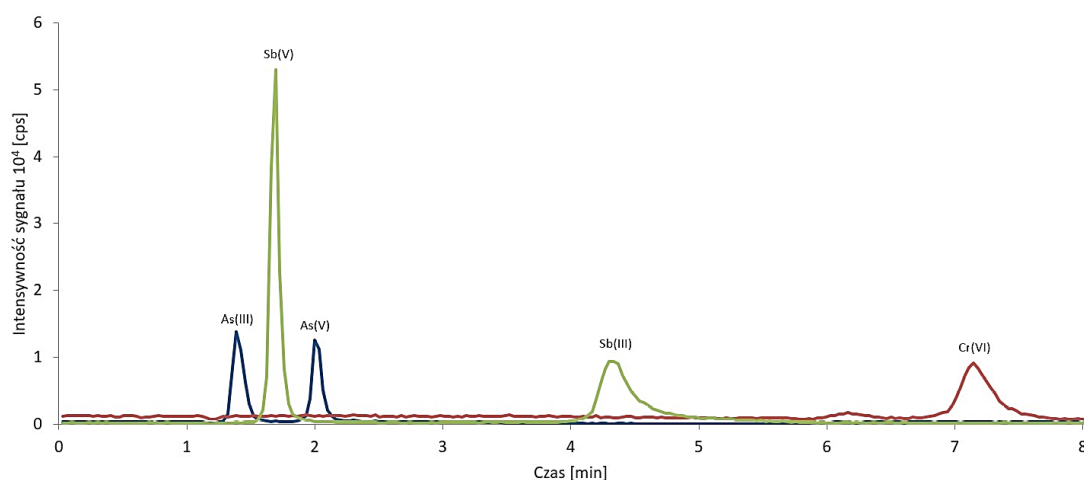
Rysunek 4. Schemat prowadzonych badań.

### Oznaczanie zawartości całkowitych As, Cr i Sb.

Zawartość całkowitą As (tAs, ang. Total As), Cr (tCr, ang. Total Cr) i Sb (tSb, ang. Total Sb) w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych oznaczano zgodnie z wytycznymi przedstawionymi w normie PN-EN ISO 17294-2:2016-11 Jakość wody -- Zastosowanie spektrometrii mas z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-MS) -- Część 2: Oznaczanie wybranych pierwiastków, w tym izotopów uranu [134]. Monitorowano jony  $^{91}\text{AsO}^+$ ,  $^{52}\text{Cr}^+$  i  $^{121}\text{Sb}^+$ . W celu eliminacji interferencji spektralnych zastosowano DRC oraz tlen jako gaz reakcyjny. Interferencje niespektralne eliminowano przy zastosowaniu metody wzorca wewnętrznego. Dla As oraz Cr i Sb zastosowano inne izotopy wzorca wewnętrznego:  $^{74}\text{Ge}^+$  dla  $^{91}\text{AsO}^+$  oraz  $^{103}\text{Rh}^+$  dla  $^{52}\text{Cr}^+$  i  $^{121}\text{Sb}^+$ . Badane próbki przed analizą zakwaszono stężonym kwasem azotowym (65%, v/v) do ostatecznego stężenia kwasu azotowego w próbce 3%.

### Oznaczanie pięciu toksycznych form specjacyjnych: As(III), As(V), Sb(III), Sb(V) i Cr(VI).

Oznaczanie As(III), As(V), Sb(III), Sb(V) i Cr(VI) zrealizowano przy wykorzystaniu techniki sprzężonej HPLC/ICP-DRC-MS, zastosowano DRC oraz tlen jako gaz reakcyjny oraz monitorowano jony  $^{91}\text{AsO}^+$ ,  $^{52}\text{Cr}^+$  i  $^{121}\text{Sb}^+$ . Analogicznie jak w przypadku badania specjacji butelkowanych wód mineralnych wykorzystano kolumnę anionowymienną PRP-X100 (4,6 x 150 mm) (Hamilton Company, Szwajcaria). Przygotowano fazę ruchomą na którą składały się dwa eluenty: A i B. Skład obu eluentów ustalono na 3mM EDTANa<sub>2</sub> i 36mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, z kolei pH poszczególnych eluentów ustalono na 4,6 oraz 9,0 odpowiednio dla eluentu A oraz B. Zastosowano elucję gradientową [30,110]. W opisywanej procedurze próbki były analizowane bez wcześniejszego przygotowania. Przykładowy chromatogram dla wzorców kalibracyjnych wykorzystanych w procedurze oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych przedstawiono na rysunku 5.



Rysunek 5. Przykładowy chromatogram dla wzorców kalibracyjnych wykorzystanych w procedurze oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych.

Wybrane parametry procedury analitycznej oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Wybrane parametry procedury analitycznej oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych.

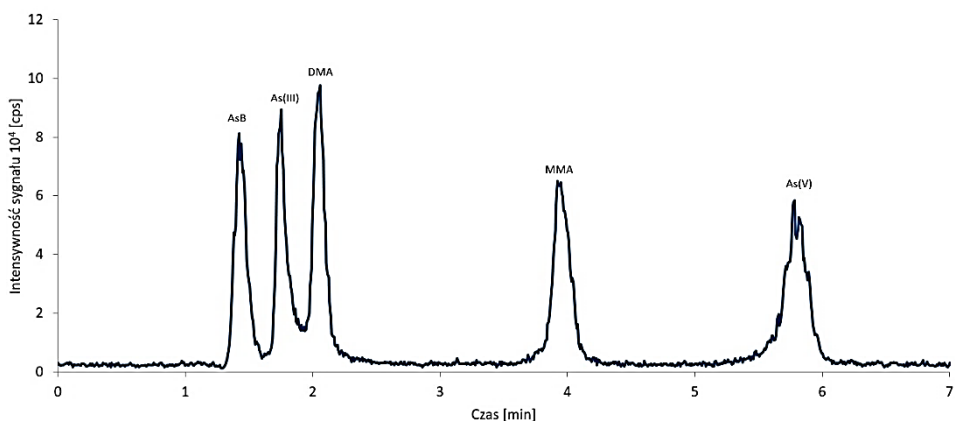
	Parametr	Opis/Wartość
HPLC	Rodzaj elucji	Gradientowa
	Skład fazy ruchomej	3 mM EDTANa <sub>2</sub> , 36 mM NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
	pH eluentów	Eluent A: 4,6, Eluent B: 9,0
	Przepływ fazy ruchomej	1,2 mL min <sup>-1</sup>
	Objętość nastrzyku	100 µL
	Temperatura kolumny	25°C
	Moc generatora RF	1050 - 1200 W
	Przepływ gazu rozpylającego (Ar)	0,87 – 0,93 L min <sup>-1</sup>
	Przepływ gazu pomocniczego (Ar)	1,20 L min <sup>-1</sup>
	Przepływ gazu plazmowego (Ar)	16 L min <sup>-1</sup>
ICP-MS	Materiał stożków łącnika	Pt
	Napięcie na soczewkach jonowych	6,5 – 10,0 V
	Tryb zbierania danych	Dual
	Monitorowane jony	<sup>91</sup> AsO <sup>+</sup> , <sup>52</sup> Cr <sup>+</sup> , <sup>121</sup> Sb <sup>+</sup>
	Czas zbierania danych	250 ms
	Przepływ gazu reakcyjnego w DRC (O <sub>2</sub> )	0,55 L min <sup>-1</sup>
	Rpq	0,55 V
	Rpa	0 V

Program elucji gradientowej składał się z następujących etapów:

- 0,5 min. 100% eluentu A (stabilizacja przepływu fazy ruchomej przed nastrzykiem),
- Nastrzyk próbki na kolumnę,
- 0,1 min. 100% eluentu A,
- 0,1 min. 100% eluentu B (zmiana eluentu A → B),
- 4,3 min. 100% eluentu B,
- 0,1 min. 100% eluentu A (zmiana eluentu B → A),
- 2,9 min. 100% eluentu A,
- koniec rejestrowania danych przez ICP-MS,
- 6,9 min. 100% eluentu A (kondycjonowanie kolumny po każdym nastrzyku).

*Analiza specjacyjna arsenu: AsB, As(III), DMA, MMA i As(V).*

Arsen był pierwiastkiem oznaczanym w najwyższym stężeniu, dlatego zastosowano dodatkową procedurę analizy specjacyjnej arsenu. Oznaczano pięć form specjacyjnych arsenu: AsB, As(III), DMA, MMA i As(V). W badaniach specjacji arsenu także wykorzystano kolumnę anionowymienną PRP-X100 (4,6 x 150 mm) (Hamilton Company, Szwajcaria). Przygotowano fazę ruchomą o składzie 10 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 10 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> oraz pH 9,2. Zastosowano elucję izokratyczną [135]. W opisywanej procedurze próbki były analizowane bez wcześniejszego przygotowania. Przykładowy chromatogram dla wzorców kalibracyjnych wykorzystanych w procedurze analizy specjacyjnej arsenu przedstawiono na rysunku 6.



Rysunek 6. Przykładowy chromatogram dla wzorców kalibracyjnych wykorzystanych w procedurze analizy specjacyjnej arsenu.

Wybrane parametry procedury analizy specjacyjnej arsenu w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych przedstawiono w tabeli 16.

Tabela 16. Wybrane parametry procedury analizy specjacyjnej arsenu w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych.

	Parametr	Opis/Wartość
HPLC	Rodzaj elucji	Izokratyczna
	Skład fazy ruchomej	10 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 10 mM $\text{NH}_4\text{NO}_3$
	pH eluentów	9,2
	Przepływ fazy ruchomej	$1,2 \text{ mL min}^{-1}$
	Objętość nastrzyku	100 $\mu\text{L}$
	Temperatura kolumny	$25^\circ\text{C}$
	Moc generatora RF	1050 - 1200 W
	Przepływ gazu rozpylającego (Ar)	$0,87 - 0,93 \text{ L min}^{-1}$
	Przepływ gazu pomocniczego (Ar)	$1,20 \text{ L min}^{-1}$
	Przepływ gazu plazmowego (Ar)	$16 \text{ L min}^{-1}$
ICP-MS	Materiał stożków łącznika	Pt
	Napięcie na soczewkach jonowych	6,5 – 10,0 V
	Tryb zbierania danych	Dual
	Monitorowane jony	$^{91}\text{AsO}^+$
	Czas zbierania danych	250 ms
	Przepływ gazu reakcyjnego w DRC ( $\text{O}_2$ )	$0,55 \text{ L min}^{-1}$
	Rpq	0,55 V
	Rpa	0 V

*Bilans analizy specjacyjnej/zawartości całkowitej As, Cr i Sb w badanych próbkach.*

Bilans analizy specjacyjnej/zawartości całkowitej poszczególnych pierwiastków oszacowano dla każdego z badanych pierwiastków oddzielnie zgodnie z równaniem 10 [86].

$$uP = \frac{\sum B + C + D}{A} \times 100\% \quad (10)$$

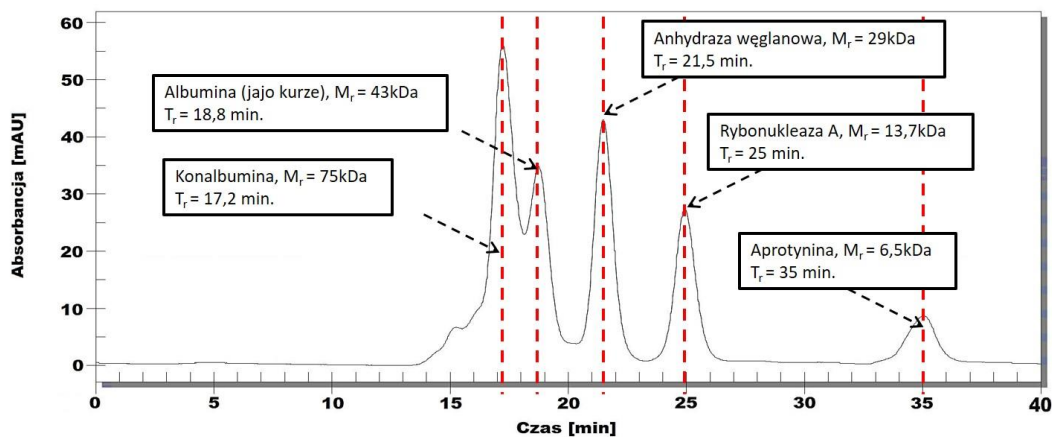
Gdzie:

uP - Bilans analizy specjacyjnej/zawartości całkowitej danego pierwiastka, A – stężenie całkowite danego pierwiastka, B – Stężenie poszczególnych form specjacyjnych danego pierwiastka oznaczonych metodą HPLC/ICP-DRC-MS, C - Stężenie form specjacyjnych niewymytych z kolumny, D - Niewyeksahowane formy specjacyjne.

Na podstawie wyników bilansu analizy specjacyjnej/zawartości całkowitej As, Cr i Sb wytypowano próbki, które poddano dalszym badaniom w kierunku oznaczania nieznanymi form specjacyjnych As, Cr i Sb. Badaniom tym poddano tylko próbki w przypadku których zaobserwowano znaczną różnicę między całkowitymi zawartościami As, Cr i Sb a sumą stężeń form specjacyjnych As, Cr i Sb oznaczonych w tych próbkach.

*Poszukiwanie kompleksów organicznych As, Cr i Sb.*

Poszukiwanie kompleksów organicznych As, Cr i Sb przeprowadzono z zastosowaniem chromatografii wykluczania (SEC, ang. size exclusion chromatography). Badaniom tym poddano 16 próbek. Zastosowano kolumnę żelową Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, USA) w układzie HPLC/ICP-DRC-MS. Analogicznie jak w przypadku poprzednich analiz zastosowano DRC oraz tlen jako gaz reakcyjny i monitorowano jony  $^{91}\text{AsO}^+$ ,  $^{52}\text{Cr}^+$  i  $^{121}\text{Sb}^+$ . Zastosowana kolumna żelowa wymagała kalibracji czasów retencji w zależności od masy wymywanych cząsteczek. W tym celu w układzie pomiarowym zastosowano detektor UV zamiast detektora ICP-MS. Do kalibracji czasów retencji kolumny żelowej wykorzystano dedykowany przez producenta kolumny zestaw do kalibracji kolumny żelowej, niskie masy cząsteczkowe (Skład: Aprotynina, rybonukleaza A, anhydraza węglowa, albumina jaja kurzego, konalbumina, niebieski dekstran 2000), (GE Healthcare, USA). W opisywanej procedurze próbki były analizowane bez wcześniejszego przygotowania. Na rysunku 7 przedstawiono chromatogram uzyskany podczas kalibracji czasów retencji kolumny żelowej.



Rysunek 7. Chromatogram uzyskany podczas kalibracji czasów retencji kolumny żelowej.

Wybrane parametry procedury poszukiwania kompleksów organicznych As, Cr i Sb przedstawiono w tabeli 17.

Tabela 17. Wybrane parametry procedury poszukiwania kompleksów organicznych As, Cr i Sb.

	Parametr	Opis/Wartość
SEC	Rodzaj elucji	Izokratyczna
	Skład fazy ruchomej	50 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 30 mM NaCl
	pH fazy ruchomej	7,2
	Przepływ fazy ruchomej	0,55 mL min <sup>-1</sup>
	Objętość nastrzyku	100 µL
	Temperatura kolumny	25°C
	Moc generatora RF	1050 – 1200 W
	Przepływ gazu rozpylającego (Ar)	0,87 – 0,93 L min <sup>-1</sup>
	Przepływ gazu pomocniczego (Ar)	1,20 L min <sup>-1</sup>
	Przepływ gazu plazmowego (Ar)	16 L min <sup>-1</sup>
ICP-MS	Materiał stożków łącznika	Pt
	Napięcie na soczewkach jonowych	6,5 – 10,0 V
	Tryb zbierania danych	Dual
	Monitorowane jony	<sup>91</sup> AsO <sup>+</sup> , <sup>52</sup> Cr <sup>+</sup> , <sup>121</sup> Sb <sup>+</sup>
	Czas zbierania danych	250 ms
	Przepływ gazu reakcyjnego w DRC (O <sub>2</sub> )	0,55 L min <sup>-1</sup>
	Rpq	0,55 V
	Rpa	0 V

#### *Identyfikacja kompleksów organicznych As, Cr i Sb.*

Przeprowadzono identyfikację organicznych kompleksów As, Cr i Sb za pomocą spektrometrii cząsteczkowej. Badania prowadzono dla wszystkich próbek, dla których w trakcie analiz z zastosowaniem SEC zarejestrowano sygnały analityczne. Opracowano procedurę identyfikacji kompleksów organicznych As, Cr i Sb z zastosowaniem techniki ESI-MS/MS. Wykorzystano wysokorozdzielczy spektrometr Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher, USA) wyposażony w podgrzewane źródło jonów z elektrorozpraszaniem. Badane próbki były wstrzykiwane do źródła jonów bezpośrednio z wykorzystaniem pompy strzykawkowej. Badania prowadzono w trybie jonów ujemnych z zastosowaniem podgrzewanego źródła jonów HESI-II. Pomiary prowadzono w zakresie mas od 100 - 1000 *m/z* oraz z rozdzielczością 70 000 *m/z* w trybie FullMS oraz 17 500 w trybie ddMS2. W opisywanej procedurze próbki były analizowane bez wcześniejszego przygotowania. Wybrane parametry procedury identyfikacji kompleksów organicznych As, Cr i Sb w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych przedstawiono w tabeli 18.



Tabela 18. Wybrane parametry procedury identyfikacji kompleksów organicznych As, Cr i Sb w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych.

	Parametr	Opis/Wartość
ESI-MS	Natężenie przepływu pompy strzykawkowej	5 $\mu\text{L min}^{-1}$
	Zakres mas	100 - 1000 $m/z$
	Rozdzielczość w trybie FullMS	70 000 $m/z$
	Rozdzielczość w trybie ddMS2	17 500 $m/z$
	Przepływ gazu osłonowego, N <sub>2</sub>	15 jednostek
	Przepływ gazu pomocniczego, N <sub>2</sub>	5 jednostek
	Temperatura gazu pomocniczego	120°C
	Napięcie jonizacji	2,5 kV
	Temperatura kapilary wlotowej	250°C
	Współczynnik RF dla optyki jonowe	50
	Znormalizowana energia fragmentacji w komorze HCD	30 eV

#### 6.1.2.2 Zapewnienie i kontrola jakości wyników pomiarów

##### *Walidacja procedur analitycznych.*

Dla procedury oznaczania zawartości całkowitych As, Cr i Sb wyznaczono wybrane parametry walidacyjne: liniowość, granicę wykrywalności (LOD, ang. Limit of detection), poprawność oraz precyzję pomiarów. Liniowość zweryfikowano przy wykorzystaniu szacowania współczynnika determinacji. Wartość LOD oszacowano na podstawie pomiarów przeprowadzonych dla próbki ślepej – roztwór kwasu azotowego o stężeniu 3%. Do obliczeń zastosowano równanie 11 [111,113].

$$LOD = c + 3 \times SD \quad (11)$$

Gdzie: c – średnie stężenie analitu zmierzone w próbce ślepej, SD – odchylenie standardowe pomiarów dla próbki ślepej.

Poprawność oraz precyzję pomiarów oszacowano na podstawie wyników uzyskanych dla CRM TM 28.4 A low level fortified sample for trace elements. Poprawność metody analitycznej wyrażono jako odzysk (R, %), którego wartość oszacowano zgodnie z zaleceniami IUPAC [111–113]. Precyzję oszacowano w warunkach właściwych dla poprawności, zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Rady Harmonizacji (ICH), i wyrażono jako CV [%] [111,115].

Dla procedur oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych oraz analizy specjacyjnej arsenu oszacowano takie parametry jak liniowość krzywych kalibracyjnych, LOD, precyzja oraz poprawność. Liniowość zweryfikowano przy wykorzystaniu szacowania współczynnika determinacji oraz za pomocą analizy reszt. Analiza reszt opiera się na wizualnej ocenie wykresu reszt. Na wykresie tym reszty wykreślone są na osi pionowej, a zmienna niezależna (krzywa kalibracyjna) na osi poziomej. Reszty powinny być losowo rozmieszczone wokół osi poziomej i nie powinny wykazywać żadnych trendów. W celu wyznaczenia wartości LOD, w każdej z procedur, wybrane 9 próbek rozcieńczono 4-krotnie (w celu uzyskania matrycy bez obecności

analitów). Do tak przygotowanych próbek dodano znaną ilość analitów w celu uzyskania stężenia zbliżonego do oczekiwanej wartości LOD ( $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Wartość LOD oszacowano jako trzykrotność odchylenia standardowego (SD, ang. Standard deviation) dla pomiarów wyżej wymienionych próbek [111,112]. Precyzję oszacowano w warunkach właściwych dla precyzji pośredniej (odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej), zgodnie z wytycznymi ICH [115]. Przygotowano 9 niezależnych próbek butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych z dodatkiem wszystkich badanych form specjacyjnych na poziomie  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  dla oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych oraz  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  dla analizy specjacyjnej arsenu. Oszacowane wartości precyzji wyrażono jako CV [%]. W celu oszacowania poprawności wykorzystano metodę dodatku wzorca do próbek rzeczywistych [111]. Podobnie jak w przypadku oceny poprawności przygotowano dziewięć niezależnych próbek butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych z dodatkiem wszystkich badanych form specjacyjnych na poziomie  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  dla oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych oraz  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  dla analizy specjacyjnej arsenu. Poprawność metody analitycznej wyrażono jako odzysk (R, %), którego wartość oszacowano zgodnie z zaleceniami IUPAC [113]. W celu weryfikacji czy uzyskane wartości odzysku nie różnią się w sposób statystycznie istotny od wartości optymalnej (100%) zastosowano test t-Studenta [114].

Procedury oznaczania nieznanymi form specjacyjnych As, Cr i Sb jako procedury analizy jakościowej nie zostały poddane pełnemu procesowi walidacji. W przypadku tych procedur oszacowano precyzję pomiarów w sposób jakościowy. Dla każdej z badanych próbek wykonano trzy powtórzenia pomiarów i jakościowo oceniono zgodność uzyskanych wyników.

Wartości współczynników determinacji dla krzywych kalibracyjnych wykreślonych w metodzie oznaczania zawartości całkowitych As, Cr i Sb wynosiły odpowiednio 0,9996, 0,9997 oraz 0,9985. Wartości LOD uzyskane dla tAs, tCr oraz tSb wynosiły odpowiednio  $0,038 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,045 \mu\text{g L}^{-1}$  oraz  $0,061 \mu\text{g L}^{-1}$ . Wartości odzysku uzyskane dla tAs, tCr oraz tSb wynosiły odpowiednio 88,9%, 90,3% oraz 99,5%. Oszacowane wartości precyzji powtarzalności wynosiły: 1,5% dla tAs, 3,4% dla tCr oraz 2,0 dla tSb.

Uzyskane wartości współczynników determinacji dla krzywych kalibracyjnych mieściły się w zakresie od 0,996 do 1,0000 dla oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych oraz od 0,995 do 0,9999 dla analizy specjacyjnej arsenu. Uzyskane wartości współczynników determinacji potwierdzają dobrą liniowość otrzymanych krzywych kalibracyjnych. Analiza wykresów rozrzutu reszt potwierdziła losowe oraz równomierne rozłożenie reszt wokół krzywej kalibracyjnej. Wartości LOD uzyskane dla oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych wynosiły  $0,058 \mu\text{g L}^{-1}$  dla As(III),  $0,051 \mu\text{g L}^{-1}$  dla As(V),  $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$  dla Cr(VI),  $0,090 \mu\text{g L}^{-1}$  dla Sb(III) oraz  $0,046 \mu\text{g L}^{-1}$  dla Sb(V). W przypadku analizy specjacyjnej arsenu oszacowane wartości LOD wynosiły  $0,054 \mu\text{g L}^{-1}$  dla AsB,  $0,081 \mu\text{g L}^{-1}$  dla As(III),  $0,053 \mu\text{g L}^{-1}$  dla DMA,  $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$  dla MMA oraz  $0,080 \mu\text{g L}^{-1}$  dla As(V). Wartości odzysku oszacowane dla oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych mieściły się w zakresie od 97% do 109%. Dla analizy specjacyjnej arsenu oszacowane wartości odzysku mieściły się w zakresie od 99% do 106%. Wyniki przeprowadzonego testu t-Studenta potwierdziły, że uzyskane wartości odzysku nie różnią się w sposób statystycznie istotny od wartości optymalnej (100%). Oszacowane wartości precyzji pośredniej, wyrażone jako CV, wynosiły dla oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych: 4,3%, 5,5%, 5,5%, 3,1% i 2,5% odpowiednio dla As(III), As(V), Sb(V), Sb(III) i Cr(VI). Dla analizy specjacyjnej arsenu oszacowane wartości precyzji pośredniej, wyrażone jako CV, wynosiły: 3,6%, 4,8%, 3,9%, 7,2% oraz 4,4% odpowiednio dla AsB, As(III), DMA, MMA oraz As(V). Zestawienie oszacowanych parametrów walidacyjnych przedstawiono w tabeli 19.

### *Szacowanie niepewności wyników pomiarów.*

W przypadku wyników oznaczania całkowitych zawartości As, Cr i Sb nie oszacowano niepewności wyników pomiarów. Dla wyników tAs, tCr oraz tSb oszacowano odchylenie standardowe dla pomiarów każdej z badanych próbek.

Niepewność wyników pomiarów szacowano przy zastosowaniu podejścia do szacowania niepewności wyników pomiarów z wykorzystaniem danych pochodzących z procesu walidacji (single-lab validation approach, the Nordtest approach) [116,117]. Szacowanie niepewności wyników pomiarów zostało przeprowadzone na podstawie wyników uzyskanych dla dziewięciu próbek butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych. Składowe niepewności zostały sklasyfikowane w dwie grupy: składowe związane z precyzją oraz składowe związane z poprawnością. Złożoną niepewność standardową stężenia badanych analitów  $u_c(c)$  oszacowano na podstawie następującego równania 12 [118].

$$u_c(c) = c_a \sqrt{u^2(p_i) + u^2(\bar{R})'} \quad (12)$$

Gdzie:  $u(p_i)$  – składowa niepewności związana z precyzją,  $u(\bar{R})'$  – składowa niepewności związana z odzyskiem.

Poszczególne składowe niepewności związane z precyzją oraz poprawnością zostały oszacowane zgodnie z równaniami przedstawionymi w rozdziale 6.2.1.2 niniejszej rozprawy doktorskiej. Niepewności rozszerzone oszacowano przy założeniu poziomu ufności około 95% przyjmując wartość współczynnika rozszerzenia  $k=2$  [116]. Uzyskane wartości niepewności rozszerzonej ( $U$ ,  $k=2$ ) dla wielopierwiastkowej analizy specjacyjnej wynosiły: 9,4% dla As(III), 9,2% dla As(V), 6,1% dla Cr(VI), 6,6% dla Sb(III) oraz 6,2% dla Sb(V). Dla analizy specjacyjnej arsenu uzyskane wartości niepewności rozszerzonej ( $U$ ,  $k=2$ ) wynosiły: 9,8% dla AsB, 9,9% dla As(III), 8,7% dla DMA, 9,0% dla MMA oraz 7,4% dla As(V). Zestawienie oszacowanych wartości niepewności rozszerzonych przedstawiono w tabeli 19.

### *Zapewnienie spójności pomiarowej wyników pomiarów.*

Spójność pomiarową wyników pomiarów zapewniono za pomocą metody dodatku wzorca do próbek rzeczywistych [111–113,119].

Tabela 19. Wyniki walidacji procedur analitycznych.

Parametr procedury analitycznej	Analit				
<b>Oznaczenie zawartości tAs, tCr i tSb</b>	tAs	tCr	tSb		
Zakres pomiarowy [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]		0,05 – 7,5			
Współczynnik determinacji	0,9996	0,9997	0,9985		
LOD [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,038	0,045	0,061		
Odzysk [%]	88,9	90,3	99,5		
Precyzja powtarzalności [%]	1,5	3,4	2,0		
<b>Oznaczenie pięciu toksycznych form specjacyjnych</b>	As(III)	As(V)	Cr(VI)	Sb(III)	Sb(V)
Czas retencji [min]	1,4	2,0	7,2	4,4	1,7
Zakres pomiarowy [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,2–5,0	0,2–5,0	0,5–5,0	0,5–5,0	0,1–5,0
Współczynnik determinacji	0,997–0,9999	0,996–0,9999	0,998–1,0000	0,999–0,9999	0,997–1,0000
LOD [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,058	0,051	0,12	0,090	0,046
Odzysk na poziomie $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ [%]	101	99	109	97	103
Precyzja pośrednia [%]	4,3	5,5	2,5	3,1	5,5
Niepełność rozszerzona ( $k = 2$ ) [% stężenia analitu]	9,4	9,2	6,1	6,6	6,2
<b>Analiza specjacyjna arsenu</b>	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)
Czas retencji [min]	1,5	1,8	2,1	4,0	5,8
Zakres pomiarowy [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,5–10,0	0,5–10,0	0,5–10,0	0,5–10,0	0,5–10,0
Współczynnik determinacji	0,995–0,999	0,995–0,9999	0,996–0,9999	0,997–0,9999	0,996–0,9999
LOD [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,054	0,081	0,053	0,10	0,080
Odzysk na poziomie $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ [%]	106	99	102	104	100
Precyzja pośrednia [%]	3,6	4,8	3,9	7,2	4,4
Niepełność rozszerzona ( $k = 2$ ) [% stężenia analitu]	9,8	9,9	8,7	9,0	7,4

### 6.1.2.3 Wyniki badania specjacji As, Cr i Sb w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych

Badaniu poddano 42 próbki butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych spośród których 30 było wód smakowych oraz 12 wód funkcjonalnych. Badane próbki różniły się smakiem, zawartością dodatków funkcjonalnych oraz nasyceniem CO<sub>2</sub>. Przeprowadzono oznaczanie zawartości tAs, tCr oraz tSb w badanych próbkach, analizę specjacyjną pięciu toksycznych form specjacyjnych, analizę specjacyjną arsenu, analizę nieznaną form specjacyjnych As, Cr i Sb oraz szacowanie ryzyka związanego z konsumpcją wyżej wymienionych napojów. Próbka oznaczona jako K.1 należąca do tej samej marki co szereg badanych wód funkcjonalnych, nie zawierała żadnych dodatków funkcjonalnych i była traktowana jako woda smakowa podczas obróbki wyników. W przypadku gdy stężenie analitu było poniżej wartości LOD, wynik ten nie był uwzględniany w prowadzonych obliczeniach.

*Oznaczanie zawartości całkowitych As, Cr i Sb.*

Zestawienie wyników oznaczania tAs, tCr oraz tSb w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych przedstawiono w tabeli 20.

Tabela 20. Zestawienie wyników oznaczania tAs, tCr oraz tSb w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych.

Próbki	Stężenie (c±SD) [µg L <sup>-1</sup> ]		
	As	Cr	Sb
A.1*	0,0078±0,0011	0,0115±0,0014	0,1857±0,0059
A.2	0,318±0,020	0,0740±0,0066	0,503±0,015
B.1*	0,184±0,012	0,0473±0,0034	0,2568±0,0098
B.2*	0,587±0,052	0,0520±0,0044	0,3760±0,0094
B.3	1,320±0,069	0,847±0,023	0,1825±0,0035
B.4	1,575±0,070	0,581±0,014	0,846±0,027
B.5	1,713±0,063	1,252±0,097	0,748±0,031
B.6	0,825±0,026	0,2100±0,0091	0,1786±0,0051
B.7	0,681±0,032	0,1742±0,0074	0,2855±0,0079
B.8	0,809±0,023	0,193±0,015	0,264±0,015
B.9	0,689±0,035	0,1882±0,0056	0,2874±0,0062
B.10	0,416±0,024	0,2724±0,0059	0,3029±0,0074
B.11	0,360±0,017	0,371±0,024	0,332±0,017
B.12	1,380±0,053	0,924±0,020	0,1974±0,0029
B.13	0,895±0,069	0,408±0,026	0,2269±0,0049
C.1	0,364±0,024	0,4465±0,0090	1,145±0,019
C.2	0,405±0,026	0,1665±0,0084	0,787±0,030
D.1	5,52±0,24	0,502±0,020	0,458±0,010
D.2	8,37±0,52	0,525±0,027	0,643±0,037
D.3	5,50±0,23	0,439±0,024	0,598±0,019
E.1*	0,0528±0,0074	0,0415±0,0029	0,1545±0,0048
E.2	0,386±0,018	0,3993±0,0061	0,0797±0,0026
E.3*	0,251±0,013	0,0427±0,0027	0,2545±0,0034
E.4	0,754±0,018	0,392±0,023	0,2262±0,0054
E.5	0,1496±0,0090	0,204±0,012	0,1884±0,0034
F.1	1,504±0,040	0,4848±0,0090	0,2278±0,0063
F.2	1,536±0,086	0,465±0,032	0,260±0,010
G.1*	1,077±0,072	0,0150±0,0012	0,5099±0,0056
G.2	3,60±0,29	0,3801±0,0034	0,2631±0,0033
G.3	2,875±0,095	0,4099±0,0046	0,1915±0,0032
G.4*	0,933±0,014	0,3225±0,0012	0,2541±0,0019

G.5	2,446±0,096	0,1785±0,0015	0,2287±0,0012
G.6	2,038±0,059	0,0220±0,0069**	0,1212±0,0021
H.1	0,480±0,018	0,1929±0,0035	0,3873±0,0073
H.2	0,520±0,013	0,1897±0,0086	0,378±0,017
H.3	0,221±0,022	0,234±0,012	0,395±0,10
I.1*	0,490±0,020	0,00206±0,00019	0,156±0,0075
I.2	0,922±0,012	0,940±0,041	0,001079±0,000015**
I.3	0,584±0,027	0,570±0,029	0,2701±0,0072
I.4	1,220±0,023	1,310±0,045	0,6125±0,0066
J.1	0,1259±0,0035	0,538±0,023	0,489±0,010
j.2	0,240±0,014	0,490±0,015	0,469±0,012
K.1	0,546±0,038	0,3466±0,0090	0,2202±0,0052
k.2	0,578±0,019	0,904±0,018	0,2233±0,0044
K.3	0,445±0,019	0,619±0,034	0,1976±0,0083
L.1	0,376±0,012	0,217±0,012	0,326±0,011
L.2	0,377±0,014	0,0759±0,0068	0,437±0,015
L.3	0,0922±0,0067	0,1581±0,0045	0,3808±0,0058
L.4	0,2643±0,0066	0,0474±0,0014	0,4691±0,0069
L.5	0,594±0,022	0,2584±0,0029	0,4314±0,0067

\* - Próbkki wód mineralnych (próbki referencyjne dla odpowiadającej im marki wód smakowych i funkcjonalnych), \*\* - wyniki poniżej LOD (wartości LOD: As – 0,038 µg L<sup>-1</sup>, Cr – 0,045 µg L<sup>-1</sup>, Sb – 0,061 µg L<sup>-1</sup>)

tAs oznaczono w badanych próbkach w najwyższym stężeniu spośród wszystkich oznaczanych pierwiastków. We wszystkich badanych próbkach oznaczone stężenie tAs było wyższe niż oszacowana wartość LOD (0,038 µg L<sup>-1</sup>). Stężenie tAs w badanych próbkach wahało się w granicach od (0,0922 ± 0,0067) µg L<sup>-1</sup> do (8,37 ± 0,52) µg L<sup>-1</sup>. Średnie stężenie tAs w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych było równe odpowiednio 1,606 µg L<sup>-1</sup> oraz 0,485 µg L<sup>-1</sup>. tCr oznaczono powyżej oszacowanej wartości LOD (0,061 µg L<sup>-1</sup>) we wszystkich badanych próbkach za wyjątkiem próbki oznaczonej jako I.2. Stężenie tCr w badanych próbkach wahało się w granicach od (0,0474 ± 0,0014) µg L<sup>-1</sup> do (1,310 ± 0,045) µg L<sup>-1</sup>. Średnie stężenie tCr w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych było równe odpowiednio 0,395 µg L<sup>-1</sup> oraz 0,511 µg L<sup>-1</sup>. tSb oznaczono powyżej oszacowanej wartości LOD (0,045 µg L<sup>-1</sup>) we wszystkich badanych próbkach za wyjątkiem próbki oznaczonej jako G.6. Stężenie tSb w badanych próbkach wahało się od (0,0797 ± 0,0026) µg L<sup>-1</sup> do (1,145 ± 0,019) µg L<sup>-1</sup>. Średnie stężenie tCr w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych było równe odpowiednio 0,372 µg L<sup>-1</sup> oraz 0,392 µg L<sup>-1</sup>. Wśród literatury naukowej można odnaleźć prace potwierdzające obecność As, Cr i Sb w różnego rodzaju napojach takich jak soki czy napoje gazowane [25,136–140]. Stężenia oznaczone dla tAs, tCr i tSb podczas eksperymentów opisywanych w niniejszej pracy doktorskiej są zgodne z doniesieniami literaturowymi dotyczącymi stężeń tych pierwiastków w różnego rodzaju napojach oraz wodach butelkowanych. Potwierdzenie w literaturze naukowej znajduje również fakt, że to arsen był pierwiastkiem dominującym w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych [124,128,136,137,139,141–143].

*Oznaczanie pięciu toksycznych form : As(III), As(V), Cr(VI), Sb(III) i Sb(V).*

Zestawienie wyników oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych (wraz z wynikami dla 8 badanych wód mineralnych) przedstawiono w tabeli 21.

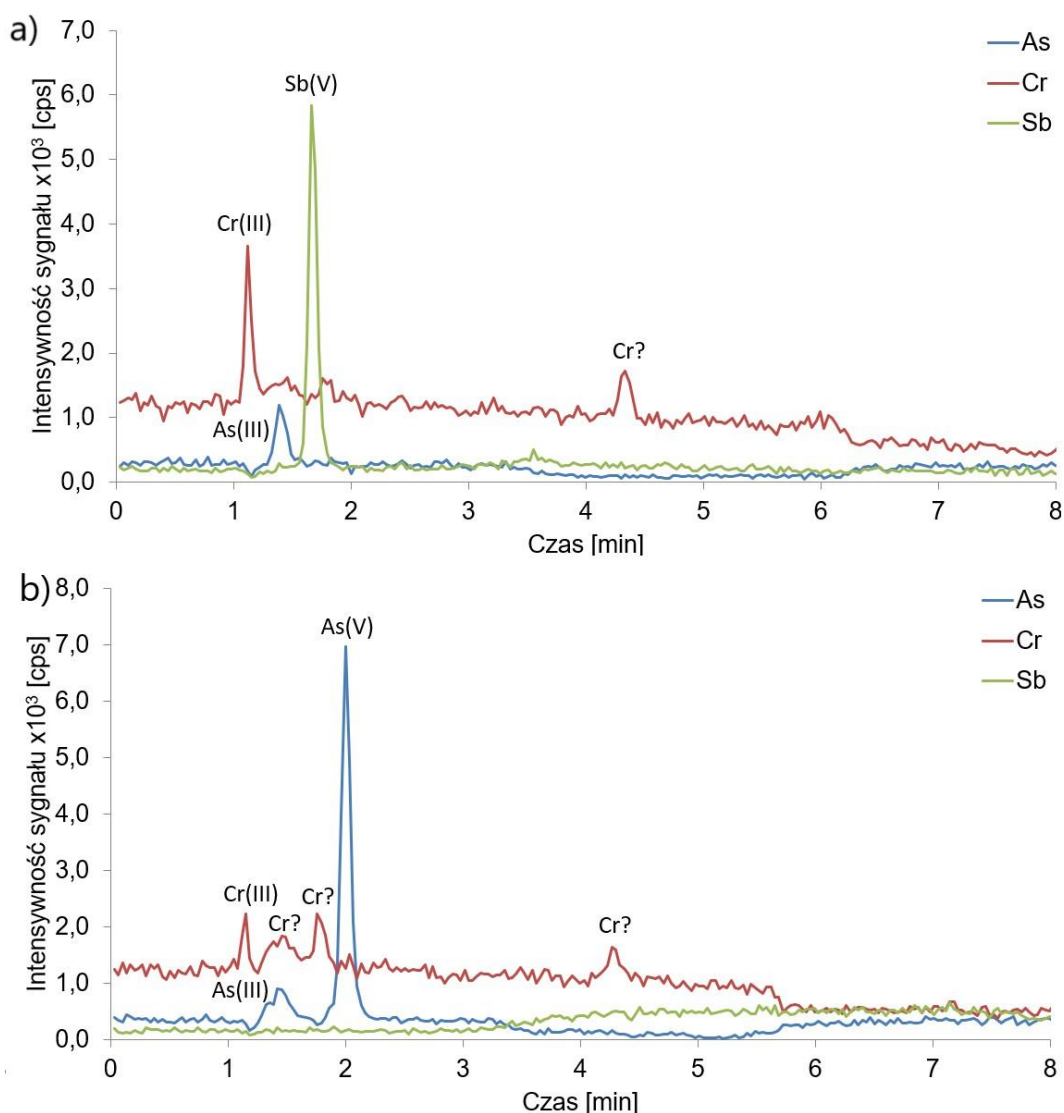
Tabela 21. Zestawienie wyników oznaczania pięciu toksycznych form specyjalnych w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych.

Próbka	Stężenie (c±U, k=2) [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]						
	As(III)	As(V)	Sb(III)	Sb(V)	Cr(VI)	Cr(III)***	Cr?***
A.1*	-	-	-	0,201±0,012	-	-	-
A.2	0,327±0,031	-	-	0,524±0,032	-	+	+
B.1*	-	0,175±0,016	-	0,234±0,014	-	-	-
B.2*	-	0,574±0,053	-	0,300±0,019	-	-	-
B.3	0,194±0,018	0,701±0,064	-	-	-	+	+
B.4	0,310±0,029	0,570±0,052	-	-	-	+	+
B.5	0,400±0,038	0,650±0,060	-	-	-	+	+
B.6	0,269±0,025	0,460±0,042	-	-	-	+	+
B.7	0,284±0,027	0,326±0,030	-	-	-	+	+
B.8	0,297±0,028	0,340±0,031	-	-	-	+	+
B.9	0,283±0,027	0,327±0,030	-	-	-	+	+
B.10	0,279±0,026	0,140±0,013	-	-	-	+	+
B.11	0,233±0,022	0,0501±0,0046**	-	-	-	+	+
B.12	0,133±0,012	0,453±0,042	-	-	-	+	+
B.13	0,175±0,016	0,654±0,060	-	-	-	+	+
C.1	0,332±0,031	0,0708±0,0065	-	-	-	-	-
C.2	0,166±0,016	-	-	-	-	+	+
D.1	0,397±0,037	2,72±0,25	-	-	-	+	+
D.2	0,414±0,039	3,26±0,30	-	-	-	+	+
D.3	0,342±0,032	2,41±0,22	-	-	-	+	+
E.1*	-	0,049±0,0046**	-	0,1046±0,0065	-	-	+
E.2	-	-	-	-	-	+	+
E.3*	-	-	-	0,1512±0,0094	-	-	-
E.4	0,331±0,031	0,0293±0,0027**	-	-	-	-	-
E.5	-	-	-	-	-	+	+
F.1	0,380±0,036	0,994±0,091	-	-	-	-	-
F.2	0,333±0,031	0,824±0,076	-	-	-	-	-
G.1*	-	0,991±0,091	-	0,433±0,027	-	-	-
G.2	0,0109±0,0010*	1,23±0,11	-	-	-	-	-
G.3	0,0342±0,0032*	1,041±0,096	-	-	-	-	-
G.4*	-	0,900±0,083	-	0,0362±0,0022**	-	-	-
G.5	0,286±0,027	1,68±0,15	-	-	-	+	+
G.6	0,241±0,023	1,51±0,14	-	-	-	+	+
H.1	0,259±0,024	0,117±0,011	-	-	-	+	+
H.2	0,343±0,032	0,168±0,015	-	-	-	+	+
H.3	0,204±0,019	-	-	-	-	+	+
I.1*	0,175±0,016	0,310±0,029	-	0,1240±0,0077	-	-	-
I.2	0,490±0,046	0,165±0,015	-	-	-	+	+
I.3	0,158±0,015	0,370±0,034	-	-	-	-	-
I.4	0,580±0,055	0,620±0,057	-	-	-	+	+
J.1	-	-	-	-	-	+	+
J.2	0,0300±0,0028*	0,110±0,010	-	-	-	-	-
K.1	0,370±0,035	0,169±0,016	-	-	-	-	-
K.2	0,400±0,038	0,120±0,011	-	-	-	+	+
K.3	0,390±0,037	0,0800±0,0074	-	-	-	+	+
L.1	0,170±0,016	-	-	-	-	-	-
L.2	0,310±0,029	-	-	-	-	-	-
L.3	-	-	-	-	-	-	-
L.4	0,250±0,024	-	-	-	-	-	-
L.5	0,390±0,037	0,0600±0,0055	-	-	-	-	-

\*- Próbkę wód mineralnych (próbki referencyjne dla odpowiadającej im marki wód smakowych i funkcjonalnych),\*\* - Wyniki poniżej wartości LOD,\*\*\* - +/-, wykryto/nie wykryto

Spośród dwóch oznaczanych form specjacyjnych arsenu, As(V) był dominującą formą w przypadku butelkowanych wód smakowych. W przypadku butelkowanych wód funkcjonalnych z kolei dominującą formą był As(III). Zakres stężeń As(III) oznaczonych we wszystkich badanych próbkach wahał się między  $(0,133 \pm 0,012) \mu\text{g L}^{-1}$  oraz  $(0,580 \pm 0,055) \mu\text{g L}^{-1}$ . Średnie stężenia As(III) oznaczone w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych były równe odpowiednio:  $0,292 \mu\text{g L}^{-1}$  oraz  $0,349 \mu\text{g L}^{-1}$ . Zakres stężeń As(V) oznaczonych we wszystkich badanych próbkach wahał się między  $(0,0600 \pm 0,0055) \mu\text{g L}^{-1}$  oraz  $(3,26 \pm 0,30) \mu\text{g L}^{-1}$ . Średnie stężenia As(V) oznaczone w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych były równe odpowiednio:  $0,904 \mu\text{g L}^{-1}$  oraz  $0,218 \mu\text{g L}^{-1}$ . W przypadku antymonu spośród dwóch badanych form specjacyjnych: Sb(III) oraz Sb(V) oznaczono tylko jedną z tych form: Sb(V). Ponadto, Sb(V) oznaczono powyżej wartości LOD tylko w jednej z badanych próbek (A.2). Stężenie Sb(V) oznaczone we wspomnianej próbce było równe  $(0,524 \pm 0,032) \mu\text{g L}^{-1}$ . Cr(VI) nie oznaczono w żadnej spośród badanych próbek jednak w części spośród badanych butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych zarejestrowano dodatkowe sygnały chromatograficzne dla chromu. Jeden z zarejestrowanych sygnałów chromatograficznych zidentyfikowano jako Cr(III) (obecność sygnału dla Cr(III) oznaczono znakiem „+” w tabeli 21, w kolumnie oznaczonej jako „Cr(III)”). Pozostałe zarejestrowane sygnały nie zostały zidentyfikowane (obecność tych sygnałów oznaczono znakiem „+” w tabeli 21, w kolumnie oznaczonej jako „Cr?”). Przykładowe chromatogramy uzyskane przy zastosowaniu procedury oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych przedstawiono na rysunku 8.





Rysunek 8. Chromatogramy uzyskane przy zastosowaniu procedury oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych dla próbek a) A.2 i b) D.2.

*Analiza specjacyjna arsenu: AsB, As(III), DMA, MMA i As(V).*

Zestawienie wyników analizy specjacyjnej arsenu w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych (wraz z wynikami dla 8 badanych wód mineralnych) przedstawiono w tabeli 22.

Tabela 22. Zestawienie wyników analizy specjacyjnej arsenu w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych.

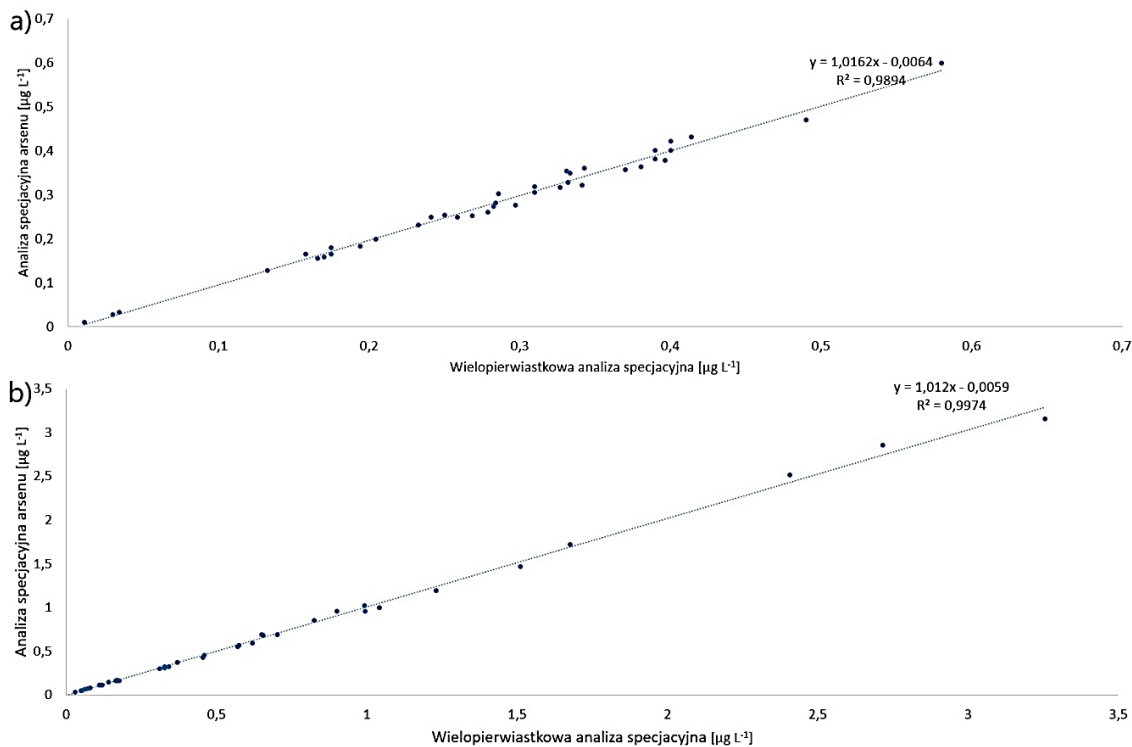
Próbka	Stężenie (c±U, k=2) [µg L <sup>-1</sup> ]				
	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)
A.1*	-	-	-	-	-
A.2	-	0,317±0,031	-	-	-
B.1*	-	-	-	-	0,165±0,012
B.2*	-	-	-	-	0,565±0,042
B.3	-	0,183±0,018	-	-	0,688±0,051
B.4	-	0,306±0,030	-	-	0,555±0,041

B.5	-	0,421±0,042	-	-	0,690±0,051
B.6	-	0,252±0,025	-	-	0,451±0,033
B.7	-	0,281±0,028	-	-	0,311±0,023
B.8	0,194±0,019	0,276±0,027	-	-	0,328±0,024
B.9	-	0,274±0,027	-	-	0,322±0,024
B.10	-	0,260±0,025	-	-	0,148±0,011
B.11	-	0,231±0,023	-	-	0,0449±0,0033**
B.12	0,849±0,083	0,129±0,013	-	-	0,434±0,032
B.13	-	0,164±0,016	-	-	0,679±0,050
C.1	-	0,329±0,033	-	-	0,0714±0,0053**
C.2	0,230±0,023	0,155±0,015	-	-	-
D.1	-	0,379±0,038	-	-	2,86±0,21
D.2	0,554±0,054	0,432±0,043	-	-	3,16±0,23
D.3	0,247±0,024	0,321±0,032	-	-	2,52±0,19
E.1*	-	-	-	-	0,0510±0,0038**
E.2	0,381±0,037	-	-	-	-
E.3*	0,183±0,018	-	-	-	-
E.4	0,298±0,029	0,354±0,035	-	-	0,0293±0,0022**
E.5	-	-	-	-	-
F.1	0,212±0,021	0,364±0,036	-	-	0,955±0,071
F.2	-	0,350±0,035	-	-	0,851±0,063
G.1*	-	-	-	-	1,023±0,076
G.2	0,358±0,035	0,0102±0,0010**	-	-	1,191±0,088
G.3	0,0442±0,0043**	0,0327±0,0032**	-	-	1,000±0,074
G.4*	-	-	-	-	0,957±0,071
G.5	0,0541±0,0053	0,302±0,030	-	-	1,72±0,13
G.6	0,0546±0,0054	0,249±0,025	-	-	1,47±0,11
H.1	-	0,249±0,025	-	-	0,1103±0,0082
H.2	-	0,360±0,036	-	-	0,164±0,012
H.3	-	0,199±0,020	-	-	-
I.1*	-	0,180±0,018	-	-	0,299±0,022
I.2	0,350±0,034	0,471±0,047	-	-	0,161±0,012
I.3	0,00506±0,00050**	0,166±0,016	-	-	0,372±0,027
I.4	-	0,600±0,059	-	-	0,594±0,044
J.1	-	-	-	-	-
J.2	-	0,0280±0,0028**	-	-	0,1123±0,0083
K.1	-	0,357±0,035	-	-	0,173±0,013
K.2	0,0804±0,0079	0,401±0,04	-	-	0,1145±0,0085
K.3	-	0,381±0,038	-	-	0,0798±0,0059**
L.1	0,200±0,020	0,159±0,016	-	-	-
L.2	-	0,319±0,032	-	-	-
L.3	-	-	-	-	-
L.4	0,0151±0,0015**	0,254±0,025	-	-	-
L.5	0,174±0,017	0,401±0,040	-	-	0,0612±0,0045**

\* - Próbkę wód mineralnych (próbki referencyjne dla odpowiadającej im marki wód smakowych i funkcjonalnych), \*\* - Wyniki poniżej wartości LOD, \*\*\* - +/-, wykryto/nie wykryto

Wyniki uzyskane przy zastosowaniu procedury analizy specyjnej arsenu potwierdziły wyniki uzyskane wcześniej dla As(III) i As(V). Zgodność wyników dla dwóch wymienionych form

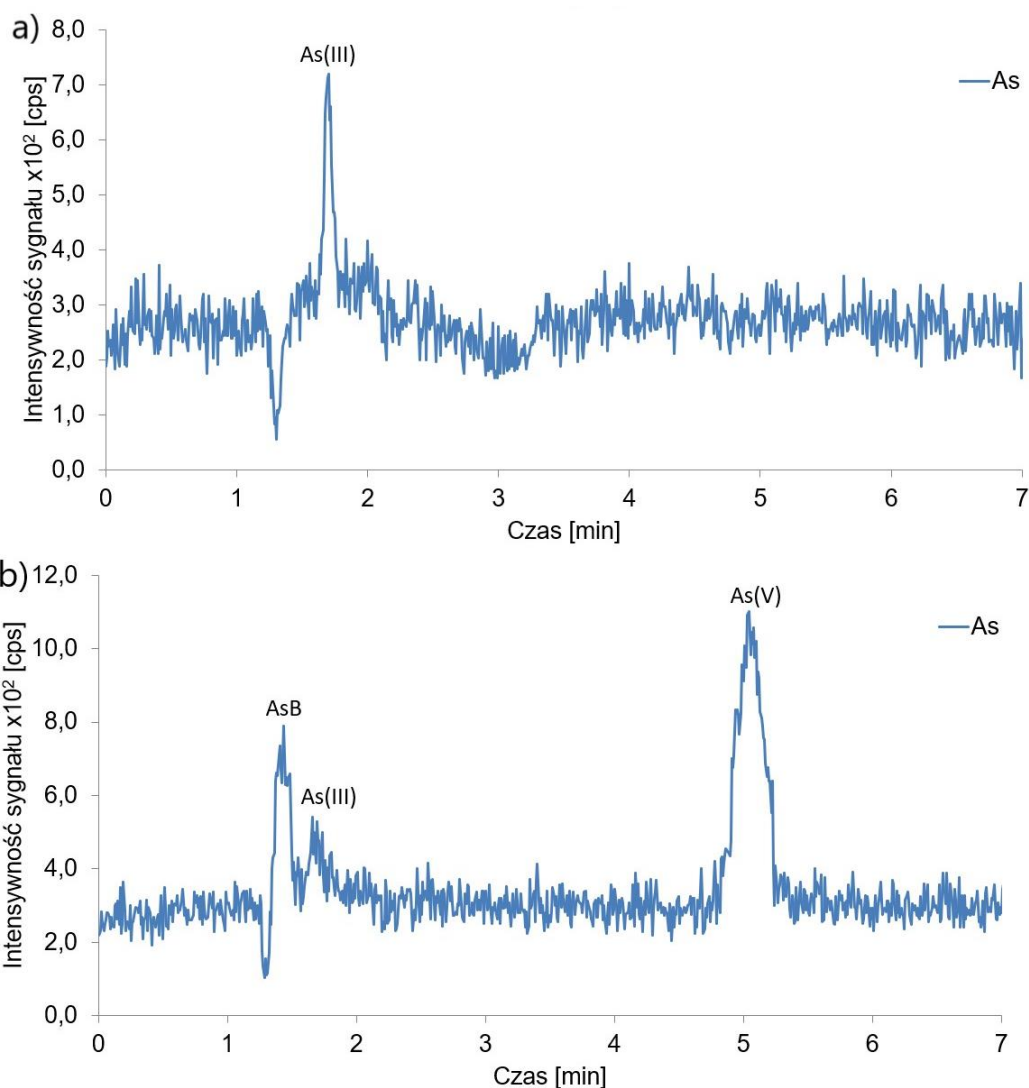
specyficjnych arsenu między dwoma zastosowanymi procedurami analitycznymi potwierdzono przy zastosowaniu testu t-Studenta oraz wykreślając wykresy korelacji dla każdej z badanych próbek. Wyniki uzyskane dla testu t-Studenta potwierdziły dobrą zgodność wyników stężeń As(III) oraz As(V) oznaczonych za pomocą dwóch procedur. Wykres korelacji dla As(III) oraz As(V) przedstawiono na rysunku 9.



Rysunek 9. Wykresy korelacji dla As(III) i As(V).

Wartości współczynnika determinacji dla As(III) i As(V) były równe odpowiednio 0,9894 oraz 0,9974. Wartości te oraz wizualna ocena przebiegu wykresów korelacji potwierdzają zbieżność wyników uzyskanych za pomocą dwóch procedur analitycznych. Jednocześnie zbieżność wyników pozwala na zapewnienie spójności pomiarowej wyników pomiarów.

Spośród pozostałych form specyficjnych arsenu: AsB, DMA oraz MMA w próbkach butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych oznaczona została tylko jedna z tych form: AsB. DMA oraz MMA nie oznaczono w żadnej z badanych próbek. Zakres stężeń AsB oznaczonych we wszystkich badanych próbkach wahał się między  $(0,0541 \pm 0,0053) \mu\text{g L}^{-1}$  oraz  $(0,849 \pm 0,083) \mu\text{g L}^{-1}$ . Średnie stężenia AsB oznaczone w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych były równe odpowiednio:  $0,312 \mu\text{g L}^{-1}$  oraz  $0,164 \mu\text{g L}^{-1}$ . Zarówno w przypadku tAs, tCr oraz tSb jak i oznaczanych form specyficjnych As, Cr i Sb nie zaobserwowano widocznych trendów oznaczonych zawartości wyżej wymienionych pierwiastków oraz ich form specyficjnych a składem badanych próbek. Wyniki uzyskane przy zastosowaniu procedur analizy specyficjnej As, Cr i Sb w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych znajdują potwierdzenie w danych literaturowych. Zarówno w kontekście oznaczonych stężeń toksycznych form specyficjnych badanych pierwiastków jak i rozmieszczenia tych form specyficjnych [16,25,30,144–148]. Przykładowe chromatogramy uzyskane przy zastosowaniu procedury analizy specyficjnej arsenu przedstawiono na rysunku 10.



Rysunek 10. Chromatogramy uzyskane przy zastosowaniu procedury analizy specjacyjnej arsenu dla próbek c) A.2 i d) D.2.

### *Oszacowanie bilansu analizy specjacyjnej/zawartości całkowitej As, Cr i Sb w badanych próbkach.*

Na podstawie wyników uzyskanych podczas oznaczania zawartości całkowitych As, Cr i Sb przedstawionych w tabeli 20 oraz sumy stężeń form specjacyjnych poszczególnych oznaczanych pierwiastków: As, Cr i Sb przedstawionych w tabelach 21 oraz 22 oszacowano bilans analizy specjacyjnej/zawartości całkowitej dla każdego pierwiastka zgodnie z równaniem (10). Ponieważ w przypadku badanych próbek nie prowadzono ekstrakcji wartość związaną z zawartością niewyekstrahowanych form specjacyjnych przyjęto jako 0. W prowadzonych badaniach przyjęto założenia, że z kolumny chromatograficznej wymywały się wszystkie obecne w badanych próbkach formy specjacyjne. Wartość parametru związanego ze stężeniem form specjacyjnych niewymytych z kolumny przyjęto jako 0. W przypadku Sb i Cr bilans analizy specjacyjnej/zawartości całkowitej szacowano na podstawie stężeń oznaczonych odpowiednio dla Sb(V) i Cr(VI). Formy specjacyjne arsenu: As(III) i As(V) oznaczane były w obu procedurach analitycznych, do oszacowania bilansu analizy specjacyjnej/zawartości całkowitej arsenu w badanych próbkach wykorzystano wyniki uzyskane dla tych form specjacyjnych w procedurze

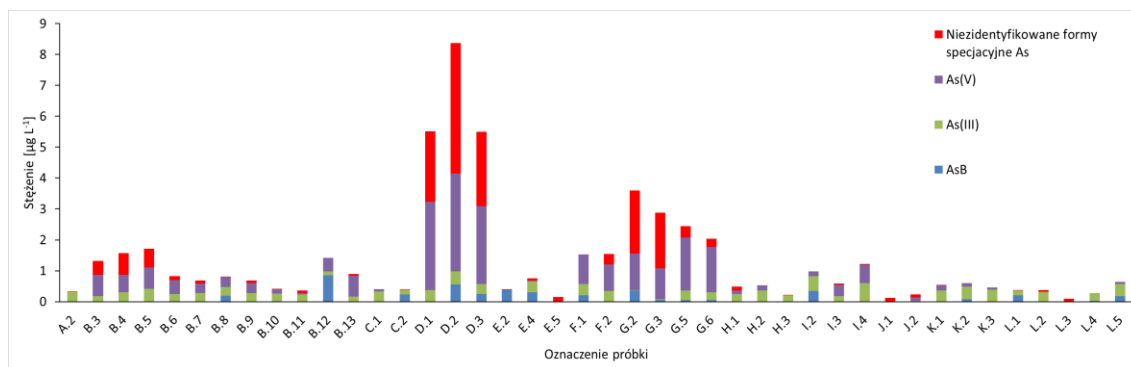
analizy specjacyjnej arsenu. Ponadto w szacowaniu bilansu analizy specjacyjnej/zawartości całkowitej arsenu uwzględniono także stężenia oznaczone dla AsB. Zestawienie wyników bilansu analizy specjacyjnej/zawartości całkowitej As, Cr i Sb w badanych próbkach przedstawiono w tabeli 23.

Tabela 23. Wyniki bilansu analizy specjacyjnej/zawartości całkowitej As, Cr i Sb w badanych.

Próbka	uAs [%]tAs	uSb [%]tSb	uCr* [%]tCr	Suma As(III) i As(V) [%]tAs
A.2	0,4	-4,2	100,0	102,7
B.3	34,0	100,0	100,0	67,8
B.4	45,3	100,0	100,0	55,9
B.5	35,1	100,0	100,0	61,3
B.6	14,8	100,0	100,0	88,3
B.7	13,1	100,0	100,0	89,5
B.8	1,4	100,0	100,0	78,7
B.9	13,4	100,0	100,0	88,5
B.10	2,0	100,0	100,0	100,7
B.11	22,0	100,0	100,0	78,7
B.12	-2,3	100,0	100,0	42,5
B.13	5,8	100,0	100,0	92,6
C.1	-9,8	100,0	100,0	110,6
C.2	5,0	100,0	100,0	41,0
D.1	41,3	100,0	100,0	56,4
D.2	50,4	100,0	100,0	43,9
D.3	43,8	100,0	100,0	50,0
E.2	1,3	100,0	100,0	0,0
E.4	9,6	100,0	100,0	47,8
E.5	100,0	100,0	100,0	0,0
F.1	-1,8	100,0	100,0	91,4
F.2	21,8	100,0	100,0	75,4
G.2	56,7	100,0	100,0	34,5
G.3	62,5	100,0	100,0	37,4
G.5	15,1	100,0	100,0	80,2
G.6	13,0	100,0	100,0	85,9
H.1	25,2	100,0	100,0	78,3
H.2	-0,8	100,0	100,0	98,3
H.3	10,1	100,0	100,0	92,5
I.2	-6,6	100,0	100,0	71,0
I.3	7,2	100,0	100,0	90,4
I.4	2,1	100,0	100,0	98,3
J.1	100,0	100,0	100,0	0,0
J.2	41,5	100,0	100,0	58,4
K.1	2,9	100,0	100,0	98,7
K.2	-3,1	100,0	100,0	90,0
K.3	-3,7	100,0	100,0	105,7
L.1	4,6	100,0	100,0	45,2
L.2	15,5	100,0	100,0	82,2
L.3	100,0	100,0	100,0	0,0
L.4	-1,9	100,0	100,0	94,6
L.5	-7,1	100,0	100,0	75,7

\*-W wartości uCr [%] zawarta jest także zawartość wykrytej, ale nie oznaczonej ilościowo formy specjacyjnej Cr(III).

W odniesieniu do antymonu, w jedynej próbce, w której oznaczono Sb(V) zawartość tej formy specyficjnej odpowiadała całości oznaczonego tSb. W pozostałych próbkach cała zawartość tSb odpowiadała niezidentyfikowanym formom specyficjnym antymonu. Na oznaczony w badanych próbkach chrom całkowity składał się zarówno nietoksyczny Cr(III) ale także inne, niezidentyfikowane formy specyficjne chromu. Dla około połowy spośród badanych próbek zawartość toksycznych form specyficjnych arsenu, As(III) oraz As(V), była równo około 80% zawartości tAs, na pozostałe 20% składała się AsB oraz inne, nieznanne formy specyficjne As. W przypadku pozostałych próbek zawartość toksycznych form specyficjnych arsenu była równa od około 34% do około 75% zawartości tAs. Wyniki bilansu analizy specyficjnej/zawartości całkowitej arsenu w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych przedstawiono na rysunku 11.



Rysunek 11. Wyniki bilansu analizy specyficjnej/zawartości całkowitej arsenu w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych.

### Poszukiwanie kompleksów organicznych As, Cr i Sb.

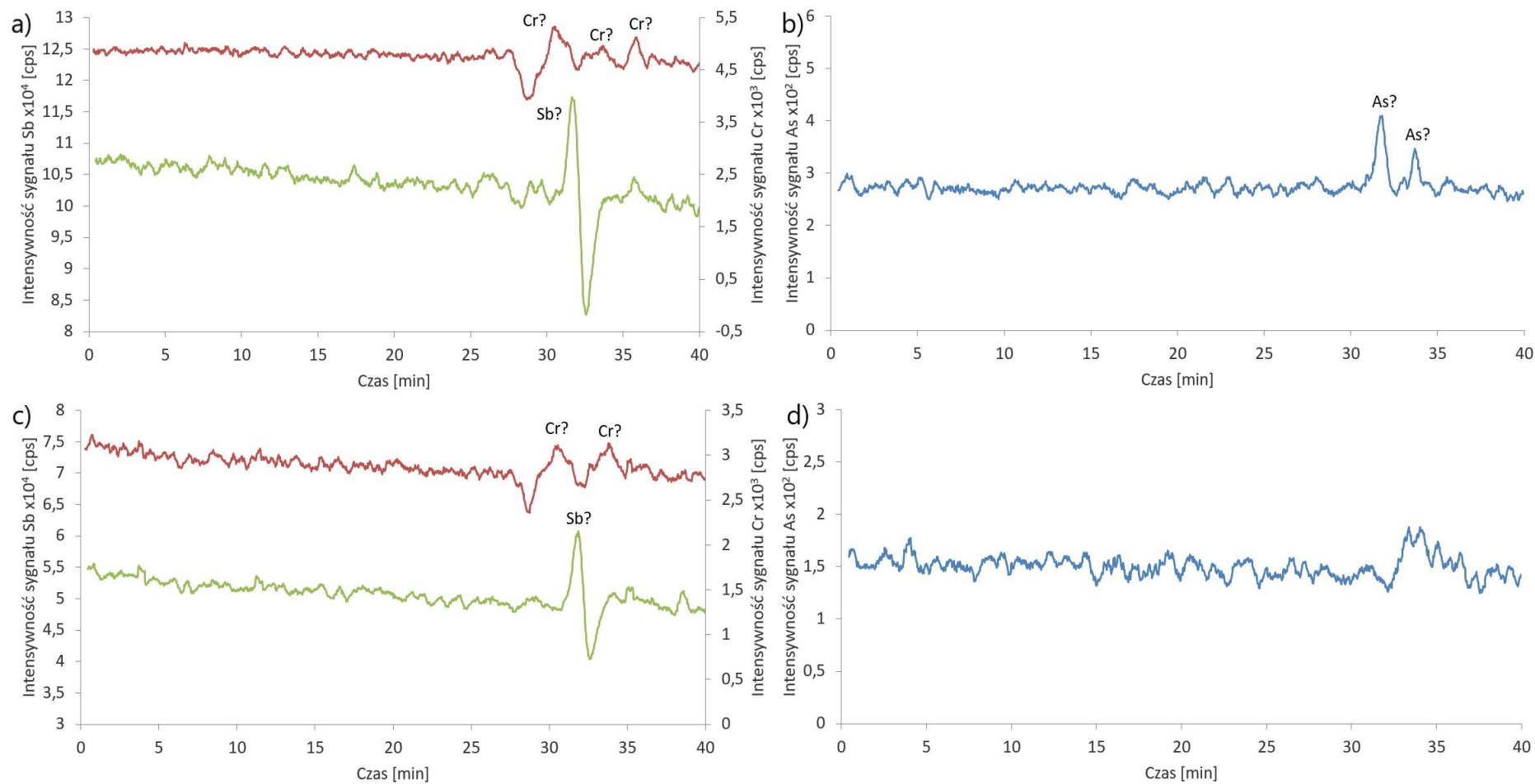
Wyniki uzyskane w ramach poszukiwania kompleksów organicznych As, Cr i Sb przedstawiono w tabeli 24. Na bazie wyników szacowania bilansu analizy specyficjnej/zawartości całkowitej As, Cr i Sb w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych wytypowano 16 próbek, dla których zaobserwowano znaczne różnice między oznaczoną zawartości tAs, tCr i tSb oraz wynikami oznaczania pięciu toksycznych form specyficjnych i analizy specyficjnej arsenu. Próbki te wymieniono w tabeli 24.

Tabela 24. Zestawienie wyników uzyskanych metodą SEC/ICP-DRC-MS dla butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych.

Próbka	(Liczba zarejestrowanych sygnałów analitycznych)		
	As	Cr	Sb
B.3	Nd.	(1) RT <sub>1</sub> = 31,5 min.	(1) RT <sub>1</sub> = 31,5 min.
B.4	(1) RT <sub>1</sub> = 34 min.	(2) RT <sub>1</sub> = 30,5 min. RT <sub>2</sub> = 33,5 min.	(1) RT <sub>1</sub> = 31,5 min.
B.5	(1) RT <sub>1</sub> = 34 min.	(3) RT <sub>1</sub> = 30,5 min. RT <sub>2</sub> = 34 min. RT <sub>3</sub> = 36 min.	(1) RT <sub>1</sub> = 31,5 min.
B.12	(1) RT <sub>1</sub> = 33,8 min.	(1) RT <sub>1</sub> = 30,5 min.	(1) RT <sub>1</sub> = 31,5 min.

C.1	Nd.	(2) RT <sub>1</sub> = 30,5 min. RT <sub>2</sub> = 34 min.	(1) RT <sub>1</sub> = 31,5 min.
D.1	(2) RT <sub>1</sub> = 31,5 min. RT <sub>2</sub> = 33 min.	Nd.	(1) RT <sub>1</sub> = 31,5 min.
D.2	(1) RT <sub>1</sub> =32 min	Nd.	(1) RT <sub>1</sub> = 31,5 min
D.3	(1) RT <sub>1</sub> =32 min	Nd.	(1) RT <sub>1</sub> = 31,5 min
F.1	Nd.	(3) RT <sub>1</sub> = 30,5 min. RT <sub>2</sub> = 34 min. RT <sub>3</sub> = 36 min.	(1) RT <sub>1</sub> = 31,5 min.
F.2	Nd.	(3) RT <sub>1</sub> = 30,5 min. RT <sub>2</sub> = 34 min. RT <sub>3</sub> = 36 min.	(1) RT <sub>1</sub> = 31,5 min.
G.2	(2) RT <sub>1</sub> = 31 min. RT <sub>2</sub> = 33 min.	(3) RT <sub>1</sub> = 30,5 min. RT <sub>2</sub> = 34 min. RT <sub>3</sub> = 36 min.	(1) RT <sub>1</sub> = 31,5 min.
G.3	(1) RT <sub>1</sub> =31 min	(3) RT <sub>1</sub> = 30,5 min. RT <sub>2</sub> = 34 min. RT <sub>3</sub> = 36 min.	(1) RT <sub>1</sub> = 31,5 min.
G.5	(2) RT <sub>1</sub> = 32 min. RT <sub>2</sub> = 34 min.	(3) RT <sub>1</sub> = 30,5 min. RT <sub>2</sub> = 34 min. RT <sub>3</sub> = 36 min.	(1) RT <sub>1</sub> = 31 min.
G.6	(1) RT <sub>1</sub> = 31,5 min.	(1) RT <sub>1</sub> = 30,5 min.	(1) RT <sub>1</sub> = 31 min.
I.4	(1) RT <sub>1</sub> = 33 min.	(1) RT <sub>1</sub> = 30,5 min.	(1) RT <sub>1</sub> = 31 min.
K.2	(1) RT <sub>1</sub> =31 min	(2) RT <sub>1</sub> = 30,5 min. RT <sub>2</sub> = 36 min.	(1) RT <sub>1</sub> =31 min

Wytypowane próbki poddano analizie metodą SEC/ICP-DRC-MS a uzyskane wyniki porównano z wzorcami pod kątem zarejestrowanych czasów retencji. W przypadku arsenu zarejestrowano od jednego do maksymalnie dwóch sygnałów analitycznych w przedziale między 30 a 40 minutą analizy. Dla antymonu maksymalnie jeden sygnał analityczny został zarejestrowany w przedziale między 30 a 35 minutą analizy. W przypadku chromu od jednego do maksymalnie trzech sygnałów analitycznych zostało zarejestrowane w przedziale między 30 a 40 minutą analizy. Przykładowe chromatogramy uzyskane przy zastosowaniu techniki sprzężonej SEC/ICP-DRC-MS przedstawiono na rysunku 12.



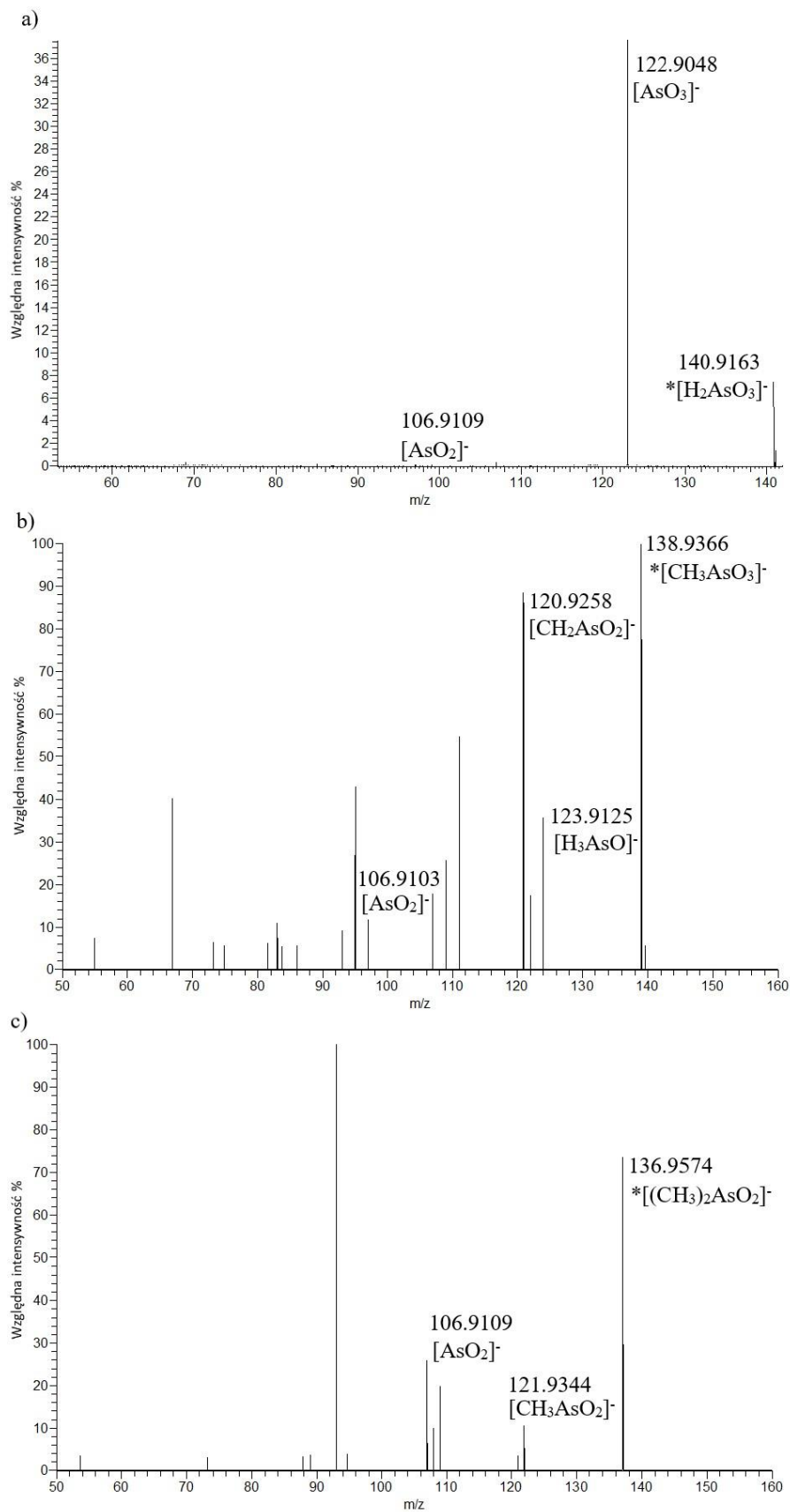
Rysunek 12. Przykładowe chromatogramy uzyskane przy zastosowaniu techniki sprzężonej SEC/ICP-DRC-MS dla próbek a, b) G.5 oraz c, d) C1.



Potwierdzone zostało, że różne czynniki chemiczne takie jak dodatek kwasu cytrynowego lub zawartość rozpuszczonych soli w wodzie, mogą wpływać nie tylko na ilość wmywanego z opakowania pierwiastka chemicznego, ale także na to w jakiej formie ten pierwiastek będzie obecny w wodzie. Wśród badanych metodą SEC/ICP-DRC-MS próbek znajdowały się tylko próbki butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych, do badań tych nie wytypowano żadnej z 8 badanych wód mineralnych tych samych marek co badane wody smakowe i funkcjonalne. W literaturze można znaleźć informacje o kompleksowaniu antymonu przez kwas cytrynowy obecny w próbkach o podobnym składzie do badanych wód butelkowanych [25,84,137]. Wyniki uzyskane za pomocą techniki sprzężonej SEC/ICP-DRC-MS sugerują obecność organicznych połączeń As, Cr i Sb.

#### *Identyfikacja organicznych kompleksów As, Cr i Sb.*

Wszystkie próbki dla których zarejestrowano przynajmniej jeden sygnał analityczny za pomocą techniki sprzężonej SEC/ICP-DRC-MS zostały poddane identyfikacji organicznych kompleksów As, Cr i Sb za pomocą spektrometrii cząsteczkowej. Badane próbki poddano analizie za pomocą techniki ESI-MS/MS. Ze względu na niskie stężenia As, Cr oraz Sb w badanych próbkach oraz bogatą matrycę butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych nie udało się potwierdzić obecności nieznanymi formami specyficznymi arsenu. Mimo zarejestrowania widm fragmentacji sugerujących obecność organicznych kompleksów arsenu w badanych próbkach, nie udało się uzyskać satysfakcjonujących wartości delty ppm pozwalających na potwierdzenie obecności tych kompleksów w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych. W literaturze znaleźć można doniesienia o kompleksowaniu antymonu przez kwas cytrynowy w napojach bezalkoholowych [25,84]. W trakcie eksperymentów opisanych w niniejszej pracy doktorskiej nie zarejestrowano jednak sygnałów dla podobnych kompleksów. Mimo obecności zarówno antymonu jak i kwasu cytrynowego w badanych próbkach. Badaniom przy zastosowaniu techniki ESI-MS/MS poddano także roztwory wzorcowe As(III), As(V), DMA oraz MMA. W przypadku As(III) nie zarejestrowano widma fragmentacji, dla pozostałych trzech form specyficznymi: As(V), DMA oraz MMA zarejestrowano widma fragmentacji, które przedstawiono na rysunku 13.



Rysunek 13. Widma fragmentacji zarejestrowane dla roztworów wzorcowych a) As(V), b) MMA, c) DMA. Gwiazdką zaznaczono jon molekularny.

Uzyskane widma fragmentacji pozwoliły na potwierdzenie obecności AsB oraz As(V) w badanych próbkach. Na podstawie jonów fragmentacyjnych zarejestrowanych podczas analizy wzorców AsB, MMA i DMA interpretowano widma fragmentacyjne próbek butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych.

*Porównanie wyników oznaczania tAs, tCr i tSb oraz oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych i analizy specjacyjnej arsenu w butelkowanych wodach smakowych, funkcjonalnych oraz mineralnych.*

W poprzednim rozdziale rozprawy doktorskiej opisane zostały wyniki oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych As(III), As(V), Cr(VI), Sb(III) oraz Sb(V) w butelkowanych wodach mineralnych [30]. W niniejszej części rozprawy doktorskiej przygotowano porównanie uzyskanych wyników z wynikami oznaczania tAs, tCr i tSb oraz oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych i analizy specjacyjnej arsenu w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych. Zestawienie uzyskanych wyników dla procedur oznaczania tAs, tCr i tSb oraz oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych i analizy specjacyjnej arsenu we wszystkich typach wód butelkowanych przedstawiono w tabeli 25. W zestawieniu zebrano parametry statystyczne takie jak: minimalne (min.) oraz maksymalne (maks.) stężenie, średnią i medianę, pierwszy (Q1) oraz trzeci (Q3) kwartył a także rozstęp (R) i współczynnik zmienności (CV) dla stężeń wszystkich oznaczonych analitów.

Tabela 25. Zestawienie wyników oznaczania tAs, tCr i tSb oraz oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych i analizy specjacyjnej arsenu w butelkowanych wodach smakowanych, funkcjonalnych i mineralnych.

Parametr statystyczny	Butelkowane wody smakowe			Butelkowane wody funkcjonalne			Butelkowane wody mineralne		
	<b>Oznaczenie zawartości całkowitych As, Cr, Sb</b>								
	tAs	tCr	tSb	tAs	tCr	tSb	tAs**	tCr**	tSb**
Min. [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,1496±0,00 90	0,0740±0,06 6	0,0797±0,00 26	0,0922±0,00 67	0,0474±0,0014	0,1976±0,00 83	0,0680±0,00 90	0,098±0,00 32	0,0692±0,00 41
Maks. [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	8,37±0,52	1,252±0,097	1,145±0,019	1,22±0,023	1,310±0,045	0,6125±0,00 66	4,23±0,48	2,222±0,08 4	0,721±0,043
Średnia [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	1,606	0,395	0,372	0,485	0,511	0,392	1,152	0,498	0,308
Mediana [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,817	0,380	0,275	0,411	0,514	0,431	0,930	0,234	0,315
Q1 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,432	0,193	0,222	0,258	0,202	0,298	0,493	0,164	0,178
Q3 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	1,678	0,465	0,443	0,587	0,690	0,469	1,250	0,389	0,403
R [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	8,22	1,18	1,07	1,13	1,26	0,41	4,17	2,12	0,65
CV [%]	117	65	66	67,5	76	32	84	127	51
	<b>Oznaczenie pięciu toksycznych form specjacyjnych</b>								
	As(III)	As(V)	Sb(V)	As(III)	As(V)	As(III)	As(V)	Cr(VI)	Sb(V)
Min. [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,133±0,012	0,0708±0,00 65	0,524±0,032 *	0,158±0,015	0,0600±0,0055	0,071±0,005	0,0680±0,00 90	0,098±0,00 32	0,071±0,005
Maks. [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,414±0,039	3,26±0,30	0,524±0,032 *	0,580±0,055	0,620±0,057	2,72±0,22	3,76±0,47	2,222±0,08 4	2,72±0,22
Średnia [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,292	0,904	0,524±0,032 *	0,349	0,218	0,391	0,879	0,498	0,391
Mediana [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,291	0,650	0,524±0,032 *	0,390	0,120	0,177	0,634	0,234	0,177
Q1 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,245	0,326	-	0,250	0,095	0,093	0,428	0,164	0,093
Q3 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,339	1,136	-	0,400	0,267	0,428	1,110	0,389	0,428
R [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,28	3,19	-	0,42	0,56	2,65	3,69	2,12	2,65
CV [%]	26	97	-	40	94	147	82	127	147

Analiza specyacyjna arsenu						
	AsB	As(III)	As(V)	AsB	As(III)	As(V)
Min. [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,0541±0,00	0,129±0,013	0,1103±0,00	0,0151±0,01	0,159±0,01	0,1123±0,00
Maks. [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,849±0,083	0,432±0,043	3,16±0,23	0,350±0,034	0,600±0,05	0,594±0,044
Średnia [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,312	0,288	0,945	0,164	0,350	0,271
Mediana [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,247	0,292	0,683	0,174	0,381	0,161
Q1 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,203	0,249	0,324	0,080	0,254	0,115
Q3 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,370	0,353	1,143	0,200	0,401	0,372
R [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,79	0,30	3,05	0,27	0,44	0,48
CV [%]	73	28	94	78	41	77,5

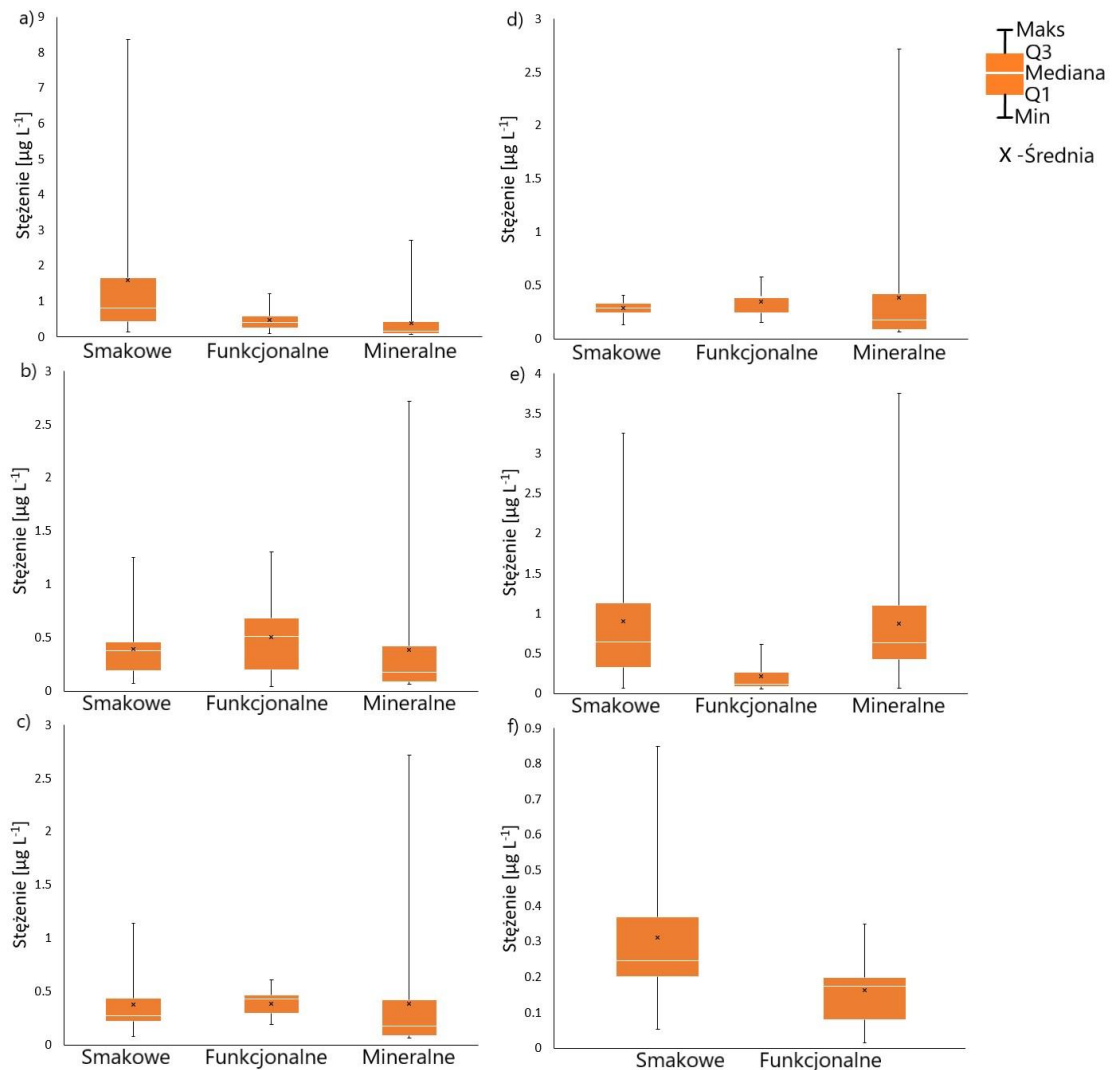
\* Sb(V) oznaczono tylko w jednej próbce butelkowanej wody smakowej.

\*\* Zawartości tAs, tCr oraz tSb w butelkowanych wodach mineralnych zostały oszacowane na podstawie wyników dla pięciu toksycznych form specyacyjnych As(III), As(V), Cr(VI), Sb(III) oraz Sb(V). tAs – suma As(III) i As(V), tSb – zawartość równa stężeniu Sb(V), tCr – zawartość równa stężeniu Cr(VI).

Dla butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych zawartości tAs, tCr oraz tSb zostały oznaczone bezpośrednio, w przypadku butelkowanych wód mineralnych oznaczenie takie nie zostało wykonane. Zawartości tAs, tCr oraz tSb w butelkowanych wodach mineralnych zostały oszacowane na podstawie wyników dla pięciu toksycznych form specjacyjnych As(III), As(V), Cr(VI), Sb(III) oraz Sb(V). Średnie stężenia tAs oznaczone w butelkowanych wodach smakowych, funkcjonalnych i mineralnych wynosiły odpowiednio:  $1,606 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,485 \mu\text{g L}^{-1}$  oraz  $1,152 \mu\text{g L}^{-1}$ . W przypadku chromu oznaczone w butelkowanych wodach smakowych, funkcjonalnych i mineralnych stężenia tCr wynosiły odpowiednio:  $0,395 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,511 \mu\text{g L}^{-1}$  oraz  $0,498 \mu\text{g L}^{-1}$ . W odniesieniu do tSb stężenia oznaczone w butelkowanych wodach smakowych, funkcjonalnych i mineralnych wynosiły odpowiednio:  $0,372 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,431 \mu\text{g L}^{-1}$  oraz  $0,308 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Średnie stężenia As(III) oznaczone w butelkowanych wodach smakowych, funkcjonalnych i mineralnych wynosiły odpowiednio:  $0,292 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,349 \mu\text{g L}^{-1}$  oraz  $0,391 \mu\text{g L}^{-1}$ . As(V) również oznaczono we wszystkich trzech typach wód a średnie stężenia tej formy specjacyjnej w butelkowanych wodach smakowych, funkcjonalnych i mineralnych wynosiły odpowiednio:  $0,904 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,218 \mu\text{g L}^{-1}$  oraz  $0,879 \mu\text{g L}^{-1}$ . Spośród dwóch form specjacyjnych arsenu As(V) był formą dominującą w butelkowanych wodach smakowych i mineralnych, As(III) był formą dominującą w butelkowanych wodach funkcjonalnych. Średnie stężenia obu form arsenu oznaczone we wszystkich trzech typach wód znajdują się na zbliżonym poziomie. Cr(VI) został oznaczony w butelkowanych wodach mineralnych, ale formy tej nie oznaczono w żadnej z butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych. Podobnie jak w przypadku Cr(VI), forma specjacyjna antymonu, Sb(V) oznaczona została w zdecydowanej większości butelkowanych wód mineralnych oraz w tylko jednej butelkowanej wodzie smakowej. Tak znaczne różnice w przypadku oznaczanych form specjacyjnych Cr i Sb mogą być konsekwencją istotnych różnic w pH badanych próbek [30]. Omawiane w niniejszym rozdziale wyniki znajdują potwierdzenie w literaturze naukowej. Zarówno w kontekście butelkowanych wód mineralnych jak i napojów o bogatszym składzie obserwowane były podobne tendencje w odniesieniu do oznaczanych stężeń tAs, tCr i tSb a także form specjacyjnych tych pierwiastków [25,124,128,136,137,141,142,146,148].

Graficzne zestawienie uzyskanych wyników dla procedur oznaczania tAs, tCr i tSb oraz oznaczania pięciu toksycznych form specjacyjnych i analizy specjacyjnej arsenu we wszystkich typach wód butelkowanych przedstawiono na rysunku 14.



Rysunek 14. Zestawienie wyników oznaczania: a) tAs, b) tCr, c) tSb, d) As(III), e) As(V) oraz f) AsB w butelkowanych wodach smakowanych, funkcyjnalnych i mineralnych.

*Szacowanie ryzyka związanego z konsumpcją butelkowanych wód mineralnych, smakowych oraz funkcyjnalnych w odniesieniu do innego niż rakotwórcze negatywnego działania As, Cr i Sb na organizm ludzki.*

Szacowanie ryzyka związanego z konsumpcją butelkowanych wód mineralnych, smakowych oraz funkcyjnalnych przeprowadzono w odniesieniu do innego niż rakotwórcze negatywnego działania As, Cr i Sb na organizm ludzki. W celu oceny wyżej wymienionego ryzyka oszacowano na podstawie trzech parametrów: 1) szacunkowe dzienne spożycie (EDI, ang. Estimated daily intake), 2) iloraz całkowitego ryzyka (THQ, ang. Total hazard quotient) oraz 3) wskaźnik zagrożenia (HI, ang. Hazard index). Wszystkie spośród wymienionych parametrów oszacowano dla zawartości całkowitych As, Cr i Sb oraz dla wybranych form specyjalnych tych pierwiastków: suma As(III) i As(V), Sb(V) oraz Cr(VI) [149–151].

Parametry EDI oraz THQ oszacowano ze średnich oraz maksymalnych stężeń oznaczonych dla danego pierwiastka oraz odpowiedniej formy specyjalnej w próbkach wód butelkowanych. Średnie spożycie butelkowanych wód smakowych i funkcyjnalnych zastosowane w obliczeniach przyjęto na wartość 94,3 litra na osobę rocznie, na podstawie raportu sprzedaży i konsumpcji

napojów Unii Europejskich Stowarzyszeń Napojów (UNESDA, ang. Union of European Beverages Associations) rok 2017 [152]. W odniesieniu do butelkowanej wody mineralnej, średnie spożycie przyjęto na wartość 730 litrów na osobę na rok, na podstawie wytycznych WHO odnośnie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [153]. Średnia masa ciała konsumenta została ustalona na 60 kg [149–151].

Parametr EDI, wyrażony w ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$ ) oszacowano na podstawie poniższego równania. Parametr ten ilościowo opisuje dzienne spożycie danego czynnika toksycznego wraz ze ściśle określoną ilością pożywienia [149–151].

$$EDI = \frac{c \times DC}{BW} \quad (13)$$

Gdzie:  $c$  – średnie/maksymalne stężenie  $tAs$ ,  $tCr$ ,  $tSb$  lub wybranych form specjacyjnych ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ),  $DC$  – dzienne spożycie wody butelkowanej ( $\text{L dzień}^{-1}$ ),  $BW$  – średnia masa ciała konsumenta ( $\text{kg}$ )

Parametr THQ opisuje ryzyko związane z działaniem innym niż rakotwórcze przy długoterminowym narażenia na działanie danego czynnika toksycznego (365 dni). Czynniki ten uwzględnia także odniesienie do dawki referencyjnej czynnika toksycznego. Ponieważ brak obecnej legislacji dawek referencyjnych dla wód smakowych i funkcjonalnych we wszystkich obliczeniach wykorzystano maksymalne dopuszczalne stężenia  $As$ ,  $Cr$  i  $Sb$  dla wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [154]. Uzyskaną wartość THQ należy porównać z wartością krytyczną, 1. W przypadku, kiedy uzyskana wartość THQ jest niższa od wartości krytycznej można wnioskować że nie ma ryzyka związanego z narażeniem na dany czynnik toksyczny. Parametr THQ, wyrażony w ( $\text{mg}/\text{kg}/\text{dzień}$ ) oszacowano na podstawie poniższego równania [149–151].

$$THQ = \frac{EFr \times ED \times FIR \times c}{RfDo \times BW \times ATn} \times 10^{-3} \quad (14)$$

Gdzie:  $EFr$  – częstotliwość narażenia na czynnik szkodliwy (365 dni w roku),  $ED$  – okres narażenia (przyjęty na 70 lat),  $FIR$  – wskaźnik spożycia żywności ( $\text{L dzień}^{-1}$ ),  $c$  – średnie/maksymalne stężenie  $tAs$ ,  $tCr$ ,  $tSb$  lub wybranych form specjacyjnych ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ),  $RfDo$  – dawka referencyjna ( $As$ :  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $Sb$ :  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $Cr$ :  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ),  $BW$  - średnia masa ciała konsumenta ( $\text{kg}$ ),  $ATn$  - okres średniego narażenia na czynniki niebędące rakotwórczymi ( $365 \text{ dni/rok} \times 70 \text{ lat narażenia}$ ) [149–151].

Wskaźnik zagrożenia służy do oceny ryzyka związanego z narażeniem organizmu na kilka czynników szkodliwych. HI można oszacować wartości parametrów THQ przy założeniu, że mechanizm działania toksycznego dla sumowanych czynników jest jak najbardziej zbliżony. Jeżeli uzyskana wartość HI jest niższa od wartości krytycznej, 1 można wnioskować, że całkowite narażenie prawdopodobnie nie spowoduje nie rakotwórczych niekorzystnych skutków zdrowotnych. Wartości parametru HI obliczono jako sumę wartości parametrów THQ dla  $tA$ ,  $tCr$  i  $tSb$  oraz jako sumę wartości parametrów THQ dla wybranych form specjacyjnych [149–151].

Szacowanie ryzyka dla wód smakowych i funkcjonalnych przeprowadzono z wykorzystaniem wyników przedstawionych w rozdziale 6.1, dla wód mineralnych wykorzystano wyniki przedstawione w rozdziale 6.2. Wszystkie omawiane poniżej wyniki szacowania ryzyka odnoszą się do średnich zawartości badanych pierwiastków oraz form specjacyjnych. Zestawienie wyników szacowania ryzyka związanego z konsumpcją butelkowanych wód mineralnych, smakowych oraz funkcjonalnych w odniesieniu do innego niż rakotwórcze negatywnego działania  $As$ ,  $Cr$  i  $Sb$  na organizm ludzki przedstawiono w tabelach 26 i 27.



Tabela 26. Wartości parametrów EDI i THQ dla butelkowanych wód mineralnych, smakowych i funkcjonalnych.

		EDI dla zawartości średnich ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$ )	THQ dla zawartości średnich ( $\text{mg}/\text{kg}/\text{dzień}$ )	EDI dla zawartości maksymalnych ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$ )	THQ dla zawartości maksymalnych ( $\text{mg}/\text{kg}/\text{dzień}$ )
tAs	Smakowe	0,0069	0,0014	0,036	0,0072
	Funkcjonalne	0,0021	0,00042	0,0053	0,0011
	Mineralne	0,038	0,0077	0,14	0,028
tCr	Smakowe	0,0017	0,000034	0,0054	0,00011
	Funkcjonalne	0,0022	0,000044	0,0056	0,00011
	Mineralne	0,017	0,00033	0,074	0,0015
tSb	Smakowe	0,0016	0,00016	0,0049	0,00049
	Funkcjonalne	0,0017	0,00017	0,0026	0,00026
	Mineralne	0,010	0,0010	0,024	0,0024
Suma	Smakowe	0,0051	0,0010	0,016	0,0032
As(III) i As(V)	Funkcjonalne	0,0024	0,00049	0,0052	0,0010
	Mineralne	0,042	0,0085	0,22	0,043
Cr(VI)	Mineralne	0,017	0,0017	0,074	0,0015
Sb(V)	Smakowe	0,0023	0,00023	0,0023	0,00023
	Mineralne	0,010	0,0010	0,024	0,0024

Tabela 27. Wartości parametru HI dla butelkowanych wód mineralnych, smakowych i funkcjonalnych.

		HI dla zawartości średnich ( $\text{mg}/\text{kg}/\text{dzień}$ )	HI dla zawartości maksymalnych ( $\text{mg}/\text{kg}/\text{dzień}$ )
tAs, tCr i tSb	Smakowe	0,0016	0,0078
	Funkcjonalne	0,00063	0,0014
	Mineralne	0,0090	0,032
Suma form specjacyjnych As, Cr i Sb	Smakowe	0,0013	0,0034
	Funkcjonalne	0,00049	0,0010
	Mineralne	0,011	0,047

W odniesieniu do zawartości całkowitych As, Cr i Sb najwyższe wartości parametru EDI zostały oszacowane dla tAs w przypadku butelkowanych wód mineralnych (0,038  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$ ) oraz smakowych (0,0068  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$ ) a także dla tCr w przypadku wód funkcjonalnych (0,0022  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$ ). W ujęciu ogólnym najwyższe wartości parametru EDI oszacowano dla butelkowanych wód mineralnych, a najniższe dla wód funkcjonalnych. Fakt ten, w dużej mierze wynika jednak ze zdecydowanie większej konsumpcji wód mineralnych niż pozostałych typów wód. Wartość dopuszczalnego dziennego spożycia określona przez WHO została spośród analizowanych pierwiastków jedynie dla arsenu. Wartość tą ustalono na 15 ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{tydzień}$ ) [2,1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$ )] a następnie wycofano bez zastąpienia nową wartością dopuszczalnego dziennego spożycia [155]. Mimo wycofania wcześniej wymienionej wartości dopuszczalnego dziennego spożycia uzyskane w niniejszych badaniach wartości EDI dla arsenu oraz pozostałych pierwiastków zostały przyrównane do wartości dopuszczalnego dziennego spożycia dla arsenu. Oszacowane wartości EDI dla wszystkich badanych pierwiastków oraz wszystkich badanych typów wód były poniżej wartości dopuszczalnego dziennego spożycia dla arsenu. Wartości

parametru THQ oszacowane dla tAs były zdecydowanie wyższe niż wartości THQ oszacowane dla pozostałych pierwiastków. Podobnie jak w przypadku parametru EDI zdecydowanie wyższe wartości parametru THQ zostały oszacowane dla wód mineralnych w przypadku wszystkich badanych pierwiastków. Analogiczne tendencje zaobserwować można w wynikach szacowania wartości parametru HI, również w tym przypadku zdecydowanie wyższe wartości uzyskano dla butelkowanych wód mineralnych. We wszystkich przypadkach oszacowane wartości THQ oraz HI były niższe od wartości granicznej (1 mg/kg/dzień) [149–151].

W odniesieniu do analizy specjacyjnej próbek butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych, ocenę ryzyka można w pełni ocenić tylko w przypadku arsenu, ponieważ Sb(V) wykryto tylko w jednej badanej próbce, a Cr(VI) nie wykryto w żadnej z próbek. Jedynie w przypadku butelkowanych wód mineralnych wszystkie z badanych toksycznych form specjacyjnych wykryto w znacznej ilości próbek. Podobnie jak w przypadku szacowania ryzyka dla zawartości całkowitych badanych pierwiastków wyniki szacowania parametru EDI wykazały najwyższe wyniki w przypadku form specjacyjnych arsenu. Porównując wszystkie typy badanych wód, w odniesieniu do oszacowanego parametru EDI dla sumy As(III) oraz As(V) najwyższą wartość oszacowano dla wód mineralnych (0,042 mg/kg/dzień). Oszacowane wartości EDI dla wszystkich badanych pierwiastków oraz wszystkich badanych typów wód były poniżej wymienionej w poprzednim akapicie wartości dopuszczalnego dziennego spożycia dla arsenu. Analogiczne tendencje zaobserwować można w wynikach szacowania parametrów THQ oraz HI. Najwyższe wartości THQ oraz HI oszacowano dla sumy form specjacyjnych arsenu w butelkowanych wodach mineralnych. Wartości dla wszystkie szacowanych parametrów były niższe dla toksycznych form specjacyjnych w stosunku do całkowitych zawartości pierwiastków w badanych próbkach. Dla wszystkich badanych pierwiastków oraz typów wód oszacowane wartości THQ oraz HI były niższe od wartości granicznej (1 mg/kg/dzień) [149–151].

Zawartości tAs, tCr oraz tSb oznaczone w butelkowanych wodach mineralnych, smakowych oraz funkcjonalnych znajdowały się na poziomach stężeń poniżej maksymalnych dopuszczalnych stężeń arsenu, chromu i antymonu w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi które wynoszą odpowiednio 10, 50 i 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  [133]. Ponadto wyniki uzyskane w ramach szacowania ryzyka związanego z konsumpcją butelkowanych wód mineralnych, smakowych oraz funkcjonalnych w odniesieniu do innego niż rakotwórcze negatywnego działania As, Cr i Sb na organizm ludzki wykazują wartości szacowanych parametrów EDI, THQ oraz HI poniżej wartości granicznych. Uzyskane wyniki potwierdzają brak ryzyka związanego z konsumpcją butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych.

## **6.2 Badanie specjacji pierwiastków chemicznych w próbkach żywności stałej**

Analiza specjacyjna próbek żywności stałej niesie za sobą zdecydowanie większą ilość wyzwań niż analogiczne badania prowadzone na próbkach ciekłych. Prawdopodobnie najbardziej wymagającym etapem procesu analitycznego jest przygotowanie próbki do analizy specjacyjnej. Prawidłowe wykonanie badań specjacji pierwiastków chemicznych niesie za sobą wymóg zachowania form specjacyjnych badanych pierwiastków w ich oryginalnym stanie w trakcie całego procesu analitycznego. W przypadku analizy specjacyjnej próbek żywności stałej wymagane jest przeprowadzenie ekstrakcji form specjacyjnych badanych pierwiastków. Poza koniecznością zachowania niezmienności specjacji badanych pierwiastków w kontekście ekstrakcji istotnym parametrem jest także uzyskanie odpowiednio wysokiej efektywności ekstrakcji, która umożliwi oznaczanie badanych form specjacyjnych z zachowaniem dobrych wartości precyzji pomiarów. W odniesieniu do różnych typów matryc badanych próbek, ale

także różnych form specjacyjnych badanych pierwiastków optymalne mogą okazać się różne metody ekstrakcji oraz różne typy ekstrahentów. Nie bez znaczenia jest tu także stosowana technika analityczna, której ograniczenia mogą wykluczać stosowanie konkretnych ekstrahentów w danym procesie analitycznym. W badaniach specjacji pierwiastków chemicznych w próbkach żywności stałej najczęściej zastosowanie znajdują metody ekstrakcji z wykorzystaniem wody, prostych rozpuszczalników organicznych, buforów nieorganicznych oraz enzymów (w tym enzymów symulujących procesy trawienne). W ostatnich latach rosnącą popularność znalazły także metody ekstrakcji takie jak ekstrakcja do fazy stałej (SPE, ang. solid-phase extraction), ekstrakcja nadkrytyczna (SFE, ang. supercritical fluid extraction) czy przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (ASE, ang. accelerated solvent extraction). Procesy ekstrakcji w analizie specjacyjnej żywności stałej bardzo często wspomagane są za pomocą mieszania mechanicznego, ultradźwięków lub energii mikrofalowej. Bez względu na stosowaną metodę ekstrakcji konieczna jest skrupulatna kontrola oraz optymalizacja całego procesu przygotowania próbki pod kontem zapewnienia wysokich wydajności ekstrakcji ale także zapewnienia niezmienności specjacji badanych substancji chemicznych [8,156,157].

### **6.2.1 Analiza specjacyjna arsenu w algach i produktach żywnościowych z alg**

Arsen jest istotnym pierwiastkiem chemicznym, z perspektywy biologii człowieka oraz aspektów środowiskowych. Jak wspomniano w części teoretycznej niniejszej pracy doktorskiej arsen występuje w środowisku naturalnie, najczęściej w formach nieorganicznych na stopniach utlenienia III oraz V. Również w środowisku wodnym arsen nieorganiczny jest najbardziej rozpowszechniony, przede wszystkim w formach:  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  i  $\text{As}(\text{OH})_3$ . Ze względu na podobieństwo nieorganicznych związków arsenu do fosforanów pierwiastek ten może łatwo przenikać do komórek organizmów żywych. Ze względu na wysoką toksyczność nieorganicznego arsenu wiele organizmów żywych opracowało różne mechanizmy obronne polegające głównie na przekształceniu arsenu nieorganicznego w bardziej złożone, nietoksyczne, organiczne związki arsenu. Toksyczność arsenu szerzej omówiono w części teoretycznej niniejszej rozprawy doktorskiej, w bieżącym rozdziale przedstawiono tylko krótkie omówienie tej kwestii. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy do najbardziej toksycznych form arsenu należą nieorganiczne związki tego pierwiastka. Proste związki arsenoorganiczne, takie jak MMA i DMA, są mniej toksyczne, podczas gdy złożone związki arsenoorganiczne, takie jak AsB lub AsC są uważane za nietoksyczne. Bardziej złożone związki organiczne arsenu, takie jak As-lipidy lub As-cukry, nie zostały jeszcze w pełni zbadane pod względem ich toksyczności [7,158].

Produkty żywnościowe na bazie alg zyskują rosnącą popularność w diecie ludzi na całym świecie. Fakt ten może prowadzić do powstawania wątpliwości dotyczących bezpieczeństwa tego typu żywności w kontekście zawartości oraz specjacji pierwiastków chemicznych. Wysokie stężenia arsenu, często znacznie przekraczające stężenia tego pierwiastka w środowisku, obecne w algach zostały wielokrotnie potwierdzone w doniesieniach literaturowych [12,159–162]. Potwierdzono także zdolność alg do metabolizmu arsenu nieorganicznego do form organicznych tego pierwiastka [159,163–166]. Podczas produkcji żywności przetworzonej algi mogą być poddawane obróbce mechanicznej jak i termicznej, która może w znacznym stopniu wpływać na zmianę specjacji arsenu w gotowym produkcie względem specjacji tego pierwiastka w algach przed przetworzeniem.

W ramach badania specjacji arsenu w próbkach przetworzonych produktów żywnościowych z alg przeprowadzono:

- 1) oznaczanie tAs w próbkach alg przetworzonych oraz nieprzetworzonych (pod kątem żywnościowym),
- 2) ekstrakcję arsenu z alg przy wykorzystaniu dwóch metod ekstrakcji i trzech ekstrahentów,
- 3) oznaczanie arsenu całkowitego w ekstraktach z alg (ex tAs),
- 4) oznaczanie pięciu form specjacyjnych arsenu (AsB, As(III), DMA, MMA oraz As(V)) w ekstraktach z alg z wykorzystaniem techniki sprzężonej HPLC/ICP-DRC-MS,
- 5) bilans analizy specjacyjnej/zawartości całkowitej arsenu w badanych próbkach alg,
- 6) identyfikację nieznaną form specjacyjnych arsenu (uAs) za pomocą techniki sprzężonej UPLC/ESI-MS/MS (UPLC, ultrasprawa chromatografia cieczowa ang. ultraperformance liquid chromatography).

#### **6.2.1.1 Przygotowanie próbek alg oraz produktów żywnościowych z alg do analizy**

W celu oznaczania tAs w badanych próbkach alg przeprowadzono mineralizację badanych próbek. Zastosowano metodę mineralizacji wspomaganą mikrofalami, w układzie zamkniętym, z wykorzystaniem kwasu azotowego oraz nadtlenu wodoru. Bezpośrednio do kwarcowych naczyń mineralizacyjnych odważono około 200 mg każdej z badanych próbek (z wyjątkiem SRM 3232 - Kelp Powder (*Thallus laminariae*), którego odważono 500 mg zgodnie z zaleceniami producenta). Dodano 2,5 mL 65% kwasu azotowego (5 mL w przypadku SRM 3232 - Kelp Powder (*Thallus laminariae*)) oraz 0,5 mL 30% nadtlenu wodoru (1 mL w przypadku SRM 3232 - Kelp Powder (*Thallus laminariae*)). Program mineralizacji składał się z następujących etapów: 1) grzanie do temperatury 200°C, 15 minut, 2) utrzymanie temperatury 200°C, 30 minut, 3) chłodzenie, 30 minut. Zmineralizowane próbki przeniesiono ilościowo do kolb miarowych i rozcieńczono do końcowego stężenia kwasu azotowego na poziomie 3,25%. Każdą z badanych próbek mineralizowano w trzech powtórzeniach.

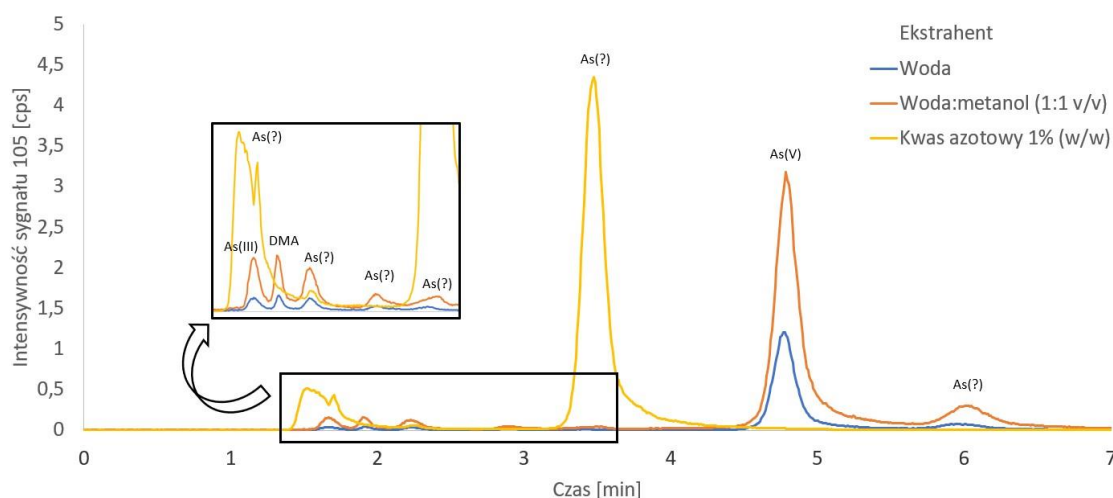
W celu przeprowadzenia analizy specjacyjnej arsenu oraz oznaczenia ex tAs przeprowadzono ekstrakcję arsenu z alg przy wykorzystaniu dwóch metod ekstrakcji: a) ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (UE, ang. Ultrasound extraction) oraz b) ekstrakcja wspomagana mikrofalami (ME, ang. Microwave extraction) i trzech ekstrahentów: 1) woda; 2) mieszanina metanolu z wodą (1:1, v/v) oraz 3) 1% w/w kwas azotowy. W przypadku każdej z metod ekstrakcji odważka badanego materiału wynosiła 200 mg. Każda porcja badanego materiału została poddana ekstrakcji trzykrotnie w celu zapewnienia wysokich wydajności ekstrakcji. Po ekstrakcji supernatant odparowano do sucha w suszarce laboratoryjnej (40°C) i ponownie rozpuszczono w 10 mL ultraczystej wody. Każdą badaną próbkę ekstrahowano w trzech niezależnych powtórzeniach. Zestawienie zastosowanych procedur ekstrakcji przedstawiono w tabeli 28.

Tabela 28. Procedury ekstrakcji arsenu z alg.

Metoda ekstrakcji	Ekstrahent	Czas prowadzenia ekstrakcji [min]	Temperatura prowadzenia ekstrakcji [°C]	Odwaga [mg]	Objętość ekstrahenta [mL]
Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami	Woda Mieszanina metanolu z wodą (1:1, v/v) Kwas azotowy (1%, w/w)	30	Temperatura pokojowa	200	20
Ekstrakcja wspomagana mikrofalami	Woda Mieszanina metanolu z wodą (1:1, v/v) Kwas azotowy (1%, w/w)		60		

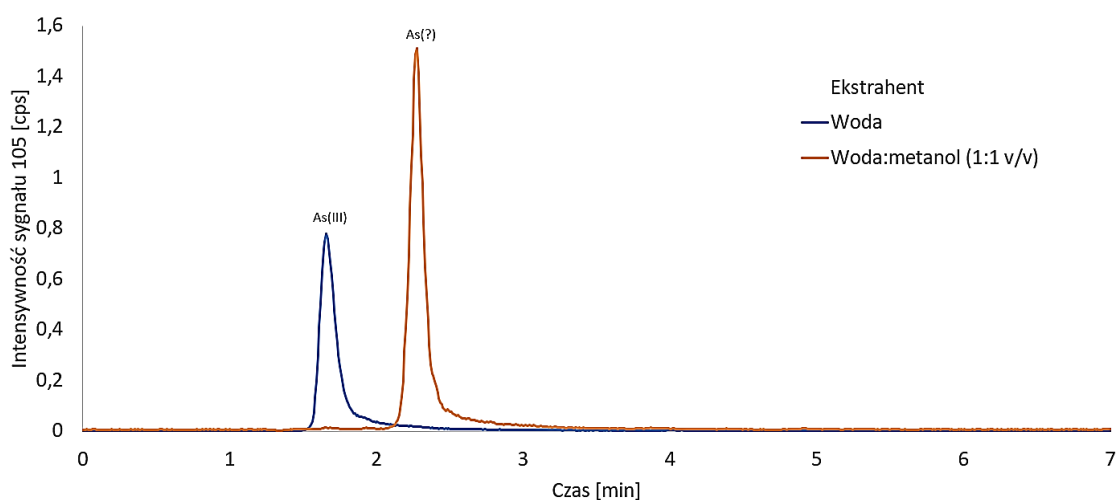
Jak wspomniano we wstępie do niniejszej części rozprawy doktorskiej w przypadku badania specjacji pierwiastków chemicznych istotna jest nie tylko efektywność prowadzonego procesu ekstrakcji, ale także zachowanie niezmienności równowagi form specjacyjnych w badanej próbce. Z tego względu, w opisywanych badaniach, poza szacowaniem efektywności ekstrakcji monitorowano także zmienność oznaczanych w badanych próbkach form specjacyjnych w zależności od zastosowanej metody ekstrakcji.

Na wczesnym etapie badań zdecydowano o rezygnacji z metod ekstrakcji za pomocą 1% kwasu azotowego. Fakt ten był spowodowany zaobserwowanymi zmianami w specjacji arsenu w porównaniu z metodami ekstrakcji za pomocą wody oraz mieszaniny wody z metanolem. Przykładowe chromatogramy prezentujące opisywane zmiany specjacji przedstawiono na rysunku 15.



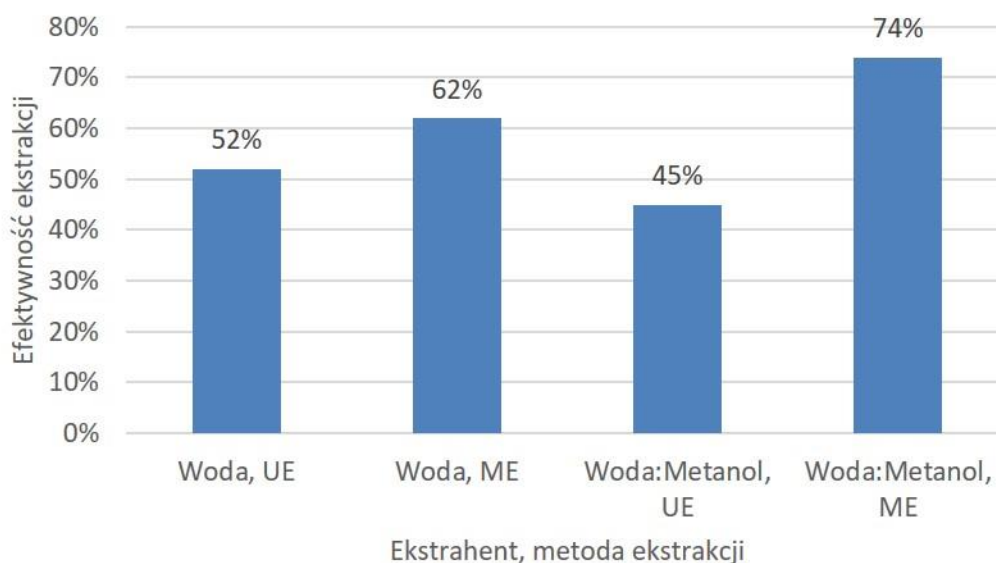
Rysunek 15. Chromatogramy uzyskane dla ekstraktów próbki wodorostów Hijiki przygotowanych z wykorzystaniem trzech ekstrahentów.

Wyniki uzyskane po ekstrakcji SRM 3232 - Kelp Powder (*Thallus laminariae*) za pomocą metody UE oraz ME wykazywały istotne rozbieżności. Przy zastosowaniu ME uzyskano chromatogramy zawierające niemożliwe do przypisania konkretnym formom specjacyjnym sygnały analityczne. Metoda UE zastosowana do tych samych próbek skutkowała uzyskaniem prawidłowych sygnałów analitycznych. W przypadku wodorostów Nori zaobserwowano istotne różnice w rejestrowanych sygnałach w zależności od stosowanego ekstrahenta. W przypadku ekstrakcji z zastosowaniem wody, dla próbki wodorostów Nori, rejestrowano sygnał chromatograficzny dla formy specjacyjnej As(III). Przy zastosowaniu mieszaniny metanolu z wodą jako ekstrahenta, dla próbki wodorostów Nori, nie rejestrowano sygnału dla formy As(III), nie mniej rejestrowano nowy sygnał chromatograficzny przypisany do niezidentyfikowanej formy specjacyjnej arsenu. Opisywane rozbieżności w sygnałach rejestrowanych dla próbki Nori w odniesieniu do dwóch stosowanych ekstrahentów przedstawiono na chromatogramach na rysunku 16.



Rysunek 16. Chromatogramy uzyskane dla ekstraktów próbki Nori przygotowanych z wykorzystaniem dwóch ekstrahentów.

Ze względu na różnice w rejestrowanej specjacji obserwowane dla próbek Nori oraz SRM 3232 - Kelp Powder (*Thallus laminariae*) zdecydowano o zastosowaniu zarówno ekstrakcji UE jak i ME z wykorzystaniem zarówno wody jak i mieszaniny woda:metanol w dalszym etapie badań. Efektywność stosowanych metod ekstrakcji oszacowano na podstawie różnicy w oznaczonych zawartościach tAs oraz ex tAs we wszystkich badanych próbkach. Uzyskane wyniki uśredniono. Oszacowane efektywności ekstrakcji wynosiły: 52% dla ekstrakcji UE za pomocą wody, 45% dla ekstrakcji UE za pomocą mieszaniny woda: metanol, 62% dla ekstrakcji ME za pomocą wody oraz 74% dla ekstrakcji ME za pomocą mieszaniny woda: metanol. Uzyskane wyniki zestawiono na rysunku 17.



Rysunek 17. Zestawienie oszacowanych efektywności ekstrakcji arsenu z badanych próbek alg.

Do badań z zastosowaniem techniki sprzężonej UPLC/ESI-MS/MS przeprowadzono ekstrakcję z zastosowaniem mieszaniny metanolu z wodą 1:1, v/v. Ekstrakcję prowadzono w młynku kulowym. Odważka badanego materiału poddana ekstrakcji wносиła 50 mg. Po ekstrakcji próbki wirowano (20 min, 15000 obr/min, 5,0°C). Supernatant (1,0 ml) zebrano i odparowano, stosując układ Speed Vac (40,0°C, 2 godziny). Próbki ponownie rozpuszczono w 0,5 mL metanolu i przesączono przez filtry PTFE (0,44 µm, Ø 14 mm).

#### 6.2.1.2 Procedury analityczne badania specjacji arsenu w algach i produktach żywnościowych z alg

*Oznaczanie zawartości tAs oraz zawartości ex tAs w algach.*

W pierwszym etapie prowadzonych badań przeprowadzono oznaczanie zawartości tAs w badanych próbkach alg. Oznaczano również arsen całkowity w ekstraktach z badanych próbek alg. Zmineralizowane zgodnie z opisaną w poprzednim rozdziale procedurą próbki analizowano przy użyciu ICP-MS z zastosowaniem eliminacji interferencji przy pomocy DRC z użyciem tlenu jako gazu reakcyjnego. Monitorowano jon  $^{91}\text{AsO}^+$  oraz zastosowano german ( $^{73}\text{Ge}^+$ ) jako wzorzec wewnętrzny. Zastosowano kalibrację metodą serii wzorców w zakresie stężeń od 0,1 do 10 µg L<sup>-1</sup>. Szczegółowe parametry procedury oznaczania zawartości tAs oraz zawartości ex tAs w algach przedstawiono w tabeli 29.

*Oznaczanie zawartości pięciu form specjacyjnych arsenu (AsB, As(III), DMA, MMA oraz As(V)) w ekstraktach z alg z wykorzystaniem techniki sprzężonej HPLC/ICP-DRC-MS.*

Analizę specjacyjną pięciu form specjacyjnych arsenu (AsB, As(III), DMA, MMA oraz As(V)) w badanych próbkach alg przeprowadzono przy zastosowaniu opracowanej i zastosowanej do analizy szerokiej gamy próbek rzeczywistych procedury analitycznej [135,167,168]. W prowadzonych badaniach wykorzystano kolumnę anionowymienną PRP-X100 (4,6 x 150 mm) (Hamilton Company, Szwajcaria). Przygotowano fazę ruchomą o składzie 10 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 10 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> oraz pH w zakresie od 9,0 do 9,2. Zastosowano elucję izokratyczną. Podobnie jak w przypadku oznaczania zawartości arsenu całkowitego za pomocą ICP-MS zastosowano eliminację interferencji spektralnych za pomocą DRC z tlenek jako gazem reakcyjnym oraz

monitorowano jon  $^{91}\text{AsO}^+$ . Zastosowano kalibrację metodą serii wzorców w zakresie stężeń od 0,5 do 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Szczegółowe parametry procedury oznaczania zawartości pięciu form specjacyjnych arsenu w ekstraktach z alg przedstawiono w tabeli 29.

Tabela 29. Wybrane parametry procedur analitycznych oznaczania zawartości tAs i zawartości ex tAs oraz oznaczania form specjacyjnych arsenu (AsB, As(III), DMA, MMA i As(V)) w algach.

	Parametr	Opis/Wartość
ICP-MS	Moc generatora RF	1250 - 1400 W
	Przepływ gazu rozpylającego (Ar)	0,86 – 0,95 L min <sup>-1</sup>
	Przepływ gazu pomocniczego (Ar)	1,20 L min <sup>-1</sup>
	Przepływ gazu plazmowego (Ar)	16 L min <sup>-1</sup>
	Materiał stożków łącznika	Pt
	Napięcie na soczewkach jonowych	7,5 – 10,5 V
	Tryb zbierania danych	Dual
	Monitorowane jony	$^{91}\text{AsO}$ , $^{73}\text{Ge}^+$
	Przepływ gazu reakcyjnego w DRC (O <sub>2</sub> )	0,55 L min <sup>-1</sup>
	Rp <sub>q</sub>	0,55
	Rp <sub>a</sub>	0
	Rodzaj elucji	Izokratyczna
	Skład fazy ruchomej	10 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
HPLC	pH fazy ruchomej	9,0 – 9,2
	Przepływ fazy ruchomej	1,2 mL min <sup>-1</sup>
	Objętość nastrzyku	100 $\mu\text{L}$
	Temperatura kolumny	25°C

#### *Identyfikacja uAs za pomocą techniki sprzężonej UPLC/ESI-MS/MS.*

Do identyfikacji nieznanymi form specjacyjnych arsenu zastosowano wysokorozdzielczy tandemowy spektrometr mas QExactiv (Thermo Fisher, USA) połączony z systemem ultrasprawną chromatografię cieczową Acquity UPLC (Waters, USA). Zastosowano chromatografię w układzie faz odwróconych z kolumną UPLC BEH C18 (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 100 mm), (Waters, USA). Zastosowana faza ruchoma składała się z dwóch eluentów. Eluent A: 0,1% roztwór kwasu mrówkowego oraz eluent B: acetonitryl. Zastosowano elucję gradientową o następującym przebiegu:

- Nastrzyk próbki na kolumnę,
- 5 min. przyrost od 0,5 do 10% eluentu B,
- 10 min. przyrost do 75% eluentu B,
- 2 min. przyrost do 98% eluentu B,
- 2 min. utrzymanie 98% eluentu B,
- 1 min. powrót do warunków początkowych elucji,
- 4 min. kondycjonowanie kolumny w warunkach początkowych.

Badania prowadzono zarówno w trybie jonów ujemnych i dodatnich, w obu przypadkach zastosowano podgrzewane źródło jonów HESI-II. Pomiar prowadzono z rozdzielczością 70 000  $m/z$  w trybie FullMS oraz 17 500 w trybie ddMS2. Szczegółowe parametry procedury identyfikacji nieznanymi form specjacyjnych arsenu za pomocą techniki sprzężonej UPLC/ESI-MS/MS przedstawiono w tabeli 30.



Tabela 30. Wybrane parametry procedury identyfikacji nieznanymi form specjacyjnych arsenu za pomocą techniki sprzężonej UPLC/ESI-MS/MS.

	Parametr	Opis/Wartość
UPLC	Rodzaj elucji	Gradientowa
	Skład fazy ruchomej	Eluent A: 0,1% kwas mrówkowy, Eluent B: acetonitryl
	Przepływ fazy ruchomej	0,3 mL min <sup>-1</sup>
	Temperatura kolumny	40°C
	Rozdzielczość w trybie FullMS	70 000 <i>m/z</i>
	Rozdzielczość w trybie ddMS2	17 500 <i>m/z</i>
	Przepływ gazu osłonowego, N <sub>2</sub>	35 jednostek
	Przepływ gazu pomocniczego, N <sub>2</sub>	10 jednostek
ESI-MS	Przepływ gazu usuwającego, N <sub>2</sub>	3 jednostki
	Temperatura gazu pomocniczego	400°C
	Napięcie jonizacji	2,5 kV w trybie ujemnym 3,5 kV w trybie dodatnim
	Temperatura kapilary wlotowej	350°C
	Współczynnik RF dla optyki jonowej	50
	Znormalizowana energia fragmentacji w komorze HCD	30eV

### 6.2.1.3 Zapewnienie i kontrola jakości wyników pomiarów

#### *Walidacja procedur analitycznych.*

Przeprowadzono walidację procedury analitycznej oznaczania pięciu form specjacyjnych arsenu w ramach której wyznaczono parametry takie jak: liniowość, LOD, poprawność oraz precyzja. Parametry te oszacowano również dla oznaczania tAs oraz ex tAs. Liniowość została zweryfikowana za pośrednictwem oszacowanych współczynników determinacji [111,112]. Współczynniki te były szacowane dla każdej wykreślonej krzywej kalibracyjnej. Poprawność została oszacowana za pomocą odzysku dla oznaczania tAs oraz odzysku i efektywności ekstrakcji dla oznaczania ex tAs i pięciu form specjacyjnych arsenu. Odzysk dla tAs i ex tAs oszacowano na podstawie pomiarów wykonanych dla CRM 7405-a: Trace Elements and Arsenic Compounds in Seaweed po mineralizacji. W przypadku oznaczania pięciu form specjacyjnych As odzysk oszacowano z zastosowaniem metody dodatku wzorca do próbek rzeczywistych (dodatek na poziomie 5 µg L<sup>-1</sup>) [111]. Precyzja została oszacowana w warunkach powtarzalności dla tAs i ex tAs oraz w warunkach odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej dla pięciu form specjacyjnych arsenu. W każdym z przypadków precyzję wyrażono jako CV [%]. Precyzję dla tAs oraz ex tAs oszacowano, podobnie jak w przypadku poprawności, na podstawie pomiarów dla CRM 7405-a: Trace Elements and Arsenic Compounds in Seaweed po mineralizacji. W przypadku oznaczania pięciu form specjacyjnych As precyzję oszacowano za pomocą metody dodatku wzorca do próbek rzeczywistych (dodatek na poziomie 5 µg L<sup>-1</sup>). LOD w przypadku oznaczania tAs oszacowano na bazie pomiarów wykonanych dla próbki ślepej (3,25% kwas azotowy). W przypadku ex tAs oraz pięciu form specjacyjnych As LOD oszacowano na bazie pomiarów wykonanych dla próbek rzeczywistych z dodatkiem tAs lub pięciu form specjacyjnych As na poziomie zbliżonym do spodziewanej wartości LOD (0,5 µg L<sup>-1</sup>). Wartość LOD oszacowano na podstawie równania 15 [111,112].

$$LOD = c + 3 \times SD \quad (15)$$

Gdzie:  $c$  – średnie stężenie analitu zmierzone w próbce ślepej lub próbce z dodatkiem analitu,  $SD$  – odchylenie standardowe pomiarów dla próbki ślepej lub próbki z dodatkiem analitu.

Uzyskane wartości współczynników determinacji dla krzywych kalibracyjnych wynosiły 0,9994 dla tAs oraz 0,9999 dla ex tAs. W przypadku analizy specjacyjnej pięciu form specjacyjnych arsenu współczynniki determinacji dla wszystkich uzyskanych krzywych kalibracyjnych były wyższe niż 0,99. Uzyskane wartości współczynników determinacji potwierdzają dobrą liniowość otrzymanych krzywych kalibracyjnych. Wartości LOD oszacowane dla tAs oraz ex tAs wynosiły odpowiednio 0,041  $\mu\text{g L}^{-1}$  oraz 0,12  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Dla oznaczania pięciu form specjacyjnych arsenu oszacowane wartości LOD wynosiły: 0,55  $\mu\text{g L}^{-1}$  dla AsB, 0,61  $\mu\text{g L}^{-1}$  dla As(III), 0,57  $\mu\text{g L}^{-1}$  dla DMA, 0,64  $\mu\text{g L}^{-1}$  dla MMA oraz 0,55  $\mu\text{g L}^{-1}$  dla As(V). Odzysk oszacowany na podstawie pomiarów dla CRM 7405-a: Trace Elements and Arsenic Compounds in Seaweed po mineralizacji wynosił: 96% dla tAs oraz 115% dla ex tAs. W przypadku pięciu form specjacyjnych As zakresy oszacowanych wartości odzysku wynosiły: od 83% do 118% dla AsB, od 86% do 125% dla As(III), od 81% do 123% dla DMA, od 80% do 100% dla MMA oraz od 80% do 97% dla As(V). Wartości precyzji powtarzalności wynosiły dla tAs i ex tAs odpowiednio: 2,62% oraz 4,65%. Wartości precyzji odtwarzalności wewnętrzzlaboratoryjnej, wynosiły: 4,12% dla AsB, 2,60% dla As(III), 2,36% dla DMA, 2,91% dla MMA oraz 2,18% dla As(V). Zestawienie oszacowanych parametrów walidacyjnych przedstawiono w tabeli 31.

#### *Szacowanie niepewności wyników pomiarów.*

Niepewność wyników pomiarów szacowano przy zastosowaniu podejścia do szacowania niepewności wyników pomiarów z wykorzystaniem danych pochodzących z procesu walidacji (single-lab validation approach, the Nordtest approach) [116,117]. Szacowanie niepewności wyników pomiarów zostało przeprowadzone na podstawie wyników przedstawionych w poprzednim podrozdziale niniejszej rozprawy doktorskiej. Składowe niepewności całkowitej zostały podzielone na dwie grupy: składowe związane z precyzją oraz składowe związane z poprawnością. Złożoną niepewność standardową stężenia badanych analitów  $u_c(c)$  oszacowano na podstawie równania 16 [118].

$$u_c(c) = c_a \sqrt{u^2(p_i) + u^2(\bar{R})'} \quad (16)$$

Gdzie:  $u(p_i)$  – składowa niepewności związana z precyzją,  $u(\bar{R})'$  – składowa niepewności związana z odzyskiem.

Poszczególne składowe niepewności związane z precyzją oraz poprawnością zostały oszacowane zgodnie z równaniami przedstawionymi w rozdziale 6.2.1.2 niniejszej rozprawy doktorskiej. Niepewności rozszerzone oszacowano przy założeniu poziomu ufności około 95% przyjmując wartość współczynnika rozszerzenia  $k=2$  [116]. Uzyskane wartości niepewności rozszerzonej ( $U$ ,  $k=2$ ) dla oznaczania pięciu form specjacyjnych arsenu wynosiły: 8,31% dla AsB, 6,58% dla As(III), 5,24% dla DMA, 4,28% dla MMA oraz 4,81% dla As(V). W przypadku oznaczania tAs oraz ex tAs nie oszacowano niepewności wyników pomiarów. Oszacowane zostało odchylenie standardowe dla pomiarów każdej z badanych próbek (oszacowane wartości odchylenia standardowego przedstawiono wraz z wynikami pomiarów w tabeli 32). Zestawienie oszacowanych wartości niepewności rozszerzonych przedstawiono w tabeli 31.

Tabela 31. Parametry walidacyjne procedur oznaczania tAs, ex tAs oraz pięciu form specyjalnych As w algach.

Parametr procedury analitycznej	Analit						
	tAs	ex tAs	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)
Czas retencji [min]		-	1,5	1,7	1,9	3,0	4,7
Zakres pomiarowy [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]		0,1-10			0,5-20,0		
Współczynnik determinacji	0,9994	0,9999			> 0,99		
LOD [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]	0,041	0,12	0,55	0,61	0,57	0,64	0,55
Odzysk [%]	96	115	83 - 118	86 - 125	81 - 123	80 - 100	80 - 97
Efektywność ekstrakcji [%]	W, UE*	-		52			
	M, UE*	-		45			
	W, ME*	-		62			
	M, ME*	-		74			
Precyzja [%]	2,62	4,65	4,12	2,60	2,36	2,91	2,18
Niepewność rozszerzona (k=2) [%]	..**	..**	8,31	6,58	5,24	4,82	4,81

\*W – woda; M – woda:metanol (1:1, v/v); UE – ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami; MAE – ekstrakcja wspomagana mikrofalami.

\*\*W przypadku oznaczania tAs oraz ex tAs nie oszacowano niepewności wyników pomiarów. Oszacowane zostało odchylenie standardowe dla pomiarów każdej z badanych próbek.

*Zapewnienie spójności pomiarowej wyników pomiarów.*

Spójność pomiarową wyników pomiarów dla tAs i ex tAs zapewniono poprzez zastosowanie CRM 7405-a: Trace Elements and Arsenic Compounds in Seaweed. W przypadku oznaczania pięciu form specyjalnych As do zapewnienia spójności pomiarowej skorzystano z metody dodatku wzorca do próbek rzeczywistych [111–113,119].

#### 6.2.1.4 Wyniki badania specjacji arsenu w algach i produktach żywnościowych z alg

*Oznaczanie zawartości tAs w algach.*

Przeprowadzono oznaczanie tAs techniką ICP-MS we wszystkich badanych próbkach alg po mineralizacji. Przeprowadzono także oznaczanie ex tAs techniką ICP-MS dla wszystkich otrzymanych ekstraktów z alg. Uzyskane wyniki dla tAs i ex tAs zebrano w tabeli 32.

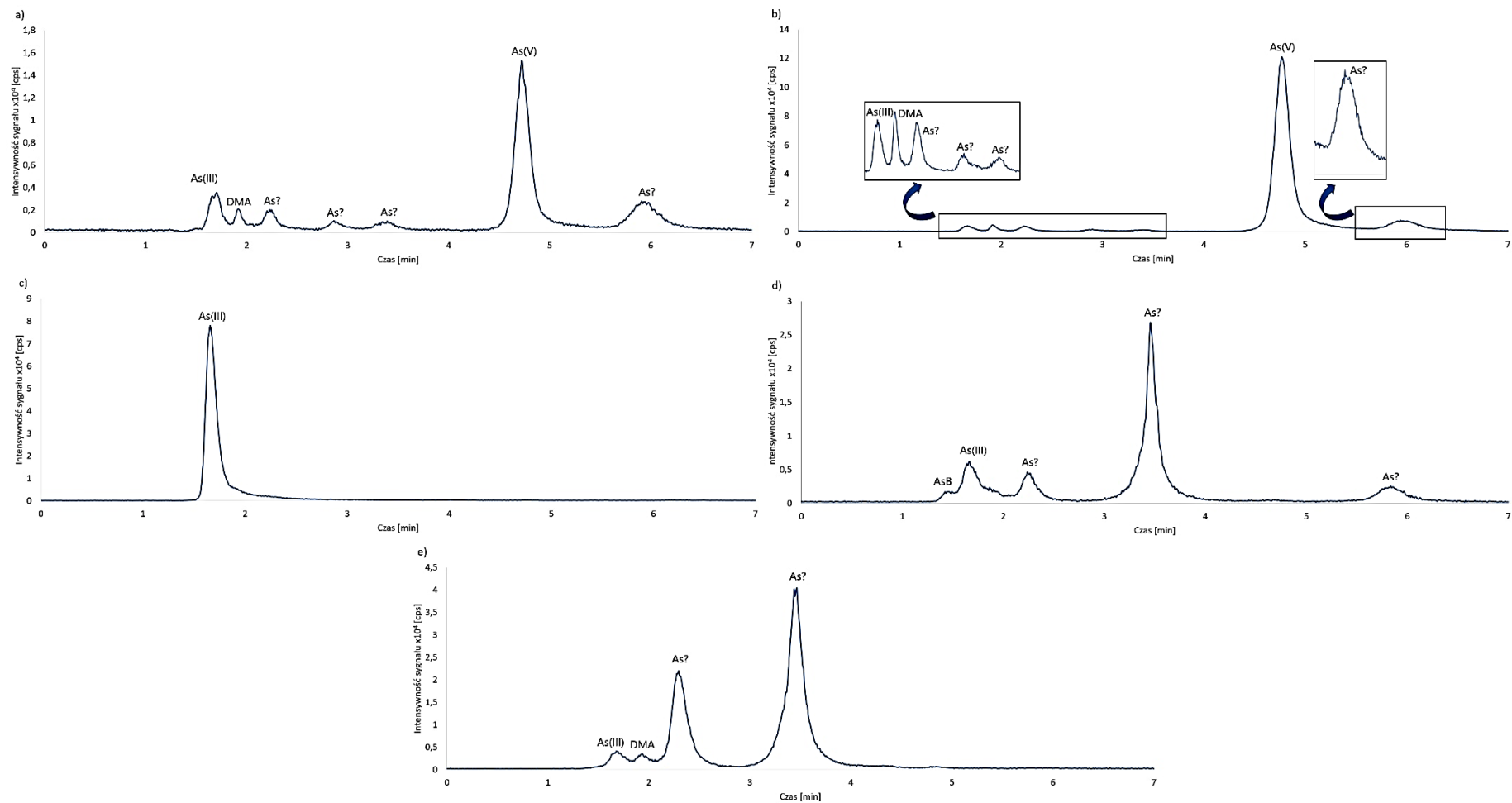
Tabela 32. Wyniki oznaczania tAs ( $c \pm SD$  [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]), ex tAs ( $c \pm SD$  [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]), pięciu form specyjalnych As ( $c \pm U$ ,  $k=2$  [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]) oraz szacowania bilansu analizy specyjalnej/zawartości całkowitej arsenu (uAs [%]) w próbkach alg.

Oznaczenie próbki	tAs	Metoda ekstrakcji	ex tAs	As(III)	DMA	As(V)	uAs
1	34,38±0,99	Woda, UE	17,88±0,68	0,853±0,056	<LOD	2,83±0,14	79
		Woda:metanol , UE	9,12±0,23	<LOD	<LOD	6,59±0,32	28
		Woda, ME	16,52±0,34	<LOD	<LOD	7,39±0,36	55
		Woda:metanol , ME	26,76±0,70	<LOD	<LOD	7,37±0,35	72
2	72,6±2,7	Woda, UE	66,0±1,5	0,952±0,063	<LOD	5,64±0,27	90
		Woda:metanol , UE	36,54±0,73	1,468±0,097	0,766±0,040	5,94±0,29	78
		Woda, ME	48,94±0,87	1,147±0,075	<LOD	5,48±0,26	86
		Woda:metanol , ME	57,99±0,93	1,168±0,077	<LOD	5,95±0,29	88
2a		Woda, UE	59,6±1,2	2,63±0,17	0,669±0,035	4,87±0,23	86
		Woda:metanol , UE	11,29±0,16	1,233±0,081	<LOD	4,81±0,23	46
		Woda, ME	60,7±2,0	1,195±0,079	<LOD	4,12±0,20	91
		Woda:metanol , ME	55,1±1,5	1,248±0,082	0,596±0,031	4,71±0,23	88
3	19,28±0,45	Woda, UE	11,85±0,43	7,88±0,52	<LOD	<LOD	34
		Woda:metanol , UE	16,51±0,77	<LOD	<LOD	<LOD	100
		Woda, ME	13,83±0,65	8,97±0,59	<LOD	<LOD	35
		Woda:metanol , ME	14,96±0,70	<LOD	<LOD	<LOD	100
4	19,37±0,51	Woda, UE	2,82±0,12	1,292±0,085	<LOD	<LOD	54
		Woda:metanol , UE	10,37±0,30	1,291±0,085	<LOD	<LOD	88
		Woda, ME	5,35±0,16	1,098±0,072	<LOD	<LOD	79
		Woda:metanol , ME	11,40±0,35	1,252±0,082	<LOD	<LOD	89
5	45,4±1,4	Woda, UE	4,649±0,069	<LOD	<LOD	<LOD	100
		Woda:metanol , UE	14,59±0,59	0,911±0,060	<LOD	<LOD	94

Najwyższą zawartość tAs oznaczono w próbce alg Hijiki, zawartość ta wynosiła  $(72,6 \pm 2,7)$  mg kg<sup>-1</sup>. W przypadku próbek alg Nori oraz Morszczyku piłkowanego oznaczone zawartości tAs były zbliżone i wynosiły odpowiednio:  $(19,28 \pm 0,45)$  mg kg<sup>-1</sup> oraz  $(19,37 \pm 0,51)$  mg kg<sup>-1</sup>. Oznaczona zawartość tAs w CRM 7405-a: Trace Elements and Arsenic Compounds in Seaweed była równa  $(34,38 \pm 0,99)$  mg kg<sup>-1</sup> i wykazywała dobrą zgodność z wartością certyfikowaną tAs dla tego CRM. W przypadku SRM 3232 - Kelp Powder (Thallus laminariae) oznaczona zawartość tAs wynosiła  $(45,4 \pm 1,4)$  mg kg<sup>-1</sup>. Certyfikowana zawartość tAs dla SRM 3232 - Kelp Powder (Thallus laminariae) wynosi  $(38,3 \pm 1,34)$  mg kg<sup>-1</sup> i tym samym oznaczona wartość wykazywała zdecydowanie gorszą zgodność z wartością certyfikowaną niż w przypadku CRM 7405-a: Trace Elements and Arsenic Compounds in Seaweed. Zawartości tAs oznaczone dla wszystkich badanych gatunków alg wykazują dobrą zgodność z danymi literaturowymi [70,166,169–174].

*Oznaczanie zawartości pięciu form specjacyjnych arsenu (AsB, As(III), DMA, MMA oraz As(V)) w ekstraktach z alg z wykorzystaniem techniki sprzężonej HPLC/ICP-DRC-MS.*

Przeprowadzono analizę specjacyjną techniką HPLC/ICP-DRC-MS dla wszystkich otrzymanych ekstraktów z alg. Oznaczano pięć form specjacyjnych arsenu: AsB, As(III), DMA, MMA i As(V). Badanie specjacji arsenu w algach techniką sprzężoną HPLC/ICP-DRC-MS potwierdziło obecność w badanych próbkach zarówno pięciu form specjacyjnych tego pierwiastka, ale także ujawniło obecność szeregu niezidentyfikowanych form specjacyjnych. Przykładowe chromatogramy dla badanych próbek alg przedstawiono na rysunku 18. Szczegółowe wyniki dla oznaczania zawartości pięciu form specjacyjnych arsenu, ex tAs oraz uAs przedstawiono w tabeli 32.



Rysunek 18. Przykładowe chromatogramy uzyskane dla badanych próbek alg: a) CRM 7405-a: Trace Elements and Arsenic Compounds in Seaweed (Hijiki), b) Hijiki (*Sargassum fusiforme*), c) Nori (*Pyropia yezoensis*), d) Morszczyzn piłkowany (*Fucus serratus*), e) SRM 3232 - Kelp Powder (*Thallus laminariae*).

Część z badanych alg przetworzonych (próbki 2, 2a) oraz CRM 7405-a: Trace Elements and Arsenic Compounds in Seaweed (próbka 1) należały do tego samego gatunku alg, Hijiki, prawdopodobnym było uzyskanie dla wspomnianych próbek zbliżonych wyników pod kątem wykrytych form specjacyjnych As. Zgodnie z przewidywaniami chromatogramy uzyskane dla wspomnianych próbek wskazywały na obecność tożsamy form specjacyjnych zarówno w algach przetworzonych jak i CRM 7405-a: Trace Elements and Arsenic Compounds in Seaweed. W obu opisywanych próbkach oznaczono As(III), DMA oraz As(V) a także cztery dodatkowe sygnały chromatograficzne przypisane do niezidentyfikowanych form specjacyjnych As, co przedstawiono na rysunku 18. W odniesieniu do zawartości oznaczonych form specjacyjnych w badanych próbkach zanotowano znaczące różnice mogące wynikać zarówno z procesu przetwarzania alg spożywczych. Podobne różnice w zawartościach form specjacyjnych arsenu w ramach jednego gatunku alg zostały opisane w literaturze naukowej. Nie można więc z całą pewnością przesądzać o wpływie przetworzenia alg na zawartość form specjacyjnych arsenu [172,174]. W próbce wodorostów Nori, obserwowano znaczące różnice w oznaczanych i wykrywanych formach specjacyjnych w zależności od stosowanego ekstrahenta. W przypadku ekstrakcji z zastosowaniem wody zarejestrowano sygnał chromatograficzny dla formy specjacyjnej As(III). Przy zastosowaniu mieszaniny metanolu z wodą jako ekstrahenta nie zarejestrowano sygnału dla formy As(III), ale zarejestrowano nowy sygnał chromatograficzny przypisany do niezidentyfikowanej formy specjacyjnej arsenu, co przedstawiono na rysunku 18. W przypadku Morszczynu piłkowanego, ze względu na znane tendencje tego gatunku alg do szybkiego metabolizmu arsenu nieorganicznego do form organicznych, nie spodziewano się oznaczyć znacznych ilości nieorganicznych oraz prostych organicznych form specjacyjnych As [175,176]. Uzyskane wyniki potwierdziły wstępne założenia, w badanej próbce oznaczono niskie zawartości As(III) w zakresie od  $(1,098 \pm 0,072)$  mg kg<sup>-1</sup> do  $(1,292 \pm 0,085)$  mg kg<sup>-1</sup>. W próbce Morszczynu piłkowanego wykryto także AsB oraz DMA, jednak oznaczone zawartości były poniżej oszacowanych wartości LOD dla tych form specjacyjnych. Jak wspomniano wcześniej w przypadku SRM 3232 - Kelp Powder (Thallus laminariae) wyniki uzyskano tylko przy zastosowaniu metody ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami. Spośród wszystkich badanych form specjacyjnych, w SRM 3232 - Kelp Powder (Thallus laminariae) oznaczono tylko As(III) oraz DMA.

Spośród wszystkich oznaczonych form specjacyjnych we wszystkich badanych próbkach najwyższą zawartość oznaczono dla As(III),  $(8,97 \pm 0,59)$  mg kg<sup>-1</sup>. As(III) oznaczono w każdej z badanych próbek alg w zakresie od <LOD do  $(8,97 \pm 0,59)$  mg kg<sup>-1</sup>. Zakres zawartości As(V) w badanych próbkach wahał się od wartości <LOD do  $(7,39 \pm 0,36)$  mg kg<sup>-1</sup>. Zawartość As(V) powyżej wartości LOD oznaczono tylko w algach z gatunku Hijiki, znajdowała się ona w zakresie od  $(2,83 \pm 0,14)$  mg kg<sup>-1</sup> do  $(7,39 \pm 0,36)$  mg kg<sup>-1</sup> w zależności od zastosowanej procedury ekstrakcji. DMA oznaczono w badanych próbkach alg w zdecydowanie niższych zawartościach niż As(III) oraz As(V). W zdecydowanej większości badanych próbek zawartość DMA znajdowała się poniżej wartości LOD. Zawartość DMA powyżej LOD oznaczono tylko w próbce alg z gatunku Hijiki. Zawartość DMA oznaczona w tym gatunku alg mieściła się w zakresie od <LOD do  $(0,766 \pm 0,040)$  mg kg<sup>-1</sup>. AsB wykryto w próbce Morszczynu piłkowanego w zawartości poniżej LOD. MMA nie wykryto w żadnej z badanych próbek. Wyniki badania specjacji arsenu w algach wykazują dobrą zgodność z danymi dostępnymi w literaturze naukowej [162,172–174].

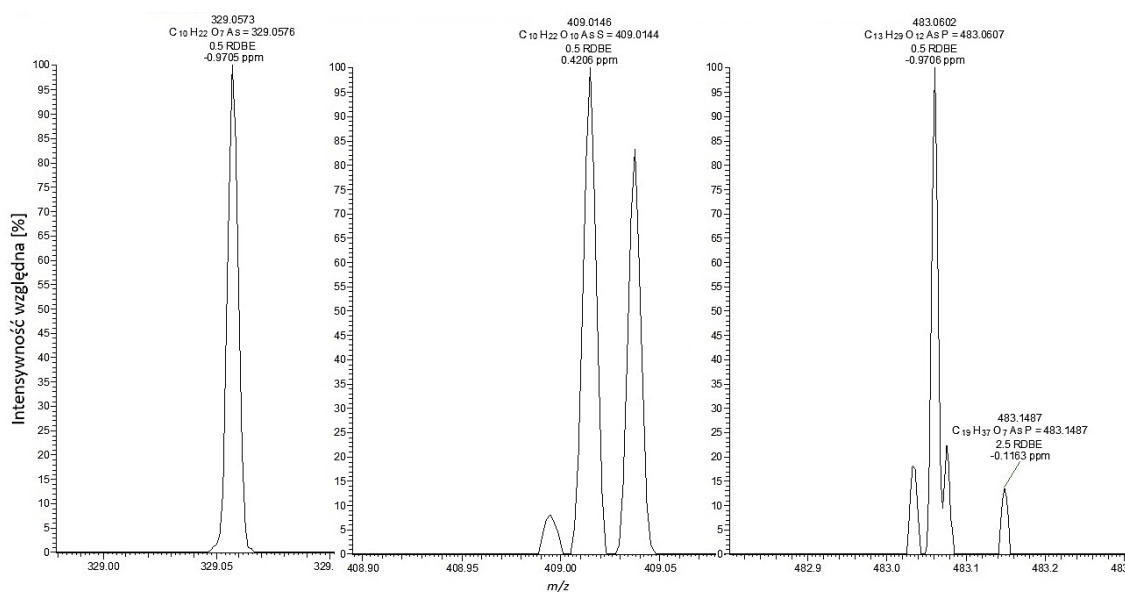
#### *Bilans analizy specjacyjnej/zawartości całkowitej arsenu w badanych próbkach alg.*

Na podstawie wyników uzyskanych podczas oznaczania zawartości całkowitych ex tAs przedstawionych w tabeli 32 oraz sumy stężeń form specjacyjnych As przedstawionych w tabeli

32 oszacowano bilans analizy specyjacyjnej/zawartości całkowitej As w badanych próbkach zgodnie z równaniem (10). Ponieważ szacowanie bilansu analizy specyjacyjnej/zawartości całkowitej As prowadzono na podstawie wartości  $ex\ tAs$  wartość związaną z zawartością niewyekstrahowanych form specyjnych przyjęto jako 0. W prowadzonych badaniach przyjęto założenie, że z kolumny chromatograficznej wymywały się wszystkie obecne w badanych próbkach formy specyjne. Wartość parametru związanego ze stężeniem form specyjnych niewymytych z kolumny przyjęto jako 0. Oszacowane zawartości uAs wahały się od 28% do 100% wyekstrahowanego z próbek alg arsenu całkowitego, co zostało przedstawione w tabeli 32.

#### *Identyfikacja uAs za pomocą techniki sprzężonej UPLC/ESI-MS/MS.*

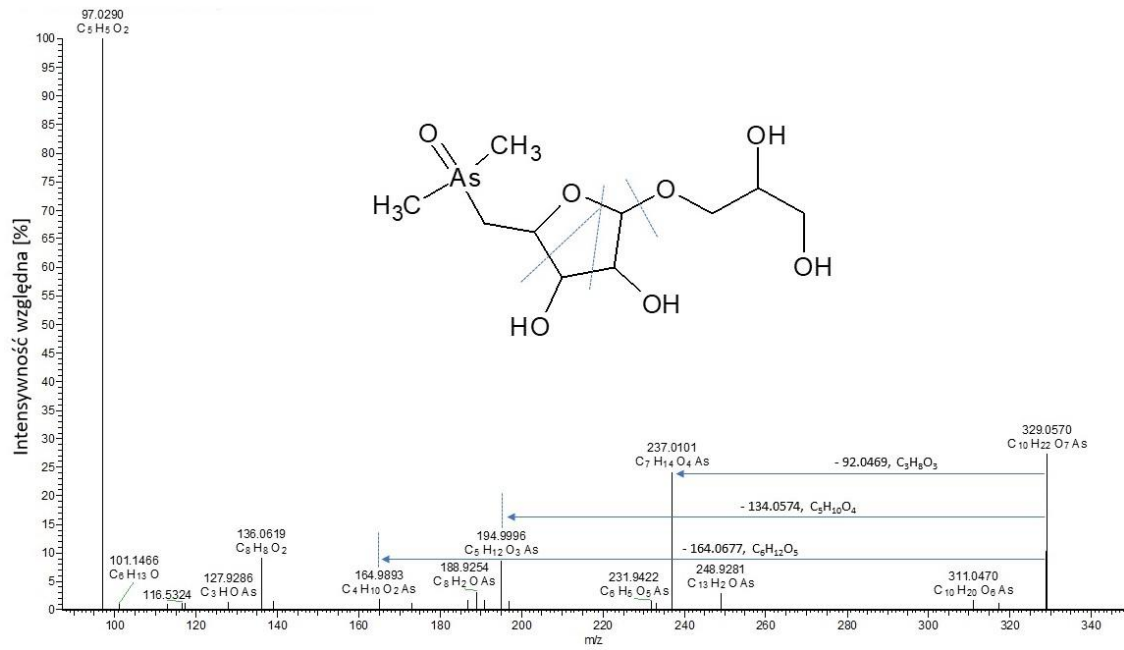
Przeprowadzono identyfikację nieznaną form specyjnych arsenu przy zastosowaniu techniki sprzężonej UPLC/ESI-MS/MS. W pierwszej kolejności przeprowadzono identyfikację dla SRM 3232 - Kelp Powder (Thallus laminariae), w którym certyfikowane jest zawartość trzech As-cukrów o masach 328u, 392u oraz 482u. Analiza SRM 3232 - Kelp Powder (Thallus laminariae) potwierdziła obecność As-cukrów certyfikowanych we wspomnianym materiale. Analizę wykonano metodą monitorowania wybranych jonów odpowiadających znanym związkom organicznym arsenu. Tym samym potwierdzono przydatność stosowanej procedury do założonych analiz. Przykładowe sygnały analityczna zarejestrowane dla SRM 3232 - Kelp Powder (Thallus laminariae) przedstawiono na rysunku 19.



Rysunek 19. Wyniki analiz SRM 3232 - Kelp Powder (Thallus laminariae) techniki sprzężonej UPLC/ESI-MS/MS.

Badania techniką sprzężoną UPLC/ESI-MS/MS przeprowadzono następnie dla ekstraktów pozostałych próbek alg. Prowadzone badania potwierdziły obecność 12 As-cukrów w badanych próbkach alg. Ponadto zidentyfikowano także szereg prostych związków organicznych As oraz potwierdzono obecność form specyjnych takich jak As(V) czy DMA. Zarejestrowano także sygnał dla nieznanego związku arsenu o jonie molekularnym  $C_6H_{12}O_5As^+$ . Przykładowe widmo fragmentacji jednego z wykrytych As-cukrów przedstawiono na rysunku 20.





Rysunek 20. Widmo fragmentacji dimetylo -As-cukru B.

Wszystkie formy specyjalne arsenu zidentyfikowane w badanych próbkach alg zestawiono w tabeli 33.

Tabela 33. Zestawienie wyników identyfikacji nieznanymi form specyjalnych arsenu w badanych próbkach alg za pomocą techniki sprzężonej UPLC/ESI-MS/MS.

[M+H] <sup>+</sup> lub [M] <sup>+</sup>			[M-H] <sup>-</sup>			Nazwa [177]	Oznaczenie próbki
Zarejestrowane m/z	Dokładność (ppm)	Wzór jonu molekularnego	Zarejestrowane m/z	Dokładność (ppm)	Wzór jonu molekularnego		
138,9736	0,898	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> As <sup>+</sup>	-	-	-	DMA (V)	4 i 5
-	-	-	140,917	4,295	H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> As <sup>-</sup>	As(V)	5
-	-	-	154,9146	2,151	CH <sub>4</sub> O <sub>2</sub> AsS <sup>-</sup>	MMMTA(V)	5
-	-	-	156,8937	0,949	H <sub>2</sub> O <sub>3</sub> AsS <sup>-</sup>	MTA (V)	5
167,0041	-4,304	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> As <sup>+</sup>	-	-	-	DMAE	3, 4 i 5
-	-	-	168,9124	1,628	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> AsS <sub>2</sub> <sup>-</sup>	DMDTA (V)	5
-	-	-	170,9095	2,243	CH <sub>4</sub> O <sub>3</sub> AsS <sup>-</sup>	MMDTA (V)	1 i 5
180,9843	1,249	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> As <sup>+</sup>	-	-	-	DMAA	3
197,015	-1,508	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> As <sup>+</sup>	-	-	-	Kwas pentyloarsonowy	3
238,9884	-4,487	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> As <sup>+</sup>	-	-	-	Nieznana	3
-	-	-	253,0057	2,116	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> As <sup>-</sup>	Dimetyloarsynoiloryboza	5
253,0412	-1,356	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> As <sup>+</sup>	-	-	-	Trimetylo-As-cukier G	3 i 4
255,0208	-2,786	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> As <sup>+</sup>	-	-	-	Dimetylo-As-cukier G	3
271,0143	-5,139	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> As <sup>+</sup>	-	-	-	Kwas 5-dimetylarsynoilo-2,3,4-Trihydroksypentanowy	3
313,0259	-1,348	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub> As <sup>+</sup>	-	-	-	Dimetylo -As-cukier M	3
327,0773	-3,166	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub> As <sup>+</sup>	-	-	-	Trimetylo -As-cukier B	2, 3 i 5
329,0573	-1,063	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub> As <sup>+</sup>	-	-	-	Dimetylo -As-cukier B	1, 2, 4 i 5
343,0636	-6,910	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> As <sup>+</sup>	-	-	-	Dimetylo -As-cukier E	3
393,0191	-1,010	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub> AsS <sup>+</sup>	391,0057	4,747	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub> AsS <sup>-</sup>	Dimetylo -As-cukier A	2,3 i 5
409,0144	-0,048	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> AsS <sup>+</sup>	407,0024	3,585	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> AsS <sup>-</sup>	Dimetylo -As-cukier C	1, 2 i 5
483,0607	-0,023	C <sub>12</sub> H <sub>29</sub> O <sub>12</sub> AsP <sup>+</sup>	481,0471	4,253	C <sub>13</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub> AsP <sup>-</sup>	Trimetylo -As-cukier D	2,3 i 5
-	-	-	497,0239	3,439	C <sub>13</sub> H <sub>27</sub> O <sub>11</sub> AsPS <sup>-</sup>	Dimetylo -S-As-cukier D	3

Największą ilość związków arsenu wykryto w próbkach Nori oraz SRM 3232 - Kelp Powder (Thallus laminariae), odpowiednio 13 oraz 12 związków. W przypadku pozostałych próbek wodorostów wykryto odpowiednio: 3 związki dla CRM 7405-a: Trace Elements and Arsenic Compounds in Seaweed, oraz po 4 związki dla przetworzonych wodorostów Hijiki oraz Morszczyku piłkowanego. Wyniki prowadzonych badań potwierdziły, że fakt oznaczenia wysokich stężeń tAs w próbkach żywności nie musi być jednoznaczny z wysoką zawartością toksycznych, nieorganicznych form tego pierwiastka w badanych próbkach. Nie mniej obecność szerokiej gamy As-cukrów w badanych próbkach alg wraz z dotychczas niepotwierdzonym działaniem toksycznym lub nietoksycznym tej grupy związków arsenu wskazuje potrzebę dalszych badań z obszaru toksykologii arsenu.

## Podsumowanie i wnioski

Jakość oraz bezpieczeństwo żywności zależą od wielu czynników fizycznych, chemicznych oraz biologicznych. Jednym z najważniejszych spośród czynników chemicznych jest zanieczyszczenie żywności toksycznymi pierwiastkami chemicznymi. W obecnym stanie wiedzy wiadomym jest, że toksyczność pierwiastków chemicznych zależy nie tylko od dawki czy drogi podania, ale także od formy chemicznej w jakiej dany pierwiastek chemiczny dostaje się do organizmu. Z tego względu informacja o całkowitej zawartości danego pierwiastka w żywności nie zawsze jest wystarczająca do oceny jakości oraz bezpieczeństwa badanej żywności.

Analiza specjacyjna pierwiastków chemicznych jest ważnym wyzwaniem w badaniu produktów żywnościowych. Dzięki zastosowaniu zaawansowanej techniki sprzężonej takiej jak LC/ICP-MS możliwe jest oznaczanie form specjacyjnych wielu pierwiastków chemicznych w próbkach żywności ciekłej i stałej przy zachowaniu niskich wartości granic wykrywalności oraz dobrej precyzji i czułości pomiarów. Mimo niewątpliwych zalet techniki LC/ICP-MS do jej największych ograniczeń należy fakt, że identyfikacja oznaczanych form specjacyjnych pierwiastków chemicznych możliwa jest tylko poprzez porównanie czasów retencji z kolumny chromatograficznej. W przypadku, kiedy brak jest komercyjnie dostępnych wzorców, co w przypadku złożonych organicznych form specjacyjnych pierwiastków chemicznych jest niezwykle częste, identyfikacja wykrywanych związków chemicznych za pomocą techniki LC/ICP-MS jest niemożliwa. W takiej sytuacji konieczne jest poszukiwanie alternatywy, którą może być zastosowanie techniki komplementarnej umożliwiającej identyfikację obserwowanych związków chemicznych. Techniką taką najczęściej jest spektrometria molekularna, ESI-MS/MS. Zastosowanie ESI-MS/MS pozwala z dużym prawdopodobieństwem zidentyfikować wykrywane organiczne oraz nieorganiczne związki chemiczne. Zastosowanie dwóch komplementarnych technik sprzężonych do badania tej samej próbki żywności daje zdecydowanie szerszy obraz specjacji.

W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono badania specjacji pierwiastków toksycznych As, Cr i Sb w próbkach żywności ciekłych i stałych sprzężonymi technikami komplementarnymi LC/ICP-MS oraz ESI-MS/MS. W ramach prowadzonych badań opracowano procedury analityczne, które poddano procesowi walidacji. W każdym z prowadzonych eksperymentów oszacowano budżet niepewności wyników pomiarów oraz zapewniono spójność pomiarową wyników pomiarów. Opracowane procedury analityczne z powodzeniem zastosowano w analizie specjacyjnej próbek rzeczywistych butelkowanych wód mineralnych, smakowych i funkcjonalnych oraz alg i produktów przetworzonych z alg. Przedstawione badania specjacji pierwiastków toksycznych w próbkach żywności ciekłej i stałej technikami sprzężonymi LC/ICP-

DRC-MS i ESI-MS/MS wzbogacają wiedzę dotyczącą obecności różnorodnych nieorganicznych i organicznych form specjacyjnych pierwiastków toksycznych w żywności.

Poniżej przedstawione są wnioski wynikające z przeprowadzonych badań w ramach pracy doktorskiej:

#### **A. Badanie specjacji pierwiastków chemicznych w próbkach żywności ciekłej**

*Badanie wpływu materiału i koloru opakowania na specjację As, Cr i Sb w butelkowanych wodach mineralnych*

1. Rozszerzono zakres stosowalności procedury analitycznej dotyczącej wielopierwiastkowej analizy specjacyjnej pięciu toksycznych form trzech pierwiastków: As, Cr i Sb w jednej procedurze analitycznej [110]. Procedurę zastosowano do badania specjacji wymienionych pierwiastków w butelkowanych wodach mineralnych o średniej oraz wysokiej zawartości składników rozpuszczonych;
2. Przeprowadzono ponowną walidację wybranych parametrów procedury analitycznej w celu potwierdzenia nowego zakresu stosowalności;
3. Przeprowadzono analizę próbek rzeczywistych butelkowanych wód mineralnych pod kątem wpływu materiału oraz koloru pojemnika na zawartość form specjacyjnych As, Cr i Sb w wodzie;
4. Potwierdzono zależność między materiałem i kolorem pojemnika a zawartością form specjacyjnych As(III), As(V), Cr(VI) oraz Sb(V) w butelkowanych wodach mineralnych. W wodzie przechowywanej w butelkach szklanych obserwowano podwyższone stężenie As(III) oraz As(V). W wodzie przechowywanej w butelkach z tworzywa PET obserwowano podwyższone stężenie Sb(V). W butelkach koloru zielonego, niezależnie od stosowanego materiału, obserwowano podwyższone stężenie Cr(VI);

*Badanie specjacji arsenu, chromu i antymonu w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych*

1. W ramach rozwinięcia problematyki obecności form specjacyjnych As, Cr i Sb w butelkowanej wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi oraz napojach opracowano procedury analityczne badania pięciu toksycznych form specjacyjnych trzech pierwiastków w jednej procedurze analitycznej w butelkowanych wodach smakowych oraz funkcjonalnych;
2. Ze względu na bogaty skład matrycy butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych oraz szereg dodatków konserwujących, smakowych i funkcjonalnych stosowanych w tego typu napojach opracowano cztery procedury analityczne: a) wielopierwiastkowa analiza specjacyjna As(III), As(V), Cr(VI), Sb(III) i Sb(V), b) analiza specjacyjna arsenu AsB, As(III), DMA, MMA i As(V), c) poszukiwanie kompleksów organicznych As, Cr i Sb z zastosowaniem chromatografii wykluczania oraz d) identyfikację organicznych kompleksów As, Cr i Sb za pomocą spektrometrii cząsteczkowej;
3. Opracowane procedury zwalidowano, oszacowano niepewność wyników pomiarów oraz zapewniono spójność pomiarową wyników pomiarów;
4. Opracowane procedury zastosowano do analizy próbek rzeczywistych butelkowanych wód smakowych oraz funkcjonalnych;

5. W badanych próbkach potwierdzono obecność form specjacyjnych takich jak AsB, As(III), As(V), Cr(III) oraz Sb(V);
6. W wyniku przeprowadzonego bilansu analizy specjacyjnej/zawartości całkowitej As, Cr i Sb w badanych próbkach potwierdzono fakt, że zawartość całkowita As, Cr i Sb nie jest równa sumie stężeń znanych form specjacyjnych tych pierwiastków,
7. Na podstawie wyników poszukiwania kompleksów organicznych As, Cr i Sb z zastosowaniem chromatografii wykluczania stwierdzono obecność niezidentyfikowanych form specjacyjnych As, Cr oraz Sb w badanych próbkach;
8. Podjęto próbę badania struktury nieznanymi form specjacyjnych As, Cr i Sb, za pomocą spektrometrii cząsteczkowej. Zarejestrowano widma fragmentacji sugerujące obecność organicznych kompleksów arsenu w badanych próbkach. Nie było możliwości uzyskania satysfakcjonujących wartości delty ppm pozwalających na potwierdzenie obecności kompleksów organicznych As, Cr i Sb w butelkowanych wodach smakowych i funkcjonalnych;
9. Przeprowadzono szacowanie ryzyka związanego z konsumpcją butelkowanych wód mineralnych, smakowych oraz funkcjonalnych w odniesieniu do innego niż rakotwórcze negatywnego działania As, Cr i Sb na organizm ludzki;
10. Uzyskane wyniki potwierdziły brak ryzyka związanego z konsumpcją butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych a oznaczone formy specjacyjne obniżyły ryzyko w porównaniu z ryzykiem oszacowanym dla zawartości całkowitych As, Cr i Sb.

#### ***B. Badanie specjacji arsenu w próbkach żywności stałej***

##### *Badanie specjacji arsenu w przetworzonych produktach żywnościowych z alg*

1. Oznaczono zawartość arsenu całkowitego w próbkach alg po mineralizacji oraz zawartość arsenu całkowitego w ekstraktach z alg;
2. Przeprowadzono optymalizację procesu ekstrakcji arsenu z alg przy wykorzystaniu dwóch technik ekstrakcji: 1) ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami oraz ekstrakcja wspomagana mikrofalami oraz przy zastosowaniu trzech ekstrahentów: 1) woda, 2) mieszanina woda: metanol (1:1, v/v) oraz 3) kwas azotowy 1% (w/w);
3. Opracowano procedury analizy specjacyjnej arsenu w algach: 1) analiza specjacyjna arsenu AsB, As(III), DMA, MMA oraz As(V) za pomocą techniki sprzężonej HPLC/ICP-DRC-MS oraz 2) identyfikacja nieznanymi form specjacyjnych arsenu przy zastosowaniu techniki sprzężonej UPLC/ESI-MS/MS;
4. Opracowane procedury zwalidowano, oszacowano niepewność wyników pomiarów oraz zapewniono spójność pomiarową wyników pomiarów;
5. Opracowane procedury zastosowano w analizie próbek rzeczywistych alg oraz produktów żywnościowych przetworzonych z alg;
6. W wyniku przeprowadzonych badań potwierdzono obecność w badanych próbkach form specjacyjnych As takich jak: AsB, As(III), DMA oraz As(V) a także obecność w badanych próbkach As-cukrów (12 związków) oraz szeregu innych prostych organicznych związków As.

## Literatura

- [1] I. Baranowska, Analiza śladowa : zastosowania, Wydawnictwo MALAMUT, 2013.
- [2] I. Baranowska, Handbook of trace analysis: Fundamentals and applications, Springer, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19614-5>.
- [3] Y. Picó, Food Contaminants And Residue Analysis, in: Elsevier, Amsterdam, 2008: p. v. [https://doi.org/10.1016/s0166-526x\(08\)00032-9](https://doi.org/10.1016/s0166-526x(08)00032-9).
- [4] D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.-G. Danielsson, H. Muntau, H.P. van Leeuwen, R. Lobinski, Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000), Pure Appl. Chem. (2000). <https://doi.org/10.1351/pac200072081453>.
- [5] D. Barańkiewicz, E. Bulska, Specjacja chemiczna : problemy i możliwości, Wydawnictwo Malamut, 2009.
- [6] I. Pais, J.B. Jones, The handbook of trace elements, CRC Press, 1997.
- [7] R. Cornelis, J. Caruso, H. Crews, K. Heumann, Handbook of elemental speciation II: Species in the environment, food, medicine and occupational health, John Wiley & Sons, Ltd, 2005. <https://doi.org/10.1002/0470856009>.
- [8] H. Matusiewicz, E. Bulska, Inorganic Trace Analytics, Trace Element Analysis and Speciation, De Gruyter, 2017. <https://doi.org/10.1515/9783110366730>.
- [9] D.C. Adriano, Trace Elements in Terrestrial Environments, Springer, 2001. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-21510-5>.
- [10] E. Merian, M. Anke, M. Ihnat, M. Stoepler, Elements and Their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance, Second Edition, VCH, 2004. <https://doi.org/10.1002/9783527619634>.
- [11] WHO, Guidelines for Drinking-water Quality, World Health Organization, Geneva, 2011. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151\\_eng.pdf;jsessionid=BAD081351590F52C17A489C15E887256?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151_eng.pdf;jsessionid=BAD081351590F52C17A489C15E887256?sequence=1) (accessed June 10, 2019).
- [12] M. Molin, S.M. Ulven, H.M. Meltzer, J. Alexander, Arsenic in the human food chain, biotransformation and toxicology - Review focusing on seafood arsenic, J. Trace Elem. Med. Biol. 31 (2015) 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2015.01.010>.
- [13] D.J. Thomas, K. Bradham, Role of complex organic arsenicals in food in aggregate exposure to arsenic, J. Environ. Sci. (China). 49 (2016) 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.06.005>.
- [14] H. Peng, B. Hu, Q. Liu, J. Li, X.F. Li, H. Zhang, X.C. Le, Methylated Phenylarsenical Metabolites Discovered in Chicken Liver, Angew. Chemie - Int. Ed. 56 (2017) 6773–6777. <https://doi.org/10.1002/anie.201700736>.
- [15] Q. Liu, H. Peng, X. Lu, X.C. Le, Enzyme-assisted extraction and liquid chromatography mass spectrometry for the determination of arsenic species in chicken meat, Anal. Chim. Acta. 888 (2015) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.001>.
- [16] M. Marcinkowska, D. Barańkiewicz, Multielemental speciation analysis by advanced hyphenated technique – HPLC/ICP-MS: A review, Talanta. 161 (2016) 177–204.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.034>.

- [17] M. He, N. Wang, X. Long, C. Zhang, C. Ma, Q. Zhong, A. Wang, Y. Wang, A. Pervaiz, J. Shan, Antimony speciation in the environment: Recent advances in understanding the biogeochemical processes and ecological effects, *J. Environ. Sci. (China)*. 75 (2019) 14–39. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.05.023>.
- [18] M. Filella, P.A. Williams, N. Belzile, Antimony in the environment: Knowns and unknowns, *Environ. Chem.* 6 (2009) 95–105. <https://doi.org/10.1071/EN09007>.
- [19] P. Smichowski, Y. Madrid, C. Cámara, Analytical methods for antimony speciation in waters at trace and ultratrace levels. A review, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 360 (1998) 623–629. <https://doi.org/10.1007/s002160050770>.
- [20] X. Yu, C. Liu, Y. Guo, T. Deng, Speciation analysis of trace arsenic, mercury, selenium and antimony in environmental and biological samples based on hyphenated techniques, *Molecules*. 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24050926>.
- [21] S.C. Wilson, P. V. Lockwood, P.M. Ashley, M. Tighe, The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: A critical review, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 1169–1181. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.045>.
- [22] C. Reimann, M. Birke, P. Filzmoser, Bottled drinking water: Water contamination from bottle materials (glass, hard PET, soft PET), the influence of colour and acidification, *Appl. Geochemistry*. 25 (2010) 1030–1046. <https://doi.org/10.1016/J.APGEOCHEM.2010.04.009>.
- [23] C.A. Chapa-Martínez, L. Hinojosa-Reyes, A. Hernández-Ramírez, E. Ruiz-Ruiz, L. Maya-Treviño, J.L. Guzmán-Mar, An evaluation of the migration of antimony from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water, *Sci. Total Environ.* 565 (2016) 511–518. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.04.184>.
- [24] R. Miravet, E. Hernández-Nataren, A. Sahuquillo, R. Rubio, J.F. López-Sánchez, Speciation of antimony in environmental matrices by coupled techniques, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.10.006>.
- [25] H.R. Hansen, S.A. Pergantis, Detection of antimony species in citrus juices and drinking water stored in PET containers, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 731–733. <https://doi.org/10.1039/b606367e>.
- [26] J.J. Coetzee, N. Bansal, E.M.N. Chirwa, Chromium in Environment, Its Toxic Effect from Chromite-Mining and Ferrochrome Industries, and Its Possible Bioremediation, *Expo. Heal.* (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12403-018-0284-z>.
- [27] A. Sharma, D. Kapoor, J. Wang, B. Shahzad, V. Kumar, A.S. Bali, S. Jasrotia, B. Zheng, H. Yuan, D. Yan, Chromium Bioaccumulation and Its Impacts on Plants: An Overview, *Plants*. 9 (2020) 100. <https://doi.org/10.3390/plants9010100>.
- [28] D. Raj, S.K. Maiti, Sources, bioaccumulation, health risks and remediation of potentially toxic metal(loid)s (As, Cd, Cr, Pb and Hg): an epitomised review, *Environ. Monit. Assess.* 192 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10661-019-8060-5>.
- [29] E.M. Hamilton, S.D. Young, E.H. Bailey, M.J. Watts, Chromium speciation in foodstuffs: A review, *Food Chem.* 250 (2018) 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.016>.
- [30] M. Marcinkowska, W. Lorenc, D. Barańkiewicz, Study of the impact of bottles material

- and color on the presence of AsIII, AsV, SbIII, SbV and CrVI in matrix-rich mineral water — Multielemental speciation analysis by HPLC/ICP-DRC-MS, *Microchem. J.* 132 (2017) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.11.022>.
- [31] N. Krasnići, Z. Dragun, M. Erk, B. Raspor, Distribution of selected essential (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, and Zn) and nonessential (Cd, Pb) trace elements among protein fractions from hepatic cytosol of European chub (*Squalius cephalus* L.), *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (2013) 2340–2351. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1105-8>.
- [32] D. Barańkiewicz, M. Kózka, A. Piechalak, B. Tomaszewska, P. Sobczak, Determination of cadmium and lead species and phytochelatins in pea (*Pisum sativum*) by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MSn, *Talanta.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.04.026>.
- [33] H. Zaier, A. Mudarra, D. Kutscher, M.R.F. de la Campa, C. Abdelly, A. Sanz-Medel, Induced lead binding phytochelatins in *Brassica juncea* and *Sesuvium portulacastrum* investigated by orthogonal chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 671 (2010) 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.054>.
- [34] M.P. Chantada-Vázquez, A. Moreda-Piñeiro, M.C. Barciela-Alonso, P. Bermejo-Barrera, Spectrometric-based techniques for metal-binding protein assessment in clinical, environmental, and food samples, *Appl. Spectrosc. Rev.* 52 (2017) 145–174. <https://doi.org/10.1080/05704928.2016.1213736>.
- [35] E.S. Ravipati, N.N. Mahajan, S. Sharma, K. V. Hatware, K. Patil, The toxicological effects of lead and its analytical trends: an update from 2000 to 2018, *Crit. Rev. Anal. Chem.* (2019) 1–16. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1678381>.
- [36] J. Szpunar, P. Pellerin, A. Makarov, T. Doco, P. Williams, B. Medina, R. Łobiński, Speciation analysis for biomolecular complexes of lead in wine by size-exclusion high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 749–754. <https://doi.org/10.1039/A803038C>.
- [37] M.T. Vasconcelos, M. Azenha, V. de Freitas, Electrochemical studies of complexation of Pb in red wines, *Analyst.* 125 (2000) 743–748. <https://doi.org/10.1039/a909591h>.
- [38] I. Zwolak, The Role of Selenium in Arsenic and Cadmium Toxicity: an Updated Review of Scientific Literature, *Biol. Trace Elem. Res.* 193 (2020) 44–63. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01691-w>.
- [39] H. Zhang, M. Reynolds, Cadmium exposure in living organisms: A short review, *Sci. Total Environ.* 678 (2019) 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.395>.
- [40] H. Zhang, M. Reynolds, Cadmium exposure in living organisms: A short review, *Sci. Total Environ.* 678 (2019) 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.395>.
- [41] K. Peeters, T. Zuliani, D. Žigon, R. Milačič, J. Ščancar, Nickel speciation in cocoa infusions using monolithic chromatography – Post-column ID-ICP-MS and Q-TOF-MS, *Food Chem.* 230 (2017) 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.050>.
- [42] J. Ščančar, T. Zuliani, D. Žigon, R. Milačič, Ni speciation in tea infusions by monolithic chromatography - ICP-MS and Q-TOF-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 2041–2051. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6611-5>.
- [43] R.T. Lavradas, R.C.C. Rocha, T.D. Saint' Pierre, J.M. Godoy, R.A. Hauser-Davis, Investigation of thermostable metalloproteins in *Perna perna* mussels from differentially



- contaminated areas in Southeastern Brazil by bioanalytical techniques, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 34 (2016) 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.01.003>.
- [44] D.J. Kutscher, A. Sanz-Medel, J. Bettmer, Metallomics investigations on potential binding partners of methylmercury in tuna fish muscle tissue using complementary mass spectrometric techniques, *Metallomics*. 4 (2012) 807–813. <https://doi.org/10.1039/c2mt20055d>.
- [45] Natasha, M. Shahid, S. Khalid, I. Bibi, J. Bundschuh, N. Khan Niazi, C. Dumat, A critical review of mercury speciation, bioavailability, toxicity and detoxification in soil-plant environment: Ecotoxicology and health risk assessment, *Sci. Total Environ.* 711 (2020) 134749. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134749>.
- [46] Institute of Medicine (U.S.), Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids, National Academy Press, 2000. <https://doi.org/10.17226/9810>.
- [47] H. Ullah, G. Liu, B. Yousaf, M.U. Ali, S. Irshad, Q. Abbas, R. Ahmad, A comprehensive review on environmental transformation of selenium: recent advances and research perspectives, *Environ. Geochem. Health.* 41 (2019) 1003–1035. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0195-8>.
- [48] R. Khanam, A. Kumar, A.K. Nayak, M. Shahid, R. Tripathi, S. Vijayakumar, D. Bhaduri, U. Kumar, S. Mohanty, P. Panneerselvam, D. Chatterjee, B.S. Satapathy, H. Pathak, Metal(loid)s (As, Hg, Se, Pb and Cd) in paddy soil: Bioavailability and potential risk to human health, *Sci. Total Environ.* 699 (2020) 134330. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134330>.
- [49] K. Pyrzyńska, Determination of selenium species in environmental samples, *Mikrochim. Acta.* 140 (2002) 55–62. <https://doi.org/10.1007/s00604-001-0899-8>.
- [50] M. Kieliszek, Selenium—fascinating microelement, properties and sources in food, *Molecules*. 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24071298>.
- [51] N. Oyamada, M. Ishizaki, Fractional Determination of Dissolved Selenium Compounds of Trimethylselenonium Ion, Selenium(IV) and Selenium(VI) in Environmental Water Samples, *Anal. Sci.* 2 (1986) 365–369. <https://doi.org/10.2116/analsci.2.365>.
- [52] D. Tanzer, K.G. Heumann, GC determination of dimethyl selenide and trimethyl selenonium ions in aquatic systems using element specific detection, *Atmos. Environ. Part A. Gen. Top.* 24 (1990) 3099–3102. [https://doi.org/10.1016/0960-1686\(90\)90491-5](https://doi.org/10.1016/0960-1686(90)90491-5).
- [53] L.H. Reyes, J.L.G. Mar, G.M.M. Rahman, B. Seybert, T. Fahrenholz, H.M.S. Kingston, Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography—inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta*. 78 (2009) 983–990. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.01.003>.
- [54] WHO, Environmental Health Criteria 221: Zinc, (2013). [https://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc\\_221/en/](https://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc_221/en/) (accessed February 23, 2020).
- [55] Institute of Medicine (U.S.), Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, National Academies Press, 2001. <https://doi.org/10.17226/10026>.
- [56] L. Ruzik, P. Kwiatkowski, Application of CE-ICP-MS and CE-ESI-MS/MS for identification of Zn-binding ligands in Goji berries extracts, *Talanta*. 183 (2018) 102–107.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.040>.

- [57] J. Wojcieszek, P. Kwiatkowski, L. Ruzik, Speciation analysis and bioaccessibility evaluation of trace elements in goji berries (*Lycium Barbarum*, L.), *J. Chromatogr. A.* 1492 (2017) 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.069>.
- [58] H.G. Infante, F. Cuyckens, K. Van Campenhout, R. Blust, M. Claeys, L. Van Vaeck, F.C. Adams, Characterization of metal complexes with metallothioneins in the liver of the carp *Cyprinus carpio* by reversed-phase HPLC with ICP-MS and electrospray ionization (ESI)-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 159–166. <https://doi.org/10.1039/b308032n>.
- [59] WHO, Environmental Health Criteria 200: Copper, (1998) 360. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc200.htm> (accessed February 23, 2020).
- [60] Á.H. Pétursdóttir, J. Rodrigues De Jesus, H. Gunnlaugsdóttir, J. Feldmann, Quantification of labile and stable non-polar arsenolipids in commercial fish meals and edible seaweed samples, *J. Anal. At. Spectrom.* 33 (2018) 102–110. <https://doi.org/10.1039/c7ja00333a>.
- [61] K.O. Amayo, A. Petursdottir, C. Newcombe, H. Gunnlaugsdottir, A. Raab, E.M. Krupp, J. Feldmann, Identification and quantification of arsenolipids using reversed-phase HPLC coupled simultaneously to high-resolution ICPMS and high-resolution electrospray MS without species-specific standards, *Anal. Chem.* 83 (2011) 3589–3595. <https://doi.org/10.1021/ac2005873>.
- [62] É.R. Pereira, J.F. Kopp, A. Raab, E.M. Krupp, J.D.C. Menoyo, E. Carasek, B. Welz, J. Feldmann, Arsenic containing medium and long chain fatty acids in marine fish oil identified as degradation products using reversed-phase HPLC-ICP-MS/ESI-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 1836–1845. <https://doi.org/10.1039/c6ja00162a>.
- [63] K.O. Amayo, A. Raab, E.M. Krupp, J. Feldmann, Identification of arsenolipids and their degradation products in cod-liver oil, *Talanta.* 118 (2014) 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.056>.
- [64] V. Sele, J.J. Sloth, B. Holmelid, S. Valdersnes, K. Skov, H. Amlund, Arsenic-containing fatty acids and hydrocarbons in marine oils - Determination using reversed-phase HPLC-ICP-MS and HPLC-qTOF-MS, *Talanta.* 121 (2014) 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.049>.
- [65] V. Nischwitz, S.A. Pergantis, Improved arsenic speciation analysis for extracts of commercially available edible marine algae using HPLC-ES-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 6507–6519. <https://doi.org/10.1021/jf060971j>.
- [66] S. McSheehy, P. Pohl, R. Lobiński, J. Szpunar, Investigation of arsenic speciation in oyster test reference material by multidimensional HPLC-ICP-MS and electrospray tandem mass spectrometry (ES-MS-MS), *Analyst.* 126 (2001) 1055–1062. <https://doi.org/10.1039/b102225n>.
- [67] J.M. Ronan, D.B. Stengel, A. Raab, J. Feldmann, L. O’Hea, E. Bralatei, E. McGovern, High proportions of inorganic arsenic in *Laminaria digitata* but not in *Ascophyllum nodosum* samples from Ireland, *Chemosphere.* 186 (2017) 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.076>.
- [68] Y.J. Hsieh, S.J. Jiang, Application of HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS procedures for arsenic speciation in seaweeds, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 2083–2089. <https://doi.org/10.1021/jf204595d>.

- [69] K.O. Amayo, A. Raab, E.M. Krupp, T. Marschall, M. Horsfall, J. Feldmann, Arsenolipids show different profiles in muscle tissues of four commercial fish species, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 28 (2014) 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.11.004>.
- [70] C. Garcia-Sartal, S. Taebunpakul, E. Stokes, M. del C. Barciela-Alonso, P. Bermejo-Barrera, H. Goenaga-Infante, Two-dimensional HPLC coupled to ICP-MS and electrospray ionisation (ESI)-MS/MS for investigating the bioavailability in vitro of arsenic species from edible seaweed, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 3359–3369. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5483-4>.
- [71] M.S. Taleshi, J.S. Edmonds, W. Goessler, M.J. Ruiz-Chancho, G. Raber, K.B. Jensen, K.A. Francesconi, Arsenic-Containing Lipids Are Natural Constituents of Sashimi Tuna, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 1478–1483. <https://doi.org/10.1021/es9030358>.
- [72] Y. He, Z. Chen, F. Mo, L. Huang, L. Xu, Y. Wu, Z. Xue, F. Fu, Species characteristics of lead in sea foods collected from coastal water of Fujian, Southeastern of China, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep33294>.
- [73] Y. Ogra, K. Ishiwata, Y. Iwashita, K.T. Suzuki, Simultaneous speciation of selenium and sulfur species in selenized odorless garlic (*Allium sativum* L. Shiro) and shallot (*Allium ascalonicum*) by HPLC-inductively coupled plasma-(octopole reaction system)-mass spectrometry and electrospray ionization-tand, *J. Chromatogr. A.* 1093 (2005) 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.081>.
- [74] S.B. Jayasinghe, J.A. Caruso, Investigation of Se-containing proteins in *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Brazil nuts) by ICPMS, MALDI-MS and LC-ESI-MS methods, *Int. J. Mass Spectrom.* 307 (2011) 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2010.12.005>.
- [75] J. Moreda-Piñero, J. Sánchez-Piñero, A. Mañana-López, I. Turnes-Carou, E. Alonso-Rodríguez, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, Selenium species determination in foods harvested in Seleniferous soils by HPLC-ICP-MS after enzymatic hydrolysis assisted by pressurization and microwave energy, *Food Res. Int.* 111 (2018) 621–630. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.003>.
- [76] M. Dernovics, P. Giusti, R. Lobinski, ICP-MS-assisted nanoHPLC-electrospray Q/time-of-flight MS/MS selenopeptide mapping in Brazil nuts, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 41–50. <https://doi.org/10.1039/b608041c>.
- [77] E. Dumont, L. De Pauw, F. Vanhaecke, R. Cornelis, Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack?, *Anal. Nutr. Clin. Methods.* (n.d.). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.004>.
- [78] J. Bianga, E. Govasmark, J. Szpunar, Characterization of selenium incorporation into wheat proteins by two-dimensional gel electrophoresis-laser ablation ICP MS followed by capillary HPLC-ICP MS and electrospray linear trap quadrupole orbitrap MS, *Anal. Chem.* 85 (2013) 2037–2043. <https://doi.org/10.1021/ac3033799>.
- [79] P. Cheajesadagul, J. Bianga, C. Arnaudguilhem, R. Lobinski, J. Szpunar, Large-scale speciation of selenium in rice proteins using ICP-MS assisted electrospray MS/MS proteomics, *Metallomics.* 6 (2014) 646–653. <https://doi.org/10.1039/c3mt00299c>.
- [80] F.A. Aborode, A. Raab, M. Voigt, L.M. Costa, E.M. Krupp, J. Feldmann, The importance of glutathione and phytochelatins on the selenite and arsenate detoxification in *Arabidopsis thaliana*, *J. Environ. Sci. (China).* 49 (2016) 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.08.009>.

- [81] L. Chen, Y. Guo, L. Yang, Q. Wang, SEC-ICP-MS and ESI-MS/MS for analyzing in vitro and in vivo Cd-phytochelatin complexes in a Cd-hyperaccumulator *Brassica chinensis*, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 1403–1408. <https://doi.org/10.1039/b707830g>.
- [82] Y. Anan, M. Yoshida, S. Hasegawa, R. Katai, M. Tokumoto, L. Ouerdane, R. Łobiński, Y. Ogra, Speciation and identification of tellurium-containing metabolites in garlic, *Allium sativum*, *Metallomics*. 5 (2013) 1215–1224. <https://doi.org/10.1039/c3mt00108c>.
- [83] A.P. Navaza, M. Montes-Bayón, D.L. LeDuc, N. Terry, A. Sanz-Medel, Study of phytochelatin and other related thiols as complexing biomolecules of As and Cd in wild type and genetically modified *Brassica juncea* plants, in: *J. Mass Spectrom.*, 2006: pp. 323–331. <https://doi.org/10.1002/jms.992>.
- [84] J. Zheng, A. Iijima, N. Furuta, Complexation effect of antimony compounds with citric acid and its application to the speciation of antimony(III) and antimony(V) using HPLC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 812–818. <https://doi.org/10.1039/b101943k>.
- [85] K. Peeters, T. Zuliani, D.Z. Igon, R. Milačič, J. Ščančar, Nickel speciation in cocoa infusions using monolithic chromatography – Post-column ID-ICP-MS and Q-TOF-MS, (2017). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.050>.
- [86] J. Feldmann, A. Raab, E.M. Krupp, Importance of ICPMS for speciation analysis is changing: future trends for targeted and non-targeted element speciation analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 661–667. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0502-8>.
- [87] B. Meermann, V. Nischwitz, ICP-MS for the analysis at the nanoscale – a tutorial review, *J. Anal. At. Spectrom.* 33 (2018) 1432–1468. <https://doi.org/10.1039/C8JA00037A>.
- [88] M. Montes-Bayón, J. Meija, D.L. LeDuc, N. Terry, J.A. Caruso, A. Sanz-Medel, HPLC-ICP-MS and ESI-Q-TOF analysis of biomolecules induced in *Brassica juncea* during arsenic accumulation, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 153–158. <https://doi.org/10.1039/b308986j>.
- [89] S. Shao, X. Mi, L. Ouerdane, R. Lobinski, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, A. Vass, M. Dernovics, Quantification of Se-Methylselenocysteine and Its  $\gamma$ -Glutamyl Derivative from Naturally Se-Enriched Green Bean (*Phaseolus vulgaris vulgaris*) After HPLC-ESI-TOF-MS and Orbitrap MSn-Based Identification, *Food Anal. Methods*. 7 (2014) 1147–1157. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9728-z>.
- [90] L. Ruzik, P. Kwiatkowski, Application of CE-ICP-MS and CE-ESI-MS/MS for identification of Zn-binding ligands in Goji berries extracts, *Talanta*. 183 (2018) 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.040>.
- [91] U. Arroyo-Abad, S. Lischka, P. Christian, J. Mattusch, R. Thorsten, C. Piechotta, J. Mattusch, T. Reemtsma, Determination and identification of hydrophilic and hydrophobic arsenic species in methanol extract of fresh cod liver by RP-HPLC with simultaneous ICP-MS and ESI-Q-TOF-MS detection, *Food Chem.* 141 (2013) 3093–3102. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.152>.
- [92] D. Guimarães, A.A. Roberts, M.W. Tehrani, R. Huang, L. Smieska, A.R. Woll, S. Lin, P.J. Parsons, Characterization of arsenic in dried baby shrimp (*Acetes sp.*) using synchrotron-based X-ray spectrometry and LC coupled to ICP-MS/MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 33 (2018) 1616–1630. <https://doi.org/10.1039/c8ja00094h>.
- [93] C. Rensing, Z. Lv, X. Yang, F. Fu, K. Wang, Y. Lan, G. Yang, Z. Qiu, Species distribution characteristics of arsenic in shellfish seafood collected from Fujian Province of China, *J.*

- Food Compos. Anal. 72 (2018) 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.07.002>.
- [94] M. Contreras-Acuña, T. García-Barrera, M.A. García-Sevillano, J.L. Gómez-Ariza, Speciation of arsenic in marine food (*Anemonia sulcata*) by liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and organic mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1282 (2013) 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.068>.
- [95] S. Lischka, U. Arroyo-Abad, J. Mattusch, A. Kühn, C. Piechotta, The high diversity of arsenolipids in herring fillet (*Clupea harengus*), *Talanta.* 110 (2013) 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.02.051>.
- [96] L. Gong, Q. Xu, C. Lee, H. Zhang, Selenium speciation analysis of *Misgurnus anguillicaudatus* selenoprotein by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS/MS, *Eur. Food Res. Technol.* 235 (2012) 169–176. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1747-2>.
- [97] M. Van Hulle, C. Zhang, X. Zhang, R. Cornelis, Arsenic speciation in Chinese seaweeds using HPLC-ICP-MS and HPLC-ES-MS, *Analyst.* 127 (2002) 634–640. <https://doi.org/10.1039/b110940e>.
- [98] P. A. Gallagher, X. Wei, J. A. Shoemaker, C. A. Brockhoff, J. T. Creed, Detection of arsenosugars from kelp extracts via IC-electrospray ionization-MS-MS and IC membrane hydride generation ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1829–1834. <https://doi.org/10.1039/a906249a>.
- [99] A. Rusczyńska, A. Konopka, E. Kurek, J.C. Torres Elguera, E. Bulska, Investigation of biotransformation of selenium in plants using spectrometric methods, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 130 (2017) 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2017.02.004>.
- [100] M. Shah, S.S. Kannamkumarath, J.C.A. Wuilloud, R.G. Wuilloud, J.A. Caruso, Identification and characterization of selenium species in enriched green onion (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS and ESI-ITMS, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 381–386. <https://doi.org/10.1039/b312320k>.
- [101] S. Piovesana, C.M. Montone, M. Antonelli, C. Cavaliere, G. La Barbera, S. Canepari, R. Samperi, A. Laganà, A.L. Capriotti, Investigation of free seleno-amino acids in extra-virgin olive oil by mixed mode solid phase extraction cleanup and enantioselective hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 278 (2019) 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.053>.
- [102] Commission of the European Communities, Commission Regulation (EC) No 118/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, *Off. J. Eur. Union.* (2006) 5–24. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&from=EN> (accessed February 23, 2020).
- [103] USDA FAS Beijing Staff, China Releases the Standard for Maximum Levels of Contaminants in Foods, 2014. [https://gain.fas.usda.gov/Recent GAIN Publications/Maximum Levels of Contaminants in Foods \\_Beijing\\_China - Peoples Republic of\\_12-11-2014.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Maximum%20Levels%20of%20Contaminants%20in%20Foods%20_Beijing_China%20-%20Peoples%20Republic%20of_12-11-2014.pdf).
- [104] FAO/WHO, GENERAL STANDARD FOR CONTAMINANTS AND TOXINS IN FOOD AND FEED, 2016. [http://www.fao.org/input/download/standards/17/CXS\\_193e\\_2015.pdf](http://www.fao.org/input/download/standards/17/CXS_193e_2015.pdf) (accessed June 18, 2019).
- [105] Government of Canada, Government of Canada - Food Directorate - Bureau of Chemical Safety, (2018). <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food->

- safety/chemical-contaminants/maximum-levels-chemical-contaminants-foods.html (accessed June 18, 2019).
- [106] Government of Canada - Food Directorate - Bureau of Chemical Safety, List of Contaminants and other Adulterating Substances in Foods, (n.d.). <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/chemical-contaminants/contaminants-adulterating-substances-foods.html> (accessed June 18, 2019).
- [107] A. Etale, M. Jobin, M. Siegrist, Tap versus bottled water consumption: The influence of social norms, affect and image on consumer choice, *Appetite*. 121 (2018) 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.11.090>.
- [108] J.S. Mandlate, B.M. Soares, T.S. Seeger, P.D. Vecchia, P.A. Mello, E.M.M. Flores, F.A. Duarte, Determination of cadmium and lead at sub-ppt level in soft drinks: An efficient combination between dispersive liquid-liquid microextraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Food Chem.* 221 (2017) 907–912. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.075>.
- [109] F. Vieux, M. Maillot, C.D. Rehm, P. Barrios, A. Drewnowski, Trends in tap and bottled water consumption among children and adults in the United States: analyses of NHANES 2011–16 data, *Nutr. J.* 19 (2020) 10. <https://doi.org/10.1186/s12937-020-0523-6>.
- [110] M. Marcinkowska, I. Komorowicz, D. Barańkiewicz, New procedure for multielemental speciation analysis of five toxic species: As(III), As(V), Cr(VI), Sb(III) and Sb(V) in drinking water samples by advanced hyphenated technique HPLC/ICP-DRC-MS, *Anal. Chim. Acta.* 920 (2016) 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.039>.
- [111] P. Konieczka, J. Namieśnik, Ocena kontroli jakości wyników pomiarów analitycznych, Wydawnictwo WNT, 2017.
- [112] E. Bulska, *Metrologia chemiczna: sztuka prowadzenia pomiarów*, Wydawnictwo Malamut, 2012.
- [113] International Union of Pure Applied Chemistry, HARMONISED GUIDELINES FOR THE IN-HOUSE VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS (TECHNICAL REPORT), 2005. <http://old.iupac.org/divisions/V/501/draftoct19.pdf> (accessed February 12, 2020).
- [114] W. Hyk, Z. Stojek, *Analiza statystyczna w laboratorium badawczym*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2019.
- [115] International Conference on Harmonisation, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), (2005). [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf) (accessed January 25, 2018).
- [116] Joint Committee for Guides in Metrology, Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement, (2008). [https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf](https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf) (accessed January 25, 2018).
- [117] E. Hund, D.L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, Comparison of different approaches to estimate the uncertainty of a liquid chromatographic assay, *Anal. Chim. Acta.* 480 (2003) 39–52. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)01591-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)01591-X).
- [118] D. Barańkiewicz, B. Pikosz, M. Belter, M. Marcinkowska, Speciation analysis of chromium in drinking water samples by ion-pair reversed-phase HPLC–ICP-MS: validation of the

- analytical method and evaluation of the uncertainty budget, *Accredit. Qual. Assur.* 18 (2013) 391–401. <https://doi.org/10.1007/s00769-013-1002-y>.
- [119] B. King, The practical realization of the traceability of chemical measurements standards, *Accredit. Qual. Assur.* 5 (2000) 429–436. <https://doi.org/10.1007/s007690000207>.
- [120] V.G. Mihucz, G. Zárny, Occurrence of antimony and phthalate esters in polyethylene terephthalate bottled drinking water, *Appl. Spectrosc. Rev.* 51 (2016) 183–209. <https://doi.org/10.1080/05704928.2015.1105243>.
- [121] C. Rowell, N. Kuiper, H. Preud'Homme, Is container type the biggest predictor of trace element and BPA leaching from drinking water bottles?, *Food Chem.* 202 (2016) 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.109>.
- [122] W. Shotyk, M. Krachler, B. Chen, Contamination of Canadian and European bottled waters with antimony from PET containers, *J. Environ. Monit.* 8 (2006) 288. <https://doi.org/10.1039/b517844b>.
- [123] Ž. Fiket, N. Mikac, G. Kniewald, Determination of trace elements in wines by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry, *At. Spectrosc.* 31 (2010) 44–55. <https://doi.org/10.1007/s11595-009-4608-5>.
- [124] A. Misund, B. Frengstad, U. Siewers, C. Reimann, Variation of 66 elements in European bottled mineral waters, *Sci. Total Environ.* 243–244 (1999) 21–41. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00307-1](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00307-1).
- [125] R.W. Dabeka, H.B.S. Conacher, J.F. Lawrence, W.H. Newsome, A. McKenzie, H.P. Wagner, R.K.H. Chadha, K. Pepper, Survey of bottled drinking waters sold in Canada for chlorate, bromide, bromate, lead, cadmium and other trace elements, *Food Addit. Contam.* 19 (2002) 721–732. <https://doi.org/10.1080/02652030210140905>.
- [126] M.R. Hadiani, S. Dezfooli-manesh, S. Shoeibi, P. Ziarati, A. Mousavi Khaneghah, Trace elements and heavy metals in mineral and bottled drinking waters on the Iranian market, *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* 8 (2015) 18–24. <https://doi.org/10.1080/19393210.2014.947526>.
- [127] C. Reimann, M. Birke, P. Filzmoser, Temperature-dependent leaching of chemical elements from mineral water bottle materials, *Appl. Geochemistry.* 27 (2012) 1492–1498. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2012.05.003>.
- [128] R. Cidu, F. Frau, P. Tore, Drinking water quality: Comparing inorganic components in bottled water and Italian tap water, *J. Food Compos. Anal.* 24 (2011) 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.08.005>.
- [129] S. Carneado, E. Hernández-Nataren, J.F. López-Sánchez, A. Sahuquillo, Migration of antimony from polyethylene terephthalate used in mineral water bottles, *Food Chem.* 166 (2015) 544–550. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.06.041>.
- [130] C. Bach, X. Dauchy, I. Severin, J.-F. Munoz, S. Etienne, M.-C. Chagnon, Effect of sunlight exposure on the release of intentionally and/or non-intentionally added substances from polyethylene terephthalate (PET) bottles into water: Chemical analysis and in vitro toxicity, *Food Chem.* 162 (2014) 63–71. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.04.020>.
- [131] P. Westerhoff, P. Prapaipong, E. Shock, A. Hillaireau, Antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water, *Water Res.* 42 (2008) 551–556. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2007.07.048>.

- [132] C. Bach, X. Dauchy, I. Severin, J.-F. Munoz, S. Etienne, M.-C. Chagnon, Effect of temperature on the release of intentionally and non-intentionally added substances from polyethylene terephthalate (PET) bottles into water: Chemical analysis and potential toxicity, *Food Chem.* 139 (2013) 672–680. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.01.046>.
- [133] Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej, Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, 2013. <http://prawo.sejm.gov.pl/isap.nsf/download.xsp/WDU20170002294/O/D20172294.pdf> (accessed May 18, 2020).
- [134] International Organization for Standardization [ISO], ISO 17294-2:2016 - Jakość wody - Zastosowanie spektrometrii mas z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-MS) -- Część 2: Oznaczanie wybranych pierwiastków, w tym izotopów uranu, 2016. <https://www.iso.org/standard/62962.html> (accessed September 22, 2019).
- [135] I. Komorowicz, D. Barańkiewicz, Arsenic speciation in water by high-performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry-method validation and uncertainty estimation., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28 (2014) 159–68. <https://doi.org/10.1002/rcm.6774>.
- [136] F. El-Hadri, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, Determination of total arsenic in soft drinks by hydride generation atomic fluorescence spectrometry, *Food Chem.* 105 (2007) 1195–1200. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.025>.
- [137] C. Hansen, A. Tsigotaki, S.A. Bak, S.A. Pergantis, S. St€e, B. Gammelgaard, H. R€e Usz Hansen, Elevated antimony concentrations in commercial juices, (2010). <https://doi.org/10.1039/b926551a>.
- [138] G.N. Abdel-Rahman, M.B.M. Ahmed, B.A. Sabry, S.S.M. Ali, Heavy metals content in some non-alcoholic beverages (carbonated drinks, flavored yogurt drinks, and juice drinks) of the Egyptian markets, *Toxicol. Reports.* 6 (2019) 210–214. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2019.02.010>.
- [139] E.M. García, C. Cabrera, J. Sánchez, M.L. Lorenzo, M.C. López, Chromium levels in potable water, fruit juices and soft drinks: Influence on dietary intake, *Sci. Total Environ.* 241 (1999) 143–150. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00340-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00340-X).
- [140] B.E. Tvermoes, A.M. Banducci, K.D. Devlin, B.D. Kerger, M.M. Abramson, I.G. Bebenek, A.D. Monnot, Screening level health risk assessment of selected metals in apple juice sold in the United States, (2014). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.05.015>.
- [141] A.S. Martins, J.B.P. Junior, A. de Araújo Gomes, F.I.M. Carvalho, H.A.D. Filho, K. das Graças Fernandes Dantas, Mineral Composition Evaluation in Energy Drinks Using ICP OES and Chemometric Tools, *Biol. Trace Elem. Res.* 194 (2020) 284–294. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01770-y>.
- [142] B. Zmit, N. Belhaneche-Bensemra, Antimony leaching from PET plastic into bottled water in Algerian market, *Environ. Monit. Assess.* 191 (2019) 749. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7891-4>.
- [143] M. Diduch, Ż. Polkowska, J. Namieśnik, Chemical Quality of Bottled Waters: A Review, *J. Food Sci.* 76 (2011) R178–R196. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02386.x>.
- [144] B. Markiewicz, I. Komorowicz, A. Sajnóg, M. Belter, D. Barańkiewicz, Chromium and its speciation in water samples by HPLC/ICP-MS – technique establishing metrological



- traceability: A review since 2000, *Talanta*. 132 (2015) 814–828. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.10.002>.
- [145] I. Komorowicz, D. Barańkiewicz, Arsenic and its speciation in water samples by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry—Last decade review, *Talanta*. 84 (2011) 247–261. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.10.065>.
- [146] N.M.M. Coelho, L.M. Coelho, E.S. De Lima, A. Pastor, M. De La Guardia, Determination of arsenic compounds in beverages by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta*. (2005). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.11.037>.
- [147] M. Pantsar-Kallio, P.K.G. Manninen, Simultaneous determination of toxic arsenic and chromium species in water samples by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 779 (1997) 139–146. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00402-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00402-0).
- [148] Y.A. Lin, S.J. Jiang, A.C. Sahayam, Determination of antimony compounds in waters and juices using ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Food Chem.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.014>.
- [149] F. Mehoul, L. Bouayad, A. Berber, I. Van Hauteghem, M. Van de Wiele, Analysis and risk assessment of arsenic, cadmium and lead in two fish species ( *Sardina pilchardus* and *Xiphias gladius* ) from Algerian coastal water, *Food Addit. Contam. Part A*. (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1634840>.
- [150] US EPA, Risk Assessment Guidance for Superfund Volume I: Human Health Evaluation Manual, Off. Superfund Remediat. Technol. Innov. Environ. Prot. Agency. I (2009) 1–68. <https://doi.org/EPA-540-R-070-002>.
- [151] J. Griboff, D.A. Wunderlin, M. V. Monferran, Metals, As and Se determination by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in edible fish collected from three eutrophic reservoirs. Their consumption represents a risk for human health?, *Microchem. J.* 130 (2017) 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.09.013>.
- [152] UNESDA, Consumption and Sales – UNESDA, (2019). <https://www.unesda.eu/consumption/> (accessed August 24, 2019).
- [153] WHO, Guidelines for Drinking-water Quality, 2017. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254637/9789241549950-eng.pdf;jsessionid=C4FA1DB55E72D77177D2EE04D7F37A2A?sequence=1> (accessed September 15, 2019).
- [154] CEU, Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption, 1998. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0083&from=EN> (accessed January 30, 2019).
- [155] WHO, Safety evaluation of certain contaminants in food, (2011). [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44520/9789241660631\\_eng.pdf;jsessionid=DD11977E4426EF44D287EB24D367BBF0?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44520/9789241660631_eng.pdf;jsessionid=DD11977E4426EF44D287EB24D367BBF0?sequence=1) (accessed August 27, 2019).
- [156] R. Cornelis, J. Caruso, H. Crews, K. Heumann, Handbook of Elemental Speciation I: Techniques and Methodology, John Wiley & Sons, Ltd, 2003. <https://doi.org/10.1002/0470868384>.

- [157] R. Rubio, M.J. Ruiz-Chancho, J.F. López-Sánchez, R. Rubio, J.F. López-Sánchez, Sample pre-treatment and extraction methods that are crucial to arsenic speciation in algae and aquatic plants, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 53–69. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.10.002>.
- [158] USEPA, Chemical Assessment Summary: Arsenic (Inorganic), 1988. [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris\\_documents/documents/subst/0278\\_summary.pdf](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0278_summary.pdf) (accessed March 1, 2020).
- [159] Y. Wang, S. Wang, P. Xu, C. Liu, M. Liu, Y. Wang, C. Wang, C. Zhang, Y. Ge, Review of arsenic speciation, toxicity and metabolism in microalgae, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14 (2015) 427–451. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9371-9>.
- [160] M.K. Upadhyay, A. Shukla, P. Yadav, S. Srivastava, A review of arsenic in crops, vegetables, animals and food products, (2018). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.069>.
- [161] A. Pell, A. Márquez, J.F. López-Sánchez, R. Rubio, M. Barbero, S. Stegen, F. Queirolo, P. Díaz-Palma, Occurrence of arsenic species in algae and freshwater plants of an extreme arid region in northern Chile, the Loa River Basin, *Chemosphere.* 90 (2013) 556–564. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.028>.
- [162] V.F. Taylor, B.P. Jackson, Concentrations and speciation of arsenic in New England seaweed species harvested for food and agriculture, *Chemosphere.* 163 (2016) 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.004>.
- [163] P. Traar, K.A. Francesconi, Synthetic routes for naturally-occurring arsenic-containing ribosides, *Tetrahedron Lett.* 47 (2006) 5293–5296. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.05.128>.
- [164] C. Niegel, F.M. Matysik, Analytical methods for the determination of arsenosugars-A review of recent trends and developments, *Anal. Chim. Acta.* 657 (2010) 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.041>.
- [165] S. García-Salgado, M.Á. Quijano, Stability of toxic arsenic species and arsenosugars found in the dry alga *Hijiki* and its water extracts, *Talanta.* 128 (2014) 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.04.038>.
- [166] C. Almela, J.M. Laparra, D. Vélez, R. Barberá, R. Farré, R. Montoro, Arsenosugars in raw and cooked edible seaweed: Characterization and bioaccessibility, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 7344–7351. <https://doi.org/10.1021/jf050503u>.
- [167] I. Komorowicz, A. Sajnog, D. Barańkiewicz, Total Arsenic and Arsenic Species Determination in Freshwater Fish by ICP-DRC-MS and HPLC/ICP-DRC-MS Techniques, *Molecules.* 24 (2019) 607. <https://doi.org/10.3390/molecules24030607>.
- [168] I. Komorowicz, A. Hanć, W. Lorenc, D. Barańkiewicz, J. Falandysz, Y. Wang, Arsenic speciation in mushrooms using dimensional chromatography coupled to ICP-MS detector, *Chemosphere.* 233 (2019) 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.130>.
- [169] M. Sá Monteiro, J. Sloth, S. Holdt, M. Hansen, Analysis and Risk Assessment of Seaweed, *EFSA J.* 17 (2019). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.e170915>.
- [170] I. Biancarosa, N.S. Liland, N. Day, I. Belghit, H. Amlund, E.J. Lock, A.S. Gilburn, The chemical composition of two seaweed flies (*Coelopa frigida* and *Coelopa pilipes*) reared in the laboratory, *J. Insects as Food Feed.* 4 (2018) 135–142.

<https://doi.org/10.3920/JIFF2018.0008>.

- [171] A. Bull, M.T. Brown, A. Turner, Novel use of field-portable-XRF for the direct analysis of trace elements in marine macroalgae, *Environ. Pollut.* 220 (2017) 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.049>.
- [172] V.A.T. Reis, A.C. Duarte, Analytical methodologies for arsenic speciation in macroalgae: A critical review, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 102 (2018) 170–184. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.003>.
- [173] S. García-Salgado, M.A. Quijano, M.M. Bonilla, Arsenic speciation in edible alga samples by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 714 (2012) 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.001>.
- [174] T. Narukawa, A. Hioki, K. Chiba, Aqueous extraction of water-soluble inorganic arsenic in marine algae for speciation analysis, *Anal. Sci.* 28 (2012) 773–779. <https://doi.org/10.2116/analsci.28.773>.
- [175] A. Geislinger, W. Goessler, S.N. Pedersen, K.A. Francesconi, Arsenic biotransformation by the brown macroalga *Fucus serratus*, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 2255–2262. <https://doi.org/10.1002/etc.5620201018>.
- [176] M.D. Catarino, A.M.S. Silva, S.M. Cardoso, Phycochemical constituents and biological activities of *Fucus* spp., *Mar. Drugs.* 16 (2018). <https://doi.org/10.3390/md16080249>.
- [177] A. McKnight-Whitford, X.C. Le, Electrospray Mass Spectrometry of Arsenic Compounds and Thiol-Arsenic Complexes, in: *Encycl. Anal. Chem.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2011. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9234>.

## Streszczenie

W rozprawie doktorskiej przedstawiono podsumowanie wyników badań prowadzonych w latach 2015 – 2020 w ramach studium doktoranckiego. Prowadzone eksperymenty miały na celu badanie specjacji arsenu, chromu i antymonu w próbkach żywności ciekłej (wody mineralne, smakowe oraz funkcjonalne) i stałej (algi). W badaniach zastosowano zaawansowane techniki sprzężone LC/ICP-DRC-MS oraz ESI-MS/MS. Istotnym elementem wszystkich prowadzonych eksperymentów było także zapewnienie jakości wyników pomiarów.

Bezpieczeństwo i jakość żywności zależą od wielu, zarówno biologicznych jak i chemicznych, czynników. Jednym z najważniejszych spośród tych czynników jest obecność w produktach żywnościowych pierwiastków chemicznych. Toksyczność i biodostępność pierwiastków chemicznych nie zależy jedynie od dawki czy drogi podania, ale również od formy w jakiej dany pierwiastek dostaje się do organizmu. W związku z powyższym oznaczenie tylko całkowitej zawartości pierwiastków chemicznych w próbce żywności nie jest wystarczające w ocenie jakości produktów żywnościowych. Informacje o formach chemicznych pierwiastków występujących w próbce można uzyskać dzięki zastosowaniu analizy specjacyjnej. Najważniejszą techniką analityczną stosowaną obecnie w analizie specjacyjnej pierwiastków chemicznych jest technika sprzężona LC/ICP-MS. Technika LC/ICP-MS posiada jednak niezwykle istotne ograniczenie, pozwala ona na identyfikację oznaczanych form specjacyjnych tylko na podstawie porównania czasów retencji z kolumny chromatograficznej. W przypadku braku dostępnych wzorców oznaczanych substancji nie jest możliwa pełna identyfikacja tych substancji. Z tego względu w ostatnich latach metody analizy specjacyjnej dążą do równoległego stosowania techniki sprzężonej LC/ICP-MS oraz technik komplementarnych, które pozwalają na identyfikację wykrywanych substancji nawet w przypadku braku dostępności substancji wzorcowych. Najpopularniejszą obecnie techniką komplementarną do techniki sprzężonej LC/ICP-MS jest LC/ESI-MS/MS. Technika ta pozwala na identyfikację szerokiego spektrum związków organicznych oraz nieorganicznych za pośrednictwem wyznaczenia dokładnej masy atomowej analizowanego związku oraz obserwacji jego ścieżki fragmentacji.

Przeprowadzone studium literaturowe dowodzi niezwykle ważnej roli analizy specjacyjnej w ocenie jakości żywności oraz wskazuje kierunek dla dalszych badań. W części literaturowej niniejszej rozprawy doktorskiej opisano następujące zagadnienia: 1) opis wybranych pierwiastków chemicznych oznaczanych w ramach badań specjacji pierwiastków chemicznych w próbkach żywności, 2) rodzaje próbek żywności w badaniach specjacji pierwiastków chemicznych przy zastosowaniu techniki sprzężonej LC/ICP-MS oraz technik komplementarnych, 3) opis wybranych technik analitycznych stosowanych w badaniach specjacji pierwiastków chemicznych w próbkach żywności, 4) krytyczny przegląd uregulowań prawnych dotyczących zawartości pierwiastków chemicznych w żywności. Obecne trendy literaturowe wyraźnie pokazują, że zmienia się podejście metodyczne do prowadzenia analizy specjacyjnej. Zastosowanie jednej techniki do analizy badanej próbki stało się niewystarczające, coraz powszechniejsze staje się stosowanie wielu technik komplementarnych w celu uzyskania większej ilości informacji o występujących formach chemicznych pierwiastków w badanej próbce. Widoczna jest także potrzeba opracowywania nowych, zwalidowanych procedur analitycznych, które pozwolą nie tylko poszerzyć naszą wiedzę o specjacji pierwiastków chemicznych w żywności, ale także pomogą w opracowaniu nowych, bardziej szczegółowych norm prawnych.

W części eksperymentalnej niniejszej rozprawy doktorskiej przedstawiono opracowane procedury analizy specjacyjnej oraz wyniki badania specjacji As, Cr i Sb w próbkach rzeczywistych żywności ciekłej (wody mineralne, smakowe oraz funkcjonalne) i stałej (algi). W prowadzonych badaniach stosowano zaawansowane techniki sprzężone takie jak IEC/ICP-DR-MS, SEC/ICP-DR-MS oraz UPLC/ESI-MS/MS. Rozszerzono zakres stosowalności procedury oznaczania As(III), As(V), Sb(III), Sb(V) oraz Cr(VI) dla butelkowanych wód mineralnych o szerokim zakresie zawartości składników rozpuszczonych. Opracowaną procedurę analityczną zastosowano w analizie próbek rzeczywistych. Potwierdzono zależność między materiałem i kolorem pojemnika a zawartością toksycznych form specjacyjnych As(III), As(V), Cr(VI) oraz Sb(V) w butelkowanych wodach mineralnych. Formy specjacyjnej Sb(III) nie wykryto w żadnej z badanych próbek butelkowanej wody mineralnej. W wodzie przechowywanej w butelkach szklanych obserwowano podwyższone stężenie As(III) oraz As(V). W wodzie przechowywanej w butelkach z tworzywa PET obserwowano podwyższone stężenie Sb(V). W butelkach koloru zielonego, niezależnie od stosowanego materiału, obserwowano podwyższone stężenie Cr(VI). Spośród wszystkich oznaczanych form specjacyjnych, dominującą formą w badanych próbkach butelkowanych wód mineralnych był As(V). Stężenie żadnej z oznaczonych form specjacyjnych As, Cr i Sb nie przekraczało maksymalnych dopuszczalnych stężeń arsenu, chromu i antymonu w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi które wynoszą odpowiednio 10, 50 i 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ . W kolejnym etapie prowadzonych badań opracowano procedury analityczne oznaczania toksycznych form specjacyjnych: As(III), As(V), Sb(III), Sb(V), Cr(VI) oraz pięciu form specjacyjnych arsenu: AsB, As(III), DMA, MMA, As(V) w próbkach butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych. Opracowano także procedury analityczne oznaczania nieznanymi form specjacyjnych As, Cr i Sb technikami SEC/ICP-DR-MS oraz ESI-MS/MS. Opracowane procedury analityczne zastosowano w analizie próbek rzeczywistych butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych. W próbkach butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych potwierdzono obecność form specjacyjnych takich jak AsB, As(III), As(V), Cr(III) oraz Sb(V). W badanych próbkach nie wykryto form specjacyjnych MMA, DMA, Sb(III) oraz Cr(VI). W wyniku dalszych badań stwierdzono obecność niezidentyfikowanych form specjacyjnych As, Cr oraz Sb w badanych próbkach. Podjęto próbę identyfikacji niezidentyfikowanych form specjacyjnych As, Cr i Sb, za pomocą spektrometrii cząsteczkowej. Mimo zarejestrowania widm fragmentacji sugerujących obecność organicznych kompleksów arsenu w badanych próbkach, nie udało się uzyskać satysfakcjonujących wartości delty ppm pozwalających na potwierdzenie obecności tych kompleksów w badanych próbkach. Przeprowadzono szacowanie ryzyka związanego z konsumpcją butelkowanych wód mineralnych, smakowych oraz funkcjonalnych w odniesieniu do innego niż rakotwórcze negatywnego działania As, Cr i Sb na organizm ludzki. W celu przeprowadzenia oceny ryzyka oszacowano trzy parametry: EDI, THQ oraz HI. Wszystkie spośród wymienionych parametrów oszacowano dla zawartości całkowitych As, Cr i Sb oraz dla wybranych toksycznych form specjacyjnych tych pierwiastków: suma As(III) i As(V), Sb(V) oraz Cr(VI). Uzyskane wyniki potwierdziły brak ryzyka związanego z konsumpcją butelkowanych wód mineralnych, smakowych i funkcjonalnych a oznaczone formy specjacyjne As, Cr i Sb obniżyły ryzyko w porównaniu z ryzykiem oszacowanym dla zawartości całkowitych As, Cr i Sb. Ponadto zawartości tAs, tCr oraz tSb oznaczone w butelkowanych wodach smakowych oraz funkcjonalnych znajdowały się na poziomach stężeń poniżej maksymalnych dopuszczalnych stężeń arsenu, chromu i antymonu w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi które wynoszą odpowiednio 10, 50 i 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ . W części badań dotyczącej badania specjacji pierwiastków chemicznych w próbkach żywności stałej przeprowadzono analizę specjacyjną As w algach i produktach żywnościowych z alg. Oznaczono zawartość całkowitą arsenu w pięciu próbkach alg. Przeprowadzono optymalizację procesu ekstrakcji arsenu z alg z zastosowaniem

dwóch metod ekstrakcji oraz trzech ekstrahentów. Opracowano procedurę oznaczania pięciu form specjacyjnych arsenu: AsB, As(III), DMA, MMA i As(V) w algach oraz produktach żywnościowych z alg. Opracowano procedurę analityczną identyfikacji nieznanymi form specjacyjnych arsenu przy zastosowaniu techniki sprzężonej UPLC/ESI-MS/MS. Opracowane procedury zastosowano w analizie próbek rzeczywistych alg oraz produktów żywnościowych z alg. W wyniku przeprowadzonych badań potwierdzono obecność w badanych próbkach form specjacyjnych As takich jak: AsB, As(III), DMA oraz As(V). W żadnej z badanych próbek nie wykryto formy specjacyjnej MMA. Na chromatogramach otrzymanych dla wszystkich badanych próbek zarejestrowano dodatkowe sygnały pochodzące od niezidentyfikowanych form specjacyjnych As. Przeprowadzono identyfikację nieznanymi form specjacyjnych As za pomocą spektrometrii cząsteczkowej. Prowadzone badania potwierdziły obecność 12 As-cukrów w badanych próbkach alg. Zidentyfikowano także szereg prostych związków organicznych As oraz potwierdzono obecność form specjacyjnych takich jak As(V) czy DMA. Zarejestrowano także sygnał dla nieznanego związku arsenu o jonie molekularnym  $C_6H_{12}O_5As^+$ . Wyniki prowadzonych badań potwierdziły, że fakt oznaczenia wysokich stężeń tAs w próbkach żywności nie musi być jednoznaczny z wysoką zawartością toksycznych, nieorganicznych form tego pierwiastka w badanych próbkach. Wszystkie opracowane procedury oznaczania form specjacyjnych As, Cr i Sb w próbkach żywności poddano procesowi walidacji, oszacowano niepewność wyników pomiarów oraz zapewniono spójność pomiarową wyników pomiarów.

## Summary

The doctoral dissertation presents a summary of the results of research conducted in 2015-2020 as part of the doctoral study. The conducted experiments were aimed at the study of the speciation of arsenic, chromium and antimony in samples of liquid (mineral, flavored and functional bottled drinking water) and solid (algae) foods. Advanced hyphenated techniques LC/ICP-DRC-MS and ESI-MS/MS were used in the research. An important element of all conducted experiments was also the quality assurance of measurement results.

Food safety and quality depends on many biological and chemical factors. One of the most important of these factors is the presence of chemical elements in food products. The toxicity and bioavailability of chemical elements depends not only on the dose or the way that element enters the body, but also on the species in which the element enters the body. Therefore, the determination of only the total content of chemical elements in a food sample is not sufficient in assessing the quality of food products. Information on the species of the elements present in the sample can be obtained by using speciation analysis. The most important analytical technique currently used in speciation analysis of chemical elements is the LC/ICP-MS hyphenated technique. The LC/ICP-MS technique has, however, an extremely significant limitation, it allows the identification of the species determined only by comparing the retention times from the chromatographic column. In the absence of available standards for determined substances, it is not possible to fully identify these substances. For this reason, in recent years, speciation analysis methods have strived for the parallel application of LC/ICP-MS hyphenated technique and complementary techniques that allow the identification of detected substances even in the absence of standard substances. Currently, the most popular complementary technique to the LC/ICP-MS technique is LC/ESI-MS/MS. This technique allows the identification of a wide spectrum of organic and inorganic compounds by determining the exact atomic mass of the analyzed compound and observing its fragmentation path.

The conducted literature study proves the extremely important role of speciation analysis in assessing food quality and indicates the direction for further research. The following topics are described in the literature part of this doctoral dissertation: 1) description of selected chemical elements often determined as part of the study of chemical element speciation in food samples, 2) types of food samples studied in the research of chemical elements speciation using LC/ICP-MS technique and complementary techniques, 3) description of selected analytical techniques used in the study of speciation of chemical elements in food samples, 4) critical review of legal regulations regarding the content of chemical elements in food. Current literature trends clearly show that the methodical approach to speciation analysis is changing. The use of one technique for the analysis of the tested sample has become insufficient, the use of many complementary techniques to obtain more information about the occurring species of elements in the tested sample is becoming more and more common. There is also a visible need to develop new, validated analytical procedures that will not only broaden our knowledge of the speciation of chemical elements in food but also help in the development of new, more detailed legal standards.

In the experimental part of this dissertation, speciation analysis procedures were developed and the results of the speciation of As, Cr and Sb specifications in samples of liquid (mineral, flavored and functional waters) and solid (algae) foods were present. During the research advanced hyphenated techniques such as IEC/ICP-DRC-MS, SEC/ICP-DRC-MS and UPLC/ESI-MS/MS were used. The scope of applicability of the analytical procedure for the determination of five toxic

species: As(III), As(V), Sb(III), Sb(V) and Cr(VI) has been extended to the bottled mineral water samples with a wide range of dissolved components. The developed analytical procedure was used in the analysis of real samples. The relationship between material and color of the container and the content of toxic species As(III), As(V), Cr(VI) and Sb(V) in bottled mineral waters has been confirmed. The Sb(III) was not detected in any of the tested samples of bottled mineral water. Elevated levels of As(III) and As(V) were determined in water stored in glass bottles. Elevated Sb(V) concentration was determined in water stored in PET bottles. Increased Cr(VI) concentration was determined in green bottles, regardless of the material used. Of all the species determined, the dominant species in the tested samples of bottled mineral waters was As(V). The concentration of any of the specified species of As, Cr and Sb did not exceed the maximum allowable concentrations of arsenic, chromium and antimony in water intended for human consumption, which are 10, 50 and 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. In the next stage of research, analytical procedures were developed for the determination of toxic five species: As(III), As(V), Sb(III), Sb(V), Cr(VI) and five species of arsenic: AsB, As(III), DMA, MMA and As(V) in samples of bottled flavored and functional waters. Analytical procedures for the determination of unknown species of As, Cr and Sb by SEC/ICP-DRC-MS and ESI-MS/MS have also been developed. The developed analytical procedures were used in the analysis of real samples of bottled flavored and functional waters. The samples of bottled flavored and functional waters confirmed the presence of species such as AsB, As(III), As(V), Cr(III) and Sb(V). Species such as MMA, DMA, Sb(III) and Cr(VI) were found in the tested samples. Further tests revealed the presence of unidentified species of As, Cr and Sb in the tested samples. An attempt was made to identify unidentified species of As, Cr and Sb by molecular spectrometry. Despite recording of fragmentation spectra suggesting the presence of organic arsenic complexes in the tested samples, it was not possible to obtain satisfactory delta ppm values allowing to confirm the presence of these complexes in the tested samples. An estimation of the risk associated with the consumption of bottled mineral, flavored and functional waters in relation to the non-carcinogenic negative effect of As, Cr and Sb on the human body was performed. To perform the risk assessment, three parameters were estimated: EDI, THQ and HI. All these parameters were estimated for the total content of As, Cr and Sb and for selected toxic species of these elements: the sum of As(III) and As(V), Sb(V) and Cr(VI). The obtained results confirmed the lack of risk associated with the consumption of bottled mineral, flavored and functional waters, and the determined species of As, Cr and Sb reduced the risk compared to the risk estimated for total As, Cr and Sb contents. In addition, tAs, tCr and tSb contents in bottled flavored and functional waters were at concentration levels below the maximum allowable concentrations of arsenic, chromium and antimony in water intended for human consumption which are 10, 50 and 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. In the part of the research concerning the study of speciation of chemical elements in solid food samples, the As speciation analysis was carried out in algae and food products from algae. The total arsenic content in five algae samples was determined. Optimization of the extraction procedure of arsenic from algae was carried out using two extraction methods and three extractants. The procedure for determining five species of arsenic was developed: AsB, As(III), DMA, MMA and As(V) in algae and algae food products. An analytical procedure was developed to identify unknown species of arsenic using the hyphenated technique UPLC/ESI-MS/MS. The developed procedures were used in the analysis of algae and algae food products samples. As a result of the research, the presence of As species such as: AsB, As(III), DMA and As(V) was confirmed. No MMA was detected in any of the tested samples. Additional signals for unidentified As species were recorded on the chromatograms obtained for all tested samples. Identification of unknown As species by molecular spectrometry was performed. The research confirmed the presence of 12 As-sugars in the tested algae



samples. A number of simple As organic compounds have also been identified and the presence of species such as As(V) and DMA has been confirmed. The signal for the unknown arsenic compound with molecular ion  $C_6H_{12}O_5As^+$  was also recorded. The results of the conducted research confirmed that the fact of determining high tAs in food samples does not have to be synonymous with a high content of toxic, inorganic species of this element in the tested samples. All developed procedures for determining As, Cr and Sb species in food samples were validated, uncertainty of measurement results was estimated, and measurement traceability was ensured.

## Curriculum Vitae

Imię i nazwisko: Wiktor Lorenc

Data i miejsce urodzenia: 17.12.1990, Poznań

### **2015 – 2020**

Studia Doktoranckie

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii

#### **01.06.2015**

tytuł magistra chemii, temat pracy magisterskiej: „Strategie kalibracji w analizie pierwiastkowej tkanek miękkich techniką LA-ICP-MS”

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii

### **2013 – 2015**

Studia Magisterskie, Specjalność Chemia Materiałowa

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii

#### **01.06.2013**

tytuł licencjata chemii, temat pracy licencjackiej: „Synteza i charakterystyka materiałów AlPO-5 zawierających wanad”

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii

### **2009 – 2013**

Studia Licencjackie, Specjalność Synteza i Analiza Chemiczna

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii

### **2004 – 2009**

Liceum Ogólnokształcące im. Prymasa Tysiąclecia ks. Stefana Kardynała Wyszyńskiego w Opalenicy

## Spis dorobku naukowego

### Wykaz publikacji z listy filadelfijskiej

#### *Publikacje związane z pracą dokorską*

1. Marcinkowska M., Lorenc W., Barańkiewicz D., Study of the impact of bottles material and color on the presence of AsIII, AsV, SbIII, SbV and CrVI in matrix-rich mineral water – Multielemental speciation analysis by HPLC/ICP-DRC-MS, *Microchemical Journal*, Volume 132, 2017, 1-7, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.11.022>, IF – 3,206,
2. Lorenc W., Markiewicz B., Kruszka D., Kachlicki P., Barańkiewicz D., Study on speciation of As, Cr, and Sb in bottled flavored drinking water samples using advanced analytical techniques IEC/SEC-HPLC/ICP-DRC-MS and ESI-MS/MS, *Molecules*, Volume 24, Issue 4, 2019, 668, <https://doi.org/10.3390/molecules24040668>, IF – 3,060,
3. Lorenc W., Markiewicz B., Kruszka D., Kachlicki P., Barańkiewicz D., Total versus inorganic and organic species of As, Cr, and Sb in flavored and functional drinking waters: Analysis and risk assessment, *Molecules*, Volume 25, Issue 5, 2020, 1099, <https://doi.org/10.3390/molecules25051099>, IF – 3,060,
4. Lorenc W., Kruszka D., Kachlicki P., Kozłowska J., Barańkiewicz D., Arsenic species and their transformation pathways in marine plants. Usefulness of advanced hyphenated techniques HPLC/ICP-MS and UPLC/ESI-MS/MS in arsenic species analysis, *Talanta*, Publikacja po recenzji, IF – 4,916.

#### *Publikacje inne*

1. Komorowicz I., Hanć A., Lorenc W., Barańkiewicz D., Falandysz J., Yuanzhong W., Arsenic speciation in mushrooms using dimensional chromatography coupled to ICP-MS detector, *Chemosphere*, Volume 233, 2019, 223-233, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.130>, IF – 5,108,
2. Kocyłowski R., Grzesiak M., Gaj Z., Lorenc W., Bakinowska E., Barańkiewicz D., von Kaisenberg, C.S., Suliburska J., Evaluation of Essential and Toxic Elements in Amniotic Fluid and Maternal Serum at Birth, *Biological Trace Element Research*, Volume 189, Issue 1, 2019, 45-54, DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1471-2>, IF – 2,431,
3. Kocyłowski R., Grzesiak M., Gaj Z., Lorenc W., Bakinowska E., Barańkiewicz D., von Kaisenberg C.S., Lamers Y., Suliburska J., Associations between the level of trace elements and minerals and folate in maternal serum and amniotic fluid and congenital abnormalities, *Nutrients*, Volume 11, Issue 2, 2019, 328, <https://doi.org/10.3390/nu11020328>, IF – 4,171,
4. Markiewicz B., Sajnóg A., Lorenc W., Hanć A., Komorowicz I., Suliburska J., Kocyłowski R., Barańkiewicz D., Multielemental analysis of 18 essential and toxic elements in amniotic fluid samples by ICP-MS: Full procedure validation and estimation of measurement uncertainty, *Talanta*, Volume 174, 2017 122-130, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.078>, IF – 4,916.

#### **Wykaz publikacji o zasięgu krajowym**

1. Lorenc W., Barańkiewicz D., Optimization of operating parameters of the measuring apparatus in elemental analysis of soft tissues using laser Aalation technique with the detection in the mass Spectrometer with inductively coupled plasma, *Technical Issues* 2016, 3, pp. 67-73(7),

2. Lorenc W., Barańkiewicz D., Przegląd strategii kalibracji stosowanych w analizie pierwiastkowej tkanek miękkich techniką LA-ICP-MS, Zagadnienia aktualnie poruszane przez młodych naukowców 5, 2016, 1, 282-285(4),
3. Lorenc W., Barańkiewicz D., Kalibracja w analizie pierwiastkowej tkanek miękkich techniką ablacji laserowej w połączeniu z spektrometrią mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie, Zagadnienia aktualnie poruszane przez młodych naukowców 5, 2016, 1, 286-289(4).

#### **Wykaz międzynarodowych komunikatów konferencyjnych ustnych**

1. Lorenc W., Barańkiewicz D., Study of speciation of As, Cr and Sb in bottled flavored and functional drinking water samples using advanced analytical techniques IEC/SEC-HPLC/ICP-DRC-MS and ESI-MS<sup>n</sup>, European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, 3-8.02.2019, Pau, Francja.

#### **Wykaz krajowych komunikatów konferencyjnych ustnych**

1. Lorenc W., Kozłowska J., Barańkiewicz D., Badanie specjacji arsenu w roślinach morskich metodą HPLC/ICP-MS, XIII Konferencja „Analiza Specjacyjna – Możliwości i Kierunki Rozwoju”, 5-6.03.2020, Poznań,
2. Lorenc W., Markiewicz B., Barańkiewicz D., Analiza specjacyjna As, Cr i Sb w próbkach butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych przy użyciu zaawansowanej techniki sprzężonej HPLC/ICP-DRC-MS, X Polska Konferencja Chemii Analitycznej, 1-5.07.2018, Lublin,
3. Lorenc W., Markiewicz B., Barańkiewicz D., Badanie specjacji As, Cr i Sb w próbkach butelkowanych wód smakowych i funkcjonalnych przy użyciu zaawansowanej techniki sprzężonej HPLC-ICP-DRC-MS, Analiza specjacyjna – możliwości i kierunki rozwoju, 1-2.03.2018, Poznań,
4. Lorenc W., Marcinkowska M., Komorowicz I., Barańkiewicz D., Analiza specjacyjna As, Cr i Sb w butelkowanej wodzie przeznaczonej do spożycia techniką sprzężoną HPLC/ICP-DRC-MS: walidacja, zapewnienie spójności pomiarowej i oszacowanie niepewności wyniku, VI Konferencja Chemometria i Metrologia W Analityce, 1-3.03.2017, Poznań,
5. Lorenc W., Barańkiewicz D. Przegląd strategii kalibracji stosowanych w analizie pierwiastkowej tkanek miękkich techniką LA-ICP-MS, Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki IX edycja, 12.12.2015, Poznań,
6. Lorenc W., Barańkiewicz D., Wybrane techniki analityczne w badaniach specjacji i translokacji metali ciężkich w roślinach, Analiza specjacyjna – możliwości i kierunki rozwoju, 4-5.03.2016, Poznań.

#### **Wykaz międzynarodowych komunikatów konferencyjnych drukowanych**

1. Hanć A., Małecka A., Kachlicki P., Sajnog A., Lorenc W., Barańkiewicz D., Studies on the influence of metal ions on maize (*Zea mays*) using LA-ICP MS and ESI-MS/MS, European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, 3-8.02.2019, Pau, Francja
2. Lorenc W., Marcinkowska M., Sajnog A., Baralkiewicz D., Elemental analysis, Coupling techniques (chromatography, FFF, ETV, others), Application of speciation analysis, European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, 19-24.02.2017, Sankt Anton Am Arlberg – Austria

3. Hanć A., Zduniak P., Lorenc W., Erciyas-Yavuz K., Barańkiewicz D., Elemental analysis, Laser-assisted analysis (LA, LIBS, LAMIS), imaging, biodistribution, European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, 19-24.02.2017, Sankt Anton Am Arlberg – Austria

#### **Wykaz krajowych komunikatów konferencyjnych drukowanych**

1. Lorenc W., Komorowicz I., Hanć A., Sajnog A., Barańkiewicz D., Analiza specjacyjna As, Cr i Sb w próbkach wody przy użyciu zaawansowanej techniki sprzężonej HPLC-ICP-MS – walidacja, spójność pomiarowa, niepewność wyników pomiarów, X Polska Konferencja Chemii Analitycznej, 1-5.07.2018, Lublin
2. Sajnog A., Hanć A., Komorowicz I., Lorenc W., Podejście metrologiczne do analizy ilościowej próbek stałych metodą LA-ICP-MS, X Polska Konferencja Chemii Analitycznej, 1-5.07.2018, Lublin
3. Lorenc W., Barańkiewicz D., Zastosowanie technik łączonych w analizie specjacyjnej metali ciężkich w roślinach, Analiza specjacyjna – możliwości i kierunki rozwoju, 1-2.03.2018, Poznań
4. Lorenc W., Barańkiewicz D., Zastosowanie technik sprzężonych w analizie specjacyjnej metali ciężkich w roślinach, Analiza specjacyjna – możliwości i kierunki rozwoju, 4-5.03.2016, Poznań
5. Lorenc W., Sajnog A., Hanć A., Barańkiewicz D., Parametry procedury analitycznej w analizie pierwiastkowej tkanek miękkich techniką ablacji laserowej z detekcją w spektrometrze mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie, Analiza specjacyjna – możliwości i kierunki rozwoju, 4-5.03.2016, Poznań
6. Lorenc W., Barańkiewicz D., Nowoczesne techniki sprzężone w badaniach procesu fitoremediacji, Jubileuszowe XXV Poznańskie Konwersatorium Analityczne, 6-8.04.2016, Poznań
7. Lorenc W., Barańkiewicz D., Przegląd strategii kalibracji stosowanych w analizie pierwiastkowej tkanek miękkich techniką LA-ICP-MS, Jubileuszowe XXV Poznańskie Konwersatorium Analityczne, 6-8.04.2016, Poznań

#### **Działalność organizacyjna i dydaktyczna**

1. Przeprowadzenie części bloku wykładów dla doktorantów: Analiza śladowa. Możliwości analityczne i wyzwania spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie, ICPMS oraz technik sprzężonych: ablacja laserowa, LA/ICPMS i chromatografia cieczowa, LC/ICPMS, 05.06.2020,
2. Przeprowadzenie części bloku wykładów dla doktorantów: Zapewnienie jakości pomiarów chemicznych. Walidacja procedur analitycznych, zapewnienie spójności pomiarowej i oszacowanie niepewności wyniku pomiaru, 12.06.2020,
3. Przeprowadzenie zajęć dydaktycznych w ramach IX edycji Studiów Podyplomowych „Analityka Chemiczna”,
4. Przeprowadzenie zajęć dydaktycznych w ramach VIII edycji Studiów Podyplomowych „Analityka Chemiczna”,
5. Przeprowadzenie zajęć dydaktycznych w ramach VII edycji Studiów Podyplomowych „Analityka Chemiczna”,
6. Przeprowadzenie zajęć dydaktycznych w ramach VI edycji Studiów Podyplomowych „Analityka Chemiczna”,

7. Czynny udział w przygotowaniu i realizacji wydarzenia: „Pokaz zastosowań techniki ablacji laserowej połączonej ze spektrometrią mas z jonizacją w plazmie sprężonej indukcyjnie (LA-ICP-MS)” w ramach Nocy Naukowców, 30 września 2016,
8. Przeprowadzenie warsztatów z zakresu metrologii chemicznej dla studentów Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej w ramach Projektu Zintegrowany Program Politechniki Łódzkiej w latach 2018 i 2019,
9. Prowadzenie sekretariatu VIII edycji Studiów Podyplomowych „Analityka Chemiczna”,
10. Prowadzenie sekretariatu VII edycji Studiów Podyplomowych „Analityka Chemiczna”,
11. Prowadzenie sekretariatu VI edycji Studiów Podyplomowych „Analityka Chemiczna”,
12. Prowadzenie sekretariatu V edycji Studiów Podyplomowych „Analityka Chemiczna”,
13. Udział w organizacji konferencji „VII Konferencja Chemometria i Metrologia w Analityce”, 6-8.03.2019, Poznań,
14. Udział w organizacji konferencji „VI Konferencja Chemometria i Metrologia w Analityce”, 1-3.03.2017, Poznań,
15. Udział w organizacji konferencji „Analiza specjacyjna – możliwości i kierunki rozwoju”, 5-6.03.2020, Poznań,
16. Udział w organizacji konferencji „Analiza specjacyjna – możliwości i kierunki rozwoju”, 1-2.03.2018, Poznań,
17. Udział w organizacji konferencji „Analiza specjacyjna – możliwości i kierunki rozwoju”, 4-5.03.2016, Poznań.

#### **Udział w kursach i szkoleniach**

1. „Szkolenie w zakresie zapewnienia jakości pobierania próbek wody do badań”

Organizator: Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Poznaniu, 30-31.05.2019, Poznań,

2. "Warsztaty z wykorzystania metod chemometrycznych w praktyce (kurs zaawansowany)"

Warsztaty zorganizowane w ramach konferencji „VII konferencja Chemometria i Metrologia w Analityce”, 6-8.03.2019, Poznań,

3. "Warsztaty z wykorzystania metod chemometrycznych w praktyce (kurs podstawowy)"

Warsztaty zorganizowane w ramach konferencji „VI Konferencja Chemometria i Metrologia w Analityce”, 1-3.03.2017, Poznań,

4. "Warsztaty z zasad zastosowania metrologii w pomiarach chemicznych"

Warsztaty zorganizowane w ramach konferencji „VI Konferencja Chemometria i Metrologia w Analityce”, 1-3.03.2017, Poznań,

5. „Measurement Science in Chemistry Summer School”

Szkoła letnia zorganizowana przez Konsorcjum Measurement Science in Chemistry, 12-25.07.2015, Puławy,

6. „Auditing water issues”

Kurs On-Line zorganizowany przez Uniwersytet w Tartu,

7. “Estimation Of Measurement Uncertainty In Chemical Analysis”

Kurs On-Line zorganizowany przez Uniwersytet w Tartu,

8. "LC-MS Method Validation"

Kurs On-Line zorganizowany przez Uniwersytet w Tartu.

### **Nagrody i wyróżnienia**

1. Grant umożliwiający prezentację wyników badań na Międzynarodowej Konferencji: European Winter Conference Plasma Spectrochemistry, February 3-8, 2019 PAU, Francja, 2019,
2. Zwiększenie stypendium doktoranckiego z dotacji projakościowej w roku akademickim 2017/2018,
3. Nagroda zespołowa III stopnia za osiągnięcia naukowe, przyznana przez Rektora UAM w latach 2017 i 2018,
4. Komunikaty konferencyjne drukowane wyróżnione podczas sesji plakatowej w ramach Jubileuszowego XXV Poznańskiego Konwersatorium Analitycznego, 6-8.04.2016, Poznań:
  - a. "Nowoczesne techniki sprzężone w badaniach procesu fitoremediacji",
  - b. "Przegląd strategii kalibracji stosowanych w analizie pierwiastkowej tkanek miękkich techniką LA-ICP-MS".