



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Bernardo Marcioš

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

M. S. Reid , K. S. Hoy, J. R.M. Schofield, J. S. Uppal, Y. Lin, X. Lu, H. Peng, X. C. Le,  
Arsenic speciation analysis: A review with an emphasis on chromatographic separations,  
*Trends. Anal. Chem.* **123** (2020)

**KEMIJSKI SEMINAR 1**

Poslijediplomski sveučilišni studij Kemije

Zagreb, 2024

---

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>2</b>
<b>2. SPECIJE ARSENA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Kemizam specija arsena i distribucija u okolišu.....	3
2.2. Toksičnost arsenovih specija .....	4
<b>3. PRISUTNOST ARSENOVIH SPECIJA U HRANI</b> .....	<b>5</b>
3.1 Zakonodavstvo i regulativa europske unije .....	5
3.2 Hrana i prisutnost specija arsena.....	6
3.2.1 Riža .....	7
3.2.2 Hrana za dojenčad i malu djecu na bazi riže.....	8
3.2.3 Pića na biljnoj bazi.....	9
3.2.4 Hrana morskog porijekla.....	10
3.2.5 Dodatci prehrani.....	11
<b>4. ELEMENTNA SPECIJACIJSKA ANALIZA ARSENA</b> .....	<b>12</b>
4.1 Priprema uzoraka .....	12
4.2 Instrumentne tehnike za razdvajanje specija arsena .....	13
4.2.1 Tekućinska kromatografija s anionskom izmjenom .....	13
4.2.2 Tekućinska kromatografija s kationskom izmjenom .....	14
4.2.3 Tekućinska kromatografija obrnutih faza .....	15
4.2.4 Tekućinska kromatografija ionskih parova.....	15
4.2.5 Tekućinska kromatografija hidrofilnih interakcija (HILIC).....	16
4.3. Instrumentne tehnike za detekciju i identifikaciju arsenovih specija .....	16
<b>5. NOVA SAZNAJANJA U PODRUČJU SPECIJACIJE ARSENA</b> .....	<b>17</b>
5.1 Vezani sustav ionske kromatografije s mikrovalno induciranom dušikovom plazmom pri atmosferskom tlaku uz spektrometriju masa (IC-MICAP-MS).....	17
5.2. Vezani sustav plinske kromatografije s spektrometrijom masa uz induktivno spregnutu plazmu (GC-ICP-MS).....	18
5.3. Kapilarna elektroforeza (CE).....	19
5.4. Nanomaterijali u specijacijskoj analizi arsena.....	20
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>21</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>22</b>

## 1. UVOD

Arsen (As) je kemijski element koji je prirodno prisutan u okolišu i u zemljinoj kori, a kemijskim procesima ispiranja i erozije minerala se oslobađa u prirodu, ponajviše u vode. Izloženost arsenu smatra se globalnom opasnosti za ljudsko zdravlje, a glavni izvor je konzumacija vode i hrane. Razumijevanje kemijskih i biokemijskih reakcija specija arsena pruža informacije o toksičnosti. Osim akutne toksičnosti, dugotrajna izloženost pojedinim arsenovim specijama može uzrokovati kardiovaskularne i neurološke bolesti, lezije na koži i rak.

Postoji više od 100 različitih vrsta arsenovih spojeva koji su prisutni u okolišu i biološkim sustavima, a njihova toksičnost ovisi o njihovom kemijskom obliku i oksidacijskom stanju. Iz navedenog razloga vrlo je važno imati mogućnost zasebno kvantificirati svaku pojedinu speciju arsena kako bi se bolje razumjela njihova distribucija, transformacija, toksičnost, metabolizam i utjecaji na zdravlje.

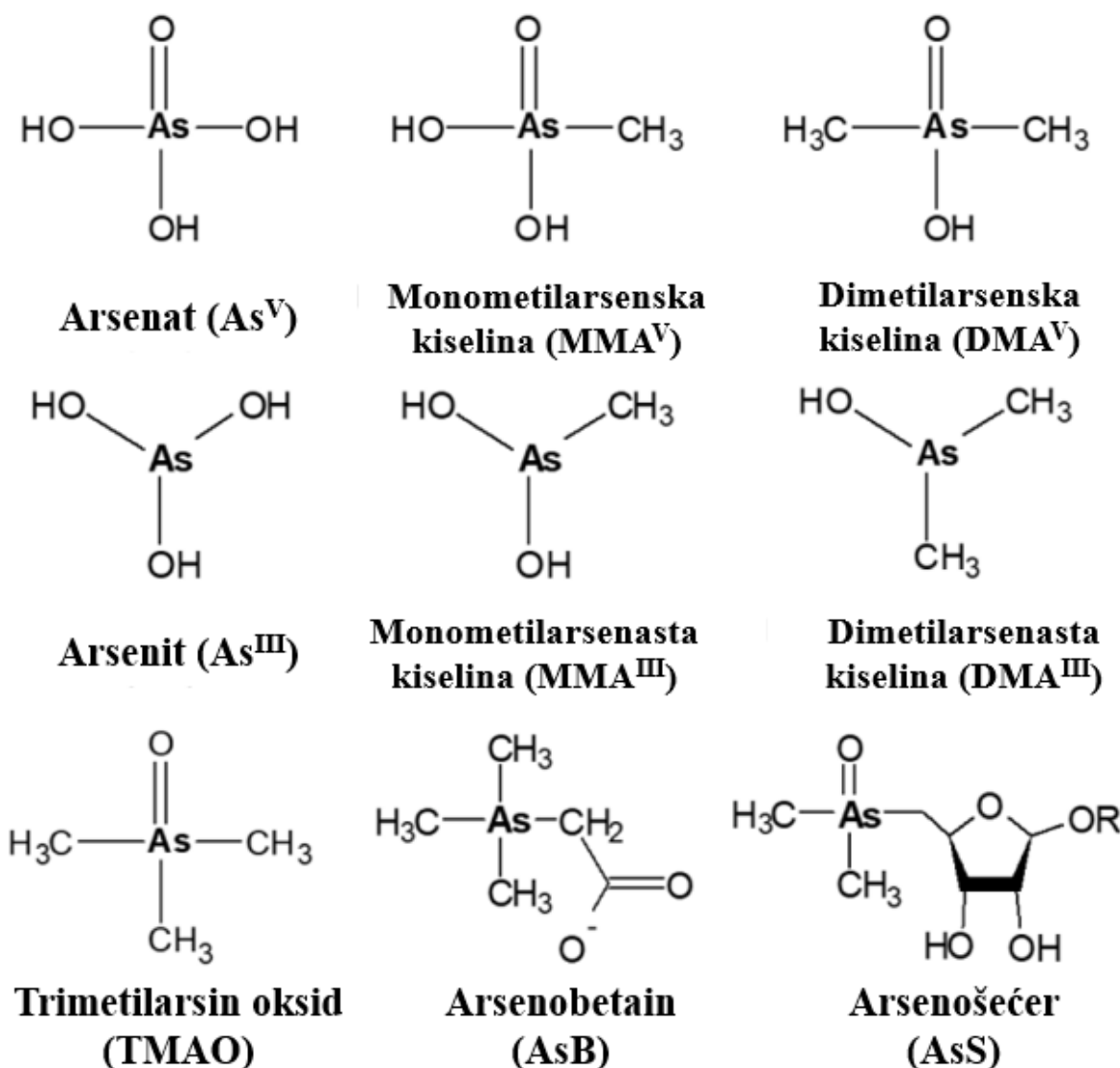
Instrumentna tehnika koja se najčešće koristi za provođenje elementne specijacijske analize arsena je vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti sa spektrometrijom masa uz induktivno spregnutu plazmu (HPLC-ICP-MS). Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) ima vrlo važnu funkciju jer razdvaja specije arsena kako bih se mogla provesti njihova kvantifikacija na odgovarajućem detektoru. Detektor koji se najčešće koristi je upravo spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS) zbog svojstava kao što su visoka ionizacijska efikasnost, mogućnosti uklanjanja interferencija, selektivnost i veliki dinamički raspon. Jedini nedostatak navedenog vezanog sustava je to što ne daje informaciju o molekuli specije već identifikacija pojedine specije ovisi o usporedbi retencijskih vremena sa komercijalno dostupnim standardima.

U zadnjih nekoliko godina sve se više koristi instrumentna tehnika spektrometrija masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS) u kombinaciji sa tehnikom HPLC-ICP-MS za identifikaciju i kvantifikaciju novih arsenovih specija. Spektrometrija masa uz ionizaciju elektroraspršenjem daje informaciju o fragmentaciji molekule i o molekulskom ionu u svrhu određivanja nepoznatih arsenovih specija.<sup>1</sup>

## 2. SPECIJE ARSENA

### 2.1 Kemizam specija arsena i distribucija u okolišu

Arsen (As) se u prirodi javlja u četiri oksidacijska stanja (-3, 0, +3 i +5). Navedene različita oksidacijska stanja omogućuju veliku kemijsku reaktivnost zbog vrlo visokog afiniteta vezanja sa ostalim kemijskim elementima. Najbitnije kemijske specije arsena prikazane su na Slici 1.



Slika 1. Najzastupljenije specije arsena u okolišu, preuzeto [2]

Arsenove specije se dijele u dvije skupine, anorganske specije (iAs) i organske specije (oAs). Najzastupljenije anorganske specije u prirodi su arsenit (As(III)) i arsenat (A(V)). Arsenit prevladava u redukcijskim okolišnim uvjetima, a arsenat u okolišnim uvjetima bogatim kisikom.

Većina organskih specija nastaje biološkom aktivnošću u biološkim sustavima, osim arsenobetaina (AsB), arsenokolina (AsC), trimetilarsin oksida (TMAO) i arsenošećera (AsS) koji nastaju reakcijom anorganskog arsena (iAs) sa organskim tvarima u okolišu. Preostale organske specije, monometilarsonska kiselina (MMA) i dimetilarsinska kiselina (DMA), najzastupljenije su u vodenom okolišu.<sup>2</sup>

## 2.2. Toksičnost arsenovih specija

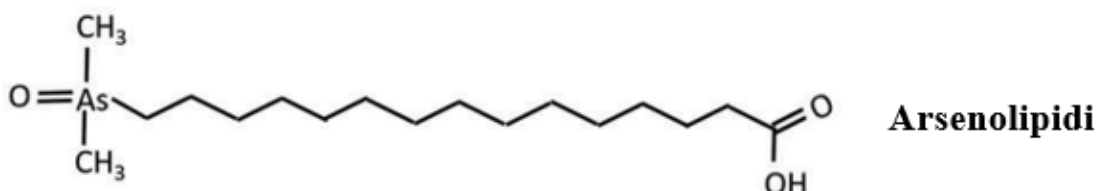
Arsen je 1980. godine svrstan u ljudske kancerogene od strane Međunarodne agencije za istraživanje raka (IARC). Anorganske specije (iAs) arsenit (As(III)) i arsenat (As(V)) svrstani su po klasifikaciji u grupu 1 (kancerogene tvari), dok su metilirane organske specije MMA i DMA svrstane u grupu 2 (potencijalno kancerogene tvari). Kronična izloženost visokim koncentracijama arsena može imati štetan učinak na ljudsko zdravlje kao što je razvoj raka (rak urinarnog trakta, kože, jetre ili pluća), respiratorne probleme (bronhiektazije), kardiovaskularne probleme i lezije kože (keratoze), dok kronična izloženost malim koncentracijama može uzrokovati hiperpigmentaciju kože, gastrointestinalne probleme ili dijabetes.<sup>3</sup>

Pretpostavlja se da metilirani As spojevi nastaju iz anorganskog arsena mehanizmima detoksikacije jer metilacija potiče izlučivanje metala iz organizma. Postoje istraživanja koja pokazuju da zbog navedenog metabolizma pretvorbe MMA u DMA također može doći do razvoja raka što je povezano sa akutnom toksičnošću DMA koja u visokim koncentracijama može biti kancerogena. U nekim *in vivo* i *in vitro* testovima pokazalo se da je MMA<sup>III</sup> više toksičan od As<sup>III</sup> što dovodi u pitanje hipotezu da je metilacija anorganskog arsena proces detoksikacije organizma.

Arsenobetain i arsenošećeri smatraju se manje opasnim za ljudsko zdravlje. Arsenobetain se brzo izlučuje nepromijenjen iz ljudskog organizma putem urina, a pretpostavlja se da u vodenom okolišu nastaje raspadanjem arsenošećera nakon čega slijedi metilacija i oksidacija. Arsenošećeri se prvo metaboliziraju u DMA, a zatim izlučuju iz organizma što pokazuje da DMA nastaje i biotransformacijom arsenošećera i arsenolipida, a ne samo kao rezultat metilacije anorganskog arsena. Analiza urina, nakon konzumacije školjaka koje su bogate arsenošećerima, pokazala je da 2/3 izlučenog arsena korelira sa koncentracijom DMA. *In vivo* i *in vitro* testovi pokazali su da konzumacija arsenošećera povećava oksidativni stres, uzrokuje oštećenja DNA u krvi i hipokampusu i vjerojatno je odgovorna za motorička i kognitivna oštećenja kod miševa.

Arsenolipidi (AsL) i njihova toksičnost nije još dovoljno istražena (**Slika 2.**). Razlog tome je što njihova struktura nije još dovoljno poznata, a karakteristike (bioraspoloživost, transport i

metabolizam) se vrlo teško evaluiraju. Trenutno dostupne informacije govore o tome da se arsenolipidi vrlo brzo apsorbiraju kroz stijenke probavnog sustava, no za razliku od arsenobetaina, metaboliziraju se prije izlučivanja iz organizma. Sumnja se da bi arsenolipidi mogli imati potencijalni citotoksični učinak kao As(III).<sup>4</sup>



Slika 2. Struktura arsenolipida (AsL), preuzeto [4]

### 3. PRISUTNOST ARSENOVIH SPECIJA U HRANI

#### 3.1 Zakonodavstvo i regulativa europske unije

Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) 2021. godine izdala je izvještaj o kroničnoj izloženosti anorganskom arsenu kroz hranu. Napravljena je procjena na temelju 13 608 dostupnih rezultata za anorganski arsen, 7 623 za vodu i 5985 za različite matrice hrane. Najzastupljenija kategorija hrane bila je „žitarice i hrana na bazi žitarica“ s naglaskom na rižu i proizvode na bazi riže. Zaključeno je da najveći izvor izloženosti anorganskom arsenu riža i proizvodi na bazi riže, žitarice i proizvodi na bazi žitarica koji ne sadržavaju rižu te pitka voda. Utvrđeno je da su najugroženija skupina upravo djeca zbog hrane namijenjenoj dječjoj populaciji (hrana na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu, keksi, dvopeci i kolačići za djecu, početna hrana za dojenčad, prijelazna hrana za dojenčad, hrana za posebne medicinske potrebe namijenjena dojenčadi i malo djeci te hrana i voćni sokovi za malu djecu).

Temeljem toga EFSA nastavlja sa preporukama za monitoringom, uvođenjem validiranih analitičkih metoda koje su dovoljno osjetljive za kvantifikaciju anorganskog arsena i praćenjem ostalih specija arsena u ostalim kompleksnim matricama hrane kao što gljive, morske trave i alge.<sup>5,6</sup>

U skladu sa prethodno navedenim Europska komisija (EC) kao glavno regulatorno tijelo donijela je novu Uredbu komisije (EU) 2023/465 o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1881/2006 u pogledu najvećih dopuštenih količina arsena u određenim vrstama hrane sa proširenim matricama i najvećim dopuštenim količinama (NDK). Nove matrice i NDK vrijednosti prikazane su u Tablici

1. Iste godine donesena je i nova Uredba komisije (EU) 2023/915 o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani o stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br. 1881/2006 unutar koje su obuhvaćene sve izmjene vezane uz nove matrice i NDK vrijednosti za anorganski i ukupni arsen (**Tablica 1.**).<sup>7,8</sup>

*Tablica 1. Najveće dopuštene količine (NDK) arsena u različitim matricama hrane*

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

### 3.2 Hrana i prisutnost specija arsena

Urbanizacija i industrijalizacija su jedni od glavnih puteva kojima čovjek u današnje vrijeme teži u svrhu razvoja, međutim antropogenim aktivnostima i prirodnim pojavama doveo je do stvaranja različitih kontaminanata koji zagađuju okoliš, a jedan od njih je i arsen. Kvaliteta tla je od velike važnosti (u kontekstu sadržaja arsena) jer je direktno povezana sa sigurnošću hrane, uzgojem biljnih vrsta, produktivnosti i zdravlju čovjeka. Uzgojem usjeva u tlu kontaminiranom arsenom dolazi do njegova transporta preko sustava unosa minerala i ulaza u jestive dijelove čijom konzumacijom dolazi do opasnosti za ljudsko zdravlje. Osim usjeva, mogući unos arsena je putem kontaminirane vode, hrani na bazi morskih plodova i proizvoda životinjskog porijekla. Proizvodi kao što su mlijeko, meso, jaja, riba i ostali mliječni proizvodi i proizvodi na bazi peradi također su mogući izvori ako se životinje hrane usjevima i vodom koji su kontaminirani arsenom.<sup>9</sup>

### 3.2.1 Riža

Riža je jedna od glavnih i osnovnih namirnica za pola populacije u svijetu. Arsen u riži predstavlja jednu od glavnih opasnosti i zabrinutosti za zdravlje milijuna ljudi u čitavom svijetu kojima je to osnovna namirnica u prehrani s obzirom da je izvrstan izvor ugljikohidrata, minerala i esencijalnih vitamina. Preporuča se ljudima koji boluju od celijakije jer ne sadrži gluten. Također je prva namirnica koja se daje dojenčadi zbog svoje palatabilnosti i vrlo male vjerojatnosti izazivanja alergijskih reakcija.

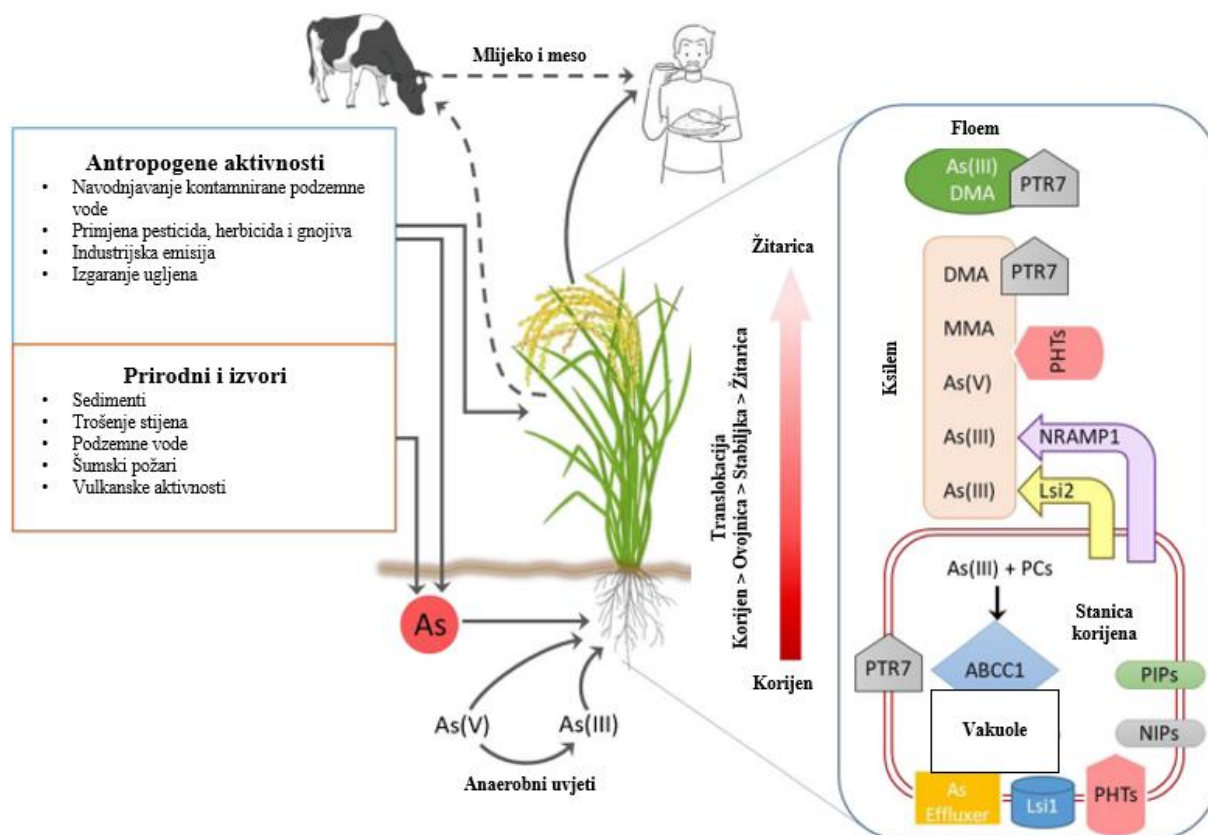
Anaerobni uvjeti uzgoja na velikim poplavljenim poljima i specifična fiziologija omogućuje biljci da apsorbira veliku koncentraciju arsena iz tla koji se akumulira u različitim dijelovima žitarice i to čak do 10 puta više nego bilo koja druga komercijalna žitarica (npr. Kukuruz). Razlog tome je brža mobilizacija arsenita ( $\text{As(III)}$ ) iz kontaminiranog tla uzrokovano otapanjem željezovog oksida ili hidroksida reakcijom redukcije u anaerobnim uvjetima i vrlo efikasnim Si transportom (**Slika 3.**).

Koncentracija ukupnog arsena (uAs) u riži (listovi i stabljika) u linearnoj je korelaciji sa koncentracijom arsena u tlu i vodi. Međutim, koncentracija nije jednaka u svim dijelovima biljke, najviše arsena nalazi se u žitarici, a najmanje u korijenu. Mljevenje i poliranje riže smanjuje koncentraciju ukupnog arsena što se vidi i toga da smeđa riža sadrži najveće koncentracije arsena, zatim slijedi tehnološki obrađena smeđa riža, bijela riža i zatim sa najmanjom koncentracijom arsena tehnološki obrađena bijela riža.

Kada govorimo o prisutnim specijama arsena u riži, najzastupljenija specija je anorganski arsen ( $\text{iAs}$ ), zbroj arsenita ( $\text{As(III)}$ ) i arsenata ( $\text{As(V)}$ ). Anorganski arsen u prosjeku čini 70 % ukupnog arsena u riži, a u smeđoj riži čini i do 80 % ukupnog arsena. Prije pripreme za jelo preporuča se oprati rižu u vodi i dobro procijediti jer se na taj način može ukloniti čak do 60 % ukupnog sadržaja arsena. Navedena metoda preporuča se za sve vrste riža, neovisno o njenom podrijetlu i vrsti.

Neke vrste riža kao što su Basmati riža i Jasmin riža sadrže niže koncentracije arsena nego ostale vrste. Ukupan sadržaj u kuhanoj riži može ovisiti i o sadržaju arsena u vodi koja je služila za kuhanje i samom načinu kuhanja.<sup>10</sup>





Slika 3. Put izloženosti čovjeka arsenu kroz sustav tlo-voda-usijev-hrana, preuzeto [10]

### 3.2.2 Hrana za dojenčad i malu djecu na bazi riže

Namirnice koje se najčešće koriste za prehranu dojenčadi i male djece su riža i dječja hrana na bazi riže. Razlog tome je blagi okus, prisutnost željeza i vrlo mala vjerojatnost za pojavu alergijske reakcije. Kod dojenčadi i male djece omjer konzumacije hrane prema tjelesnoj masi je puno veći nego kod odrasle osobe, što dovodi to toga da je izloženost arsenu veća nego kod opće populacije. Smeđa riža kao integralna žitarica posjeduje veće koncentracije ukupnog arsena (uAs), a time i anorganskog arsena (iAs) i kada se koristi za proizvodnju hrane da dojenčad i malu djecu dodatno se povećava izloženost anorganskom arsenu.

U zadnje vrijeme sve je popularnija i riža iz organskog uzgoja koja posjeduje veće koncentracije anorganskog arsena (iAs) od riže neorganskog porijekla. Veliki broj proizvođača dječje hrane prelazi na hranu organskog porijekla jer se smatra da je takva hrana zdravija i ima veću nutritivnu vrijednost. Istraživanja su pokazala da u velikom broju zemalja u svijetu djeca i dojenčad su izložena povećanim koncentracijama arsena iz hrane za dojenčad i malu djecu što je zabrinjavajuće.<sup>11</sup>

Dojenčad, mala djeca i osobe koje su alergične na hranu su jedne od najosjetljivijih populacijskih grupa kod kojih bi trebalo posvetiti najviše pažnje kada se biraju prehrambeni proizvodi za konzumaciju. Hrana za dojenčad se u prošlosti uvijek vrlo pomno birala i pripremala kod kuće, no u današnje vrijeme brzog i modernog života sve se više bira komercijalno dostupna hrana.<sup>12</sup>

Istraživanje i unutarnja analiza provedene u Americi pokazale su da svakih 50-60 grama riže koja se doda u obrok povećava koncentraciju arsena u urinu čak 14 puta. Izloženost arsenu u ranijoj dobi povezana je sa utjecajem na rast i razvoj djece i te ostalim negativnim posljedicama kao što je visoki krvni tlak i neispravan rad bubrega te povećan rizik od razvoja raka. Važno je i naglasiti da se ukupna koncentracija arsena u riži ne smanjuje prilikom industrijske obrade u komercijalni oblik hrane te na kraju završava u konačnom proizvodu u punoj koncentraciji. Preporuka je da se djeci daje maksimalno 1 obrok riže tjedno i da se poveća raznolikost obroka putem drugih žitarica koje sadrže arsen u manjim koncentracijama.<sup>13</sup>

### 3.2.3 Pića na biljnoj bazi

Pića na biljnoj bazi su u posljednjih par godina postala vrlo popularan proizvod. Broj takvih proizvoda koji nudi prehrambena industrija se u proteklih par godina drastično povećao. Glavni razlog konzumaciji navedenih proizvoda je intolerancija na sastojke životinjskog porijekla kao što je laktoza ili mliječni proteini iz kravljeg mlijeka. Drugi razlog su trendovi i težnja prema zdravijoj prehrani gdje se isključuju pojedine namirnice životinjskog porijekla. Temeljem toga prehrambena industrija polako je zamijenila masovnu proizvodnju mlijeka sa pićima na biljnoj bazi čiji glavni sastojak su kokos, zob, soja, proso, riža, bademi, lješnjaci ili konoplja.

Koncentracija arsena u takvim proizvodima ovisi upravo o glavnom sastojku koji prolazi kroz postupak natapanja, izbjeljivanja ili guljenja nakon prethodnog usitnjavanja u svrhu postizanja homogenosti sastojka. Najveće koncentracije arsena pronađene su proizvodima gdje je glavni sastojak riža i kombinacija riže sa kokosom. Nakon toga slijede pića na bazi prosa, soje i zobi. Najmanja koncentracija arsena utvrđena u pićima na bazi badema te su ona najsigurnija za konzumaciju. Kada govorimo o specijama arsena u takvim proizvodima, najzastupljenije su anorganske specije arsenit i arsenat, i to najviše u pićima na bazi riže, zatim slijede pića na bazi riže i kokosa te pića na bazi prosa. Najmanje anorganskih specija uočeno je u pićima na bazi soje, badema i zobi. Nije uočena prisutnost organskih specija arsena kao što su MMA, DMA, arsenokolin ili arsenobetain.<sup>14</sup>

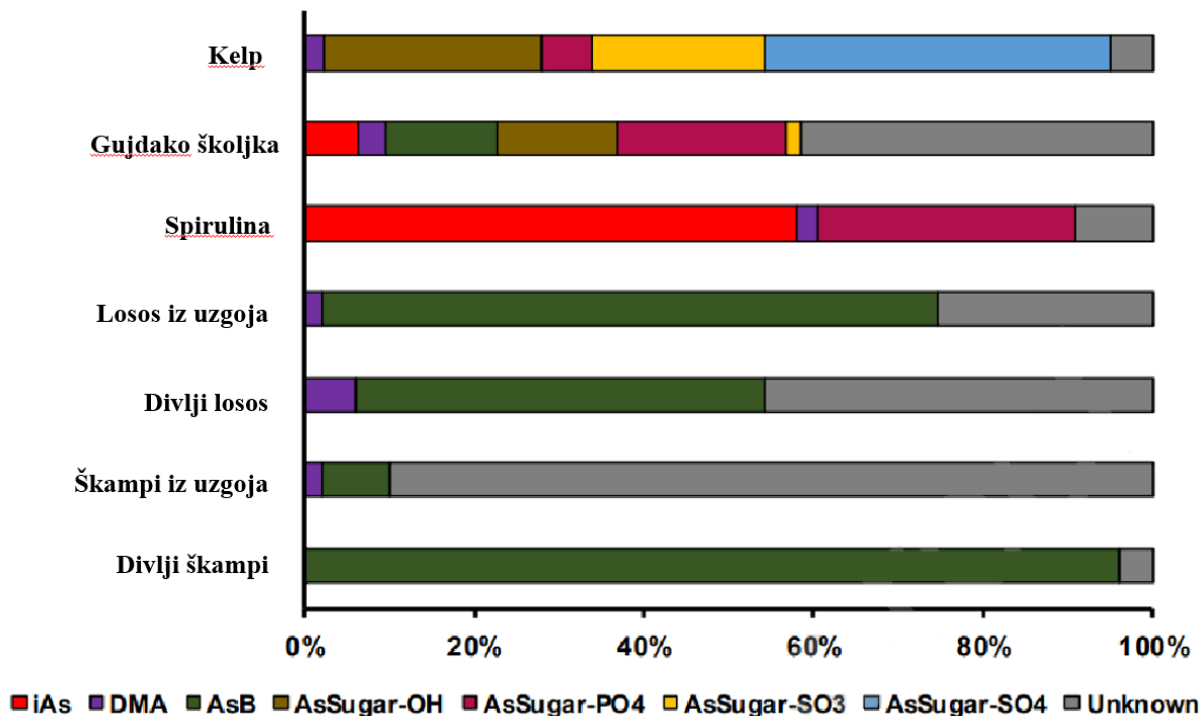
### 3.2.4 Hrana morskog porijekla

Morski organizmi su važan izvor osnovne i funkcionalne hrana ali isto tako su izvor izloženosti ukupnom arsenu. Hrana morskog porijekla obuhvaća široku grupu morskih organizama kao što su mekušci, školjke, ribe i alge. Iako postoje dokazi da imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje kada se konzumiraju u umjerenim količinama postoje i rizici i negativni utjecaji zbog izloženosti arsenu koji je prisutan u tim organizmima kao kontaminant u obliku organskih specija.

Postoje i iznimke jer neki morski organizmi imaju povećanu koncentraciju i anorganskog arsena (iAs). Kao primjer takvih organizama je jestiva morska trava Hijiki (*Hizikia fusiformis*), slatkovodne ribe sa Tajlanda, i plava dagnja iz Norveške. Morske alge i školjke su zapravo izvori raznolikih specija arsena. Toksičnost arsena, bioakumulacija i mobilnost najviše ovise o kemijskom obliku i stupnju metilacije.

Mikroalge su glavi izvor anorganskog arsena (iAs) u morskome okolišu u predstavljaju vrlo važan put u migraciji arsena kroz prehrambeni lanac. Anorganski arsen se apsorbira iz morske vode u obliku arsenata ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) i zatim metabolizira u algama u razne organske specije arsena, sa naglaskom na arsenošćere (AsS). U područjima kao što je Azija izloženost arsenošćerima je vrlo velika s obzirom da su njihove prehrambene navike bazirane na morskome travi. Trenutna epidemiološka istraživanja nisu dala indikacije da konzumacija morske trave dovodi do akutne i kronične toksičnosti. Alge kao što su spirulina koja ima velike nutritivne beneficije može akumulirati i neesencijalne elemente kao što je arsen. Vrlo često se koristi kao dodatak prehrani u velikim količinama kroz duži period što povećava rizik od izloženosti toksičnim oblicima arsenovih specija.

Masene koncentracije anorganskih i organskih specija variraju ovisno o morskome organizmu. Škampi i ribe uglavnom sadrže manji broj arsenovih specija gdje uglavnom dominira organska specija arsenobetain, dok alge i školjke pokazuju spektar različitih organskih i anorganskih arsenovih specija (**Slika 4.**).<sup>15</sup>



Slika 4. Relativni maseni omjeri arsenovih specija u postocima za različite morske organizme, preuzeto [15]

### 3.2.5 Dodatci prehrani

Prema definiciji EFSA-e dodatci prehrani su koncentrirani izvori nutrijenata (ili drugih tvari) sa nutritivnim ili fiziološkim efektom. Uzimaju se u obliku tableta ili kapsula (slično kao lijekovi) ali nisu namijenjeni za liječenje ili sprječavanje specifičnih bolesti već im je glavna funkcija dovoljan unos nutrijenata ili drugih tvari za fiziološke funkcije u organizmu. Njihova primjena je opravdana u slučaju kada postoji nedostatak nutrijenta ili tvari u organizmu, no u većini slučajeva potreba za nutrijentima je zadovoljena dobro balansiranim i raznolikim prehranbenim navikama. Neovisno o tome, konzumacija dodatka prehrani sve više raste, kako kod odraslih tako i kod djece.

Dodatci prehrani mogu biti sintetskog porijekla kao što su proizvodi na bazi minerala i vitamina koji su proizvedeni od sirovine čija kvaliteta je certificirana ili mogu biti proizvedene od sirovina biljaka ili životinja kao što su biljke, gljive, alge, lišajevi ili ribe. Svrha sintetskih dodataka prehrani je unos esencijalnih vitamina, minerala ili elemenata u tragovima kod nedostatka istih u organizmu. Svrha „prirodnih“ dodatak prehrani je puno šira. Brusnice se koriste za sprječavanje upale urinarnog trakta, kurkuma preko kurkuminoida umanjuje simptome artritisa, a proizvodi na bazi ashwagandhe se koriste kod povećanog stresa. Najveći udio tržišta trenutno čine proizvodi na bazi vitamina i minerala, no sve je više u porastu primjena „prirodnih“ dodataka prehrani,

pogotovo dodataka prehrani na bazi algi gdje dominiraju spirulina i korela. Glavni razlog primjene tih dviju algi je to što su velik izvor proteina, masnih kiselina, vitamina (B<sub>12</sub>, C i E) i elemenata kao što su kalcij, magnezij, fosfor, cink i željezo.

Kada se govori o izloženosti arsenu preko navedenih dodataka prehrani, najveću koncentraciju arsena sadrže upravo dodatci prehrani na bazi morskih organizama kao što su alge (spirulina i korela) jer alge imaju svojstvo akumuliranja metala. Ono što također povećava izloženost toksičnim elementima je to što se ponekad istovremeno konzumira nekoliko prirodnih dodataka prehrani istovremeno što je u porastu u zadnjih par godina.<sup>16</sup>

## 4. ELEMENTNA SPECIJACIJSKA ANALIZA ARSENA

### 4.1 Priprema uzoraka

Prije odabira odgovarajuće metode razdvajanja arsenovih specija od interesa, potrebno je odabrati odgovarajuću metodu pripreme uzoraka ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima traženih specija i matrici hrane. S obzirom na veliki broj različitih arsenovih specija, odabir odgovarajuće metode za pripremu uzoraka koja će omogućiti dobru ekstrakciju i neće dovesti do međukonverzije specija vrlo je izazovno. Kako bi se spriječila konverzija specija jedne u drugu potrebno je primijeniti blaže metode ekstrakcije.

Otapala koja se smatraju blažim ekstrakcijskim otapalima su smjesa metanol-voda ili acetonitril-voda. Kombinacija metanol-voda (polarno otapalo) se koristi za ekstrakciju polarnih arsenovih specija, dok se smjesa metanol-kloroform ili heksan koristi za ekstrakciju nepolarnih specija. Osim pravilnog odabira smjese otapala vrlo je bitan i njihov omjer u smjesi zbog direktnog utjecaja na ekstrakciju arsenovih specija iz uzorka. Otapalo u obliku 1 M fosforne kiseline se pokazalo vrlo dobro u ekstrakciji arsenovih specija iz uzorka tla.

Matrica koja se analizira vrlo često može zakomplicirati razdvajanje i detekciju arsenovih specija. Ponekad je potrebno napraviti i postupak pročišćavanja nakon ekstrakcije kako bi se smanjio utjecaj matrice prilikom instrumentne analize uzoraka. To se najčešće provodi na kratkim kolonama sa stacionarnom fazom kao i glavna analitička kolona kako bi se zadržali analiti od interesa, a isprale interferirajuće tvari iz matrice.<sup>1</sup>

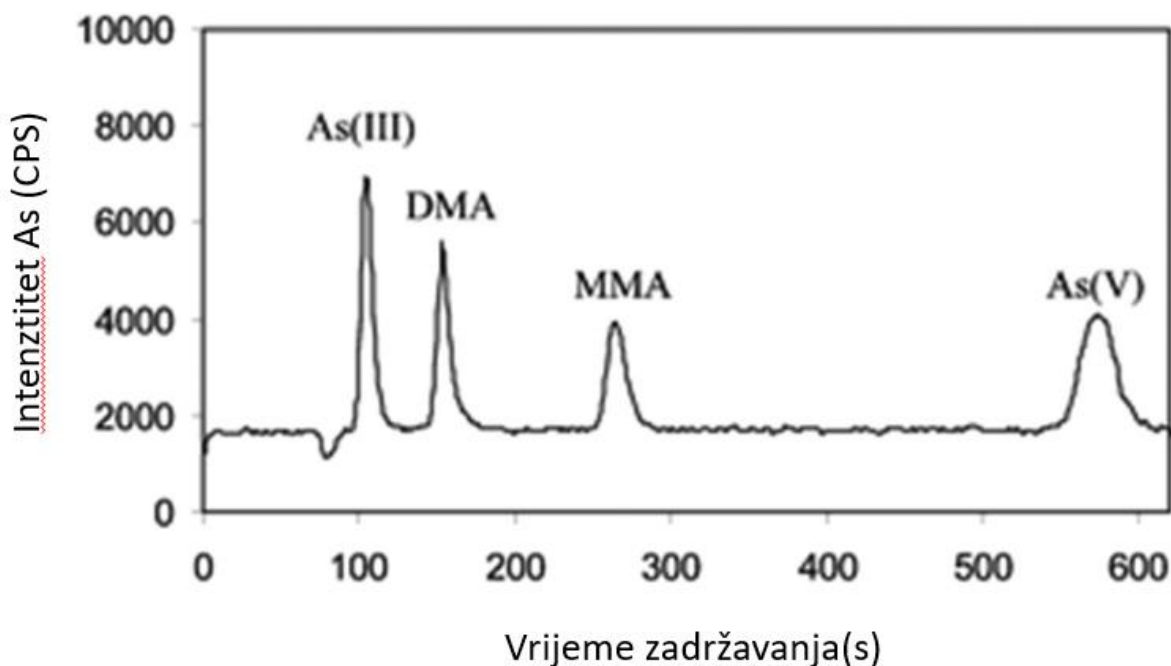
## 4.2 Instrumentne tehnike za razdvajanje specija arsena

### 4.2.1 Tekućinska kromatografija s anionskom izmjenom

Tekućinska kromatografija s anionskom izmjenom se koristi u analizi velikog broja arsenovih specija, uključujući arsenit (As(III)), arsenat (As(V)), monometilarsonska kiselina (MMA), dimetilarsinska kiselina (DMA), arsenobetain (AsB), arsenokolin (AsC) i za poneke arsenošćere (AsS), kao što su okso-arsenošćeri i tio-arsenošćeri.

Pri neutralnoj pH vrijednosti anorganska arsenova kiselina (As(V)), monometilarsonska kiselina (MMA) i dimetilarsinska kiselina (DMA) se deprotoniraju i formiraju anionsku speciju na temelju njihovih fizikalno kemijskog svojstva pKa vrijednosti, a anorganska arsenova kiselina (As(III)) postoji kao neutralna specija. Navedena svojstva omogućuju njihovo razdvajanje tekućinskom kromatografijom sa anionskom izmjenom.

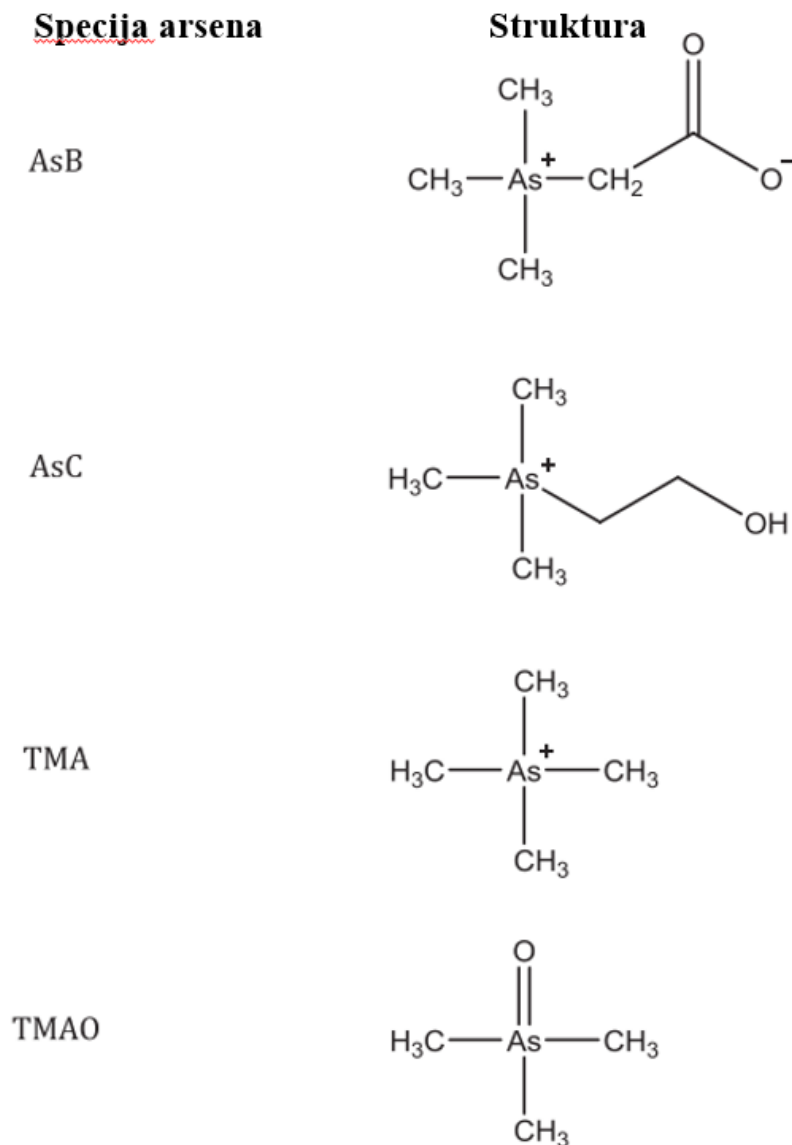
Za specijaciju arsena najčešće se koristi kolona sa jakom anionskom izmjenom (npr. PRP-X100) gdje je redoslijed eluiranja As(III), DMA, MMA, i As(V) u skladu sa njihovim relativnim pKa vrijednostima (Slika 5.)<sup>1</sup>



Slika 5. Primjer kromatograma na PRP-X100 anionskoj koloni sa vremenima zadržavanja pojedinih specija arsena, preuzeto [1]

#### 4.2.2 Tekućinska kromatografija s kationskom izmjenom

Tekućinska kromatografija s kationskom izmjenom uglavnom se koristi za specijacijsku analizu arsenovih specija sa pozitivnim nabojem kao što su arsenobetain (AsB), arsenokolin (AsC), trimetilarsin oksid (TMAO) i tetrametilaronijev ion (TMA) (Slika 6.)



Slika 6. Specije arsena sa pozitivnim nabojem AsB, AsC, TMAO i TMA, preuzeto [1]

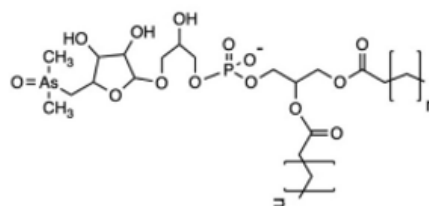
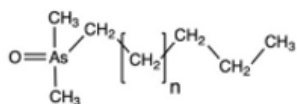
Ova vrsta tekućinske kromatografije funkcionira na vrlo sličnom principu kao i anionska, jedina razlika je ta što je stacionarna faza negativno nabijena kako bi mogla reagirati sa kationskim analitima. Vrijeme zadržavanja arsenovih specija u direktnoj je korelaciji sa nabojem, što je pozitivni naboj jači to je retencija specije veća.<sup>1</sup>

#### 4.2.3 Tekućinska kromatografija obrnutih faza

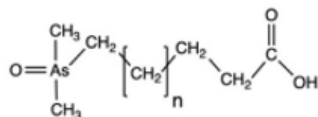
Tekućinska kromatografija obrnutih faza uglaznom se koristi za razdvajanje arsenolipida (AsL), kao što su ugljikovodici, masne kiseline i fosfolipidi sa sadržajem arsena u svojoj strukturi. Koriste se C<sub>18</sub> ili C<sub>8</sub> analitičke kolone gdje se arsenolipidi razdvajaju na temelju broja ugljikovih atoma, broju dvostrukih veza i ostalih funkcionalnih grupa u molekuli. Ova vrsta kromatografije u kombinaciji sa tehnikama ICP-MS i ESI-MS vrlo često se koristi se u određivanju i identifikaciji arsenolipida prisutnih u ribama i algama (**Slika 7**).<sup>1</sup>

#### Fosfolipidi koji sadrže arsen (AsPLs)

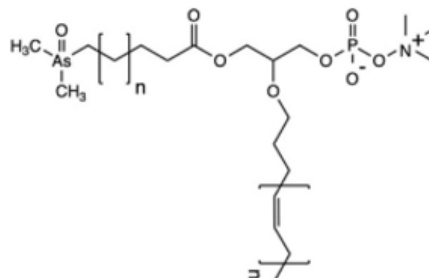
##### Ugljikovodici koji sadrže arsen (AsHCs)



##### Masne kiseline koje sadrže arsen (AsFAs)



##### fosfatidilkolini koji sadrže arsen (AsPCs)



Slika 7. Arsenolipidi identificirani u ribama i morskoj travi, preuzeto [1]

#### 4.2.4 Tekućinska kromatografija ionskih parova

Tekućinska kromatografija ionskih parova ima prednost jer može istovremeno razdvajati ionske i neutralne specije i ima vrlo široku primjenu u specijaciji arsena. Koristi se analitička kolona obrnutih faza (C<sub>18</sub>) i mobilna faza sa reagensom koji sadrži ionski par. Ionski par sadrži grupu sa nabojem koja stupa u interakciju sa analitom i hidrofobnu regiju koja stupa u interakciju sa stacionarnom fazom. Najčešći reagensi od interesa koji sadrže ionske parove od interesa za specijaciju anionskih i neutralnih specija arsena su tetrametilamonijak, tetrabutilamonijak i tetraetilamonijak, dok se za specijaciju kationskih i neutralnih arsenovih specija koriste heksansulfonska kiselina i 1-pentan sulfonska kiselina.<sup>1</sup>



#### 4.2.5 Tekućinska kromatografija hidrofilnih interakcija (HILIC)

Tekućinska kromatografija hidrofilnih interakcija je kromatografija s normalnim fazama gdje se koristi mobilnu fazu koja se inače primjenjuje kod kromatografije obrnutih faza. Hidrofilna stacionirana faza je obložena slojem vode iz mobilne faze, a retencija analita ovisi o njihovom prelasku u vodeni sloj ili adsorpciji na polarnu stacionarnu fazu. S obzirom da je stacionarna faza polarna, ova vrste kromatografije omogućuje istovremeno razdvajanje neutralnih, anionskih i kationskih specija. Navedeno ima veliku prednost upravo kod razdvajanje arsenovih specija s obzirom da unutar jedne matrice mogu biti prisutne specije svih navedenih karakteristika.<sup>1</sup>

#### 4.3. Instrumentne tehnike za detekciju i identifikaciju arsenovih specija

Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu je instrumentna tehnika koja se najčešće koristi za detekciju arsenovih specija zbog svojih svojstava kao što je visoka osjetljivost i selektivnost te veliki dinamički raspon. Također ovu tehniku karakterizira i primjena reakcijsko kolizijske ćelije (CRC) za uklanjanje izobarnih interferencija koje su dosta zastupljene upravo pri masi 75 na kojoj se određuje arsen. Ćelija funkcionira na principu uvođenja kolizijskog plina (Helija), reaktivnih plinova (kisika ili vodika) ili smjese navedenih plinova u ICP-MS. Primjenom tehnika kao što je ICP-QQQ sa trostrukim kvadrupolom (kvadrupol-CRC-kvadrupol) osim uklanjanja izobarnih interferencija, smanjuje se pozadinski šum i povećava se selektivnost prevođenjem arsena u molekularni oblik koji se zatim detektira na drugoj masi.

Spektrometrija masa uz ionizaciju elektroraspršenjem je instrumentna tehnika koja se najčešće koristi za identifikaciju arsenovih specija na temelju fragmentacije molekula arsenovih specija. Kada se koristi u kombinaciji sa HPLC-ICP-MS tehnikom omogućuje identifikaciju nepoznatih arsenovih specija i otkrivanje njihove strukture. Također može služiti kao detektor za arsenove specije kada eluiraju sa sličnim vremenima zadržavanja što nije moguće kada se koristi samo ICP-MS.<sup>1</sup>

## 5. NOVA SAZNANJA U PODRUČJU SPECIJACIJE ARSENA

### 5.1 Vezani sustav ionske kromatografije s mikrovalno induciranom dušikovom plazmom pri atmosferskom tlaku uz spektrometriju masa (IC-MICAP-MS)

U proteklih nekoliko godina razvijeno je nekoliko različitih mikrovalno induciranih plazma izvora (MIP) u svrhu analize metala u tragovima. Većina ih se koristi kao atomska emisijska spektroskopija. Prvi takvih sustavi su bazirani na plinovima kao što su argon (Ar) ili helij (He) i takve plazme s obzirom na malu snagu su imale problema sa niskom osjetljivošću, lošom tolerancijom na teže matrice te slabom atomizacijom. Kasnije su razvijeni MIP ionski izvori sa dušikom ( $N_2$ ) koji imaju veću snagu.

Najnoviji takav izvor je N2-MICAP koji može uspostaviti plazmu snage od 1000 W do 1500 W u zraku ili dušiku. Njegova primjena je zanimljiva kao dio vezanog sustava ionske kromatografije sa spektrometrijom masa u specijacijskoj analizi za određivanje elemenata koji su podložni interferencijama koje nastaju uslijed argonove plazme. To se prvenstveno odnosi na matrice koje su bogate kloridom koji sa argonom tvori navedene interferencije. Glavni element koji je najviše podložan spomenutim interferencijama je upravo arsen zbog interferencije  $^{40}Ar^{35}Cl^+$  pri  $^{75}As^+$ .

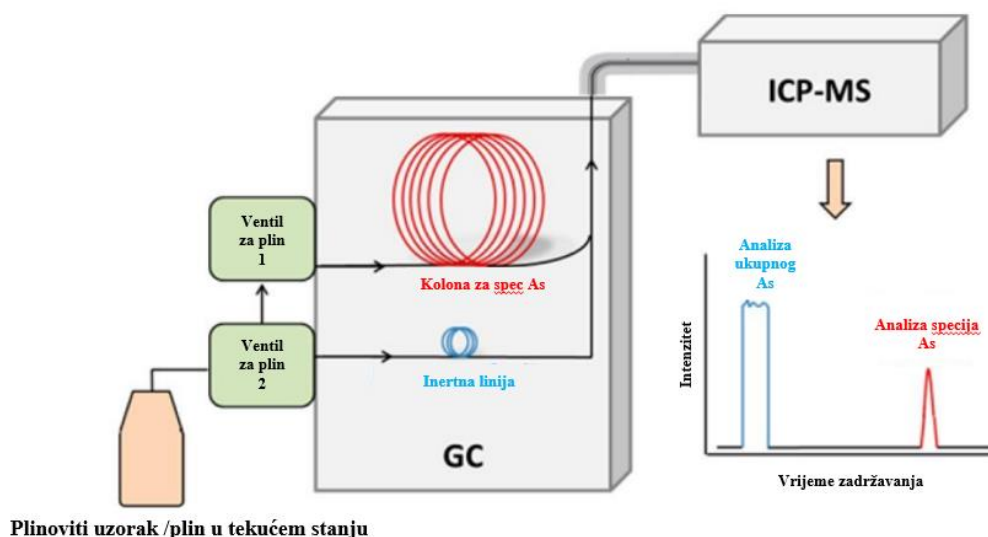
Kod analize uzoraka soli, koje su bogate kloridom, svoju prednost nad standardnom ICP-MS tehnikom pokazuje upravo MICAP-MS. Navedeni instrumenti ne pokazuju utjecaj matrice na kvantifikaciju do koncentracije soli od 0,1 % m/m. Pri većim koncentracijama soli kada se koristi ICP-MS dolazi do lažno uvećanog očitavanja koncentracije  $^{75}As^+$  zbog interferencije  $^{40}Ar^{35}Cl^+$ , a korištenjem MICAP-MS dolazi do supresije signala zbog lako ionizirajućeg natrija. Problematika se kod ICP-MS analize rješava reakcijsko-kolizijskom ćelijom i raznim matematičkim korekcijama, a kod MICAP-MS analize rješenja su adicija standarda, interna standardizacija i kalibracija matricom.

Svaka instrumentna tehnika ima svoje prednosti i mane. Prednost tehnike MICAP-MS je to što nisu potrebne kompleksne i vrlo skupe procedure kao što su reakcijskog kolizijska ćelija, instrumenti visoke rezolucije, matematičke korekcije kako bi se nadvladale interferencije pri analizi arsena. Osim što je manja cijena instrumenta, manja je cijena i dušika u usporedbi sa argonom. Također, MICAP-MS mogao bi se koristiti i u analizi bioloških uzoraka kao što su nokti, krvi i urin. Također, idealna primjena bila bi i za  $^{40}Ca^+$ ,  $^{56}Fe^+$  i  $^{80}Se^+$  koji imaju interferencije sa  $^{40}Ar^+$ ,  $^{40}Ar^{16}O^+$   $^{40}Ar_2$  ionima u standardnoj argon plazmi.<sup>17</sup>

## 5.2. Vezani sustav plinske kromatografije s spektrometrijom masa uz induktivno spregnutu plazmu (GC-ICP-MS)

Analiza uzoraka u plinovitom stanju i stanju gdje je plin preveden u tekući oblik još je uvijek izazov iako je analiza specija arsena moguća na raznim instrumentnim tehnikama. Glavna instrumentna tehnika za analizu takvih uzoraka je vezani sustav plinske kromatografije sa spektrometrijom masa uz induktivno spregnutu plazmu (GC-ICP-MS) sa tri različite metode.

Prva metoda je direktna analiza koja se koristi za određivanje ukupnog arsena i specija arsena bez koraka ukoncentriravanja što se postiže sa 2 međusobno povezana ventila za unos uzorka. Kroz jedan ventil prolazi uzorak inertnom linijom za određivanje ukupnog arsena, dok kroz drugi ventil uzorak prolazi analitičku kolonu za specijaciju u svrhu određivanja specija arsena (**Slika 8**). Navedena metoda štedi vrijeme, vrlo je praktična i se može koristiti za specijaciju žive istovremeno.



Slika 8. Prikaz vezanog sustava GC-ICP-MS za istovremeno određivanje ukupnog arsena i specija As, preuzeto[18]

Druga metoda je povećanje osjetljivosti i uklanjanje interferencija postupkom ukoncentriravanja preko slabe anionske kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi (SPE) prije analize na GC-ICP-MS. To je vrlo značajno kod kompleksnih matrica (npr. riblja ulja).

Treća metoda je korištenje kriogene stupice (CT) čime se povećava osjetljivost i diferencijacija hlapivih organskih specija. Takve specije se prvo prevedu u hidridni oblik, a zatim se love u kriogenu stupicu. Laganim povećanjem temperature, specije se oslobađaju na temelju temperatura vrelišta, dodatno razdvajaju na plinskoj kromatografiji, a zatim detektiraju na ICP-MS. Navedeni proces moguće je i potpuno automatizirati.<sup>18</sup>

### 5.3. Kapilarna elektroforeza (CE)

U usporedbi sa tehnikama kao što su HPLC i GC, elektroforeza u kapilarama i mikrokanalima (CE i  $\mu$ -CE) pokazuje veliki analitički potencijal u elementnoj specijaciji arsena kada je dostupna vrlo mala količina uzorka. Ima i vrlo dobru sposobnost i efikasnost razdvajanja te u vezanom sustavu sa tehnikom ICP-MS je vrlo jaki alat u provedbi elementne specijacije. Korištenjem odgovarajućih pufera, koncentracija, pH vrijednosti i napona može se postići bolja efikasnost razdvajanja od nekoliko trenutno dostupnih metoda za određivanje specija arsena u riži i žitaricama na bazi riže (As(III), As(V), DMA i MMA) baziranih na tekućinskoj kromatografiji.

Kod vezanja kapilarne elektroforeze u vezani sustav sa tehnikom ICP-MS najbitnija je dobra izvedba sučelja koje zahtjeva transport visoke efikasnosti i ujednačen protok. Trenutno najpopularnija izvedba je „*sheath flow-based*“ sučelje gdje je kapilarna elektroforeza direktno povezana putem raspršivača na ICP-MS. Nedostatak takvog sučelja je veliki mrtvi volumen i varijacija u protoku „*sheath flow*“ tekućine. Trenutno postoji nekoliko različitih modifikacija sučelja s kojima su se uspjeli ukloniti takvi nedostaci. Jedan od takvih je mikrofluidna kapilarna elektroforeza na bazi čipa ( $\mu$ chip-CE) vezana na HG-MIP-OES putem T-sučelja za diferencijalnu analizu As<sup>III</sup> i As<sup>V</sup> kojom se smanjuje potrošnja uzorka (25  $\mu$ L) i ostalih kemikalija potrebnih za analizu.<sup>19</sup>

#### 5.4. Nanomaterijali u specijacijskoj analizi arsena

Prema kemijskom sastavu nanomaterijali se svrstavaju u dvije skupine, anorganski i organski nanomaterijali. U zadnjih nekoliko godina napravljeni su takozvani organsko-anorganski hibridi koji posjeduju svojstva funkcionalnosti organskih spojeva i stabilnost anorganskih materijala. Kada govorimo o nanomaterijalima metala, najpopularnije su nanočestice srebra i zlata koji imaju vrlo jaki afinitet za anorganske i organske specije žive. Metalni oksidi nude visoku temperaturnu, mehaničku i kemijsku stabilnost. Amfoterni oksidi  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$  i  $\text{ZrO}_2$  pri različitim uvjetima pokazuju svojstva kationske ili anionske izmjene. Nanomaterijali na bazi silicija posjeduju svojstva netoksičnosti, velike dodirne površine, visoke temperature i mehaničke stabilnosti ali su niske selektivnosti. U svrhu specijacije uzoraka iz okoliša najčešće se koriste ugljikove nanocijevčice i grafen. Funkcionalizacijom sa kemijskim skupinama kao što su  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$  ili  $\text{NH}_2$  povećava se adsorpcijski kapacitet prema teškim metalima. Spajanje nanomaterijala sa materijalima koja imaju magnetska svojstva također ima veliki utjecaj na tehnike razdvajanja. Željezov oksid kao što je magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) koristi se u obliku nanočestica magnetskih svojstava.

Sorpcijski materijali se uglavnom koriste za specijaciju elemenata raličitih oksidacijskih stanja kao što su arsen, krom, živa, antimon i selen. U nekim postupcima jedna specija se selektivno adsorbira na nanomaterijal ili obje specije se zadržavaju na istom sorbensu pri različitim eksperimentalnim uvjetima (pH vrijednost, dodatak agensa koji kompleksira). Selektivna sorpcija može se provoditi i metodama protočnog injektiranja.

Kada govorimo o primjeni nanomaterijala za specijaciju arsena, veliku ulogu imaju ugljikove nanostrukture. Modificirane višezidne ugljikove nanocijevčice kao adsorbent mogu se koristiti za istovremenu specijaciju As, Se i Cr u vodama u okolišu. Pri pH vrijednosti 2,2 selektivno adsorbiraju se specije As(V), Cr(VI) i Se(VI), dok As(III), Cr(III) i Se(IV) samo prođu kroz mikrokolonu. Karboksilirani nanoporozni grafen pokazuje visoki afinitet za speciju As(V) pri pH vrijednosti 3,5 dok je za speciju As(III) afinitet vrlo malen. Najnoviji razvoj po pitanju ne kromatografske specijacije arsena je primjena modificiranih magnetskih nanočestica u „on-line“ izvedbi. Sustav se sastoji od dva  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  kemijski funkcionalizirana reaktora. Adsorpcija pojedine specije ovisi o pH vrijednosti (3 do 4 za  $\text{As}^{\text{V}}$  i 8 do 10 za  $\text{As}^{\text{III}}$ ). Provodi se eluiranje i preredukcija, a zatim određivanje ukupnog arsena. Koncentracija As(V) dobije se oduzimanjem koncentracije As(III) od ukupnog arsena. Sustav je potpuno automatizirani i može analizirati do 14 uzoraka vode po satu sa vrlo niskim granicama detekcije (ng/L).<sup>20</sup>

## 6. ZAKLJUČAK

Arsen se u prirodi javlja u različitim oksidacijskim stanjima koja mu omogućuju veliku kemijsku reaktivnost i afinitet vezanja. Njegove specije dijele se u skupinu anorganskih specija u koju spadaju arsenit i arsenat, te organskih specija u koje spadaju arsenobetain, arsenokolin, trimetilarsin oksid, arsenošćeri, monometilarsonska kiselina, dimetilarsinska kiselina i arsenolipidi. Anorganske specije smatraju se kancerogenima, dok se neke organske smatraju potencijalno kancerogenima.

Europsko zakonodavstvo temeljem dostupnih podataka o negativnom utjecaju arsenovih specija kroz godine donijelo je uredbe koje definiraju najveću dopuštenu količinu anorganskog arsena u različitim matricama hrane. Isto tako donesene su i preporuke za obavezno praćenje ostalih specija arsena koje su prisutne u različitim matricama hrane kako bi se u budućnosti kroz nove uredbe uredile nove NDK vrijednosti za ostale specije arsena. Hrana koja se najviše konzumira i sadrži različite specije arsena su riža koja je bogata uglavnom specijama anorganskog arsena, hrana za dojenčad i malu djecu na bazi riže koja zbog sve većeg organskog uzgoja sirovine (riža) sadrži također povećane koncentracije anorganskih specija, pića na bazi biljaka i riže, hrana morskog porijekla koja u svom sastavu sadrži vrlo širok spektar anorganskih i organskih specija arsena te dodaci prehrani na prirodnoj bazi.

U svrhu analize takvih matrica potrebna je odgovarajuća metoda pripreme uzoraka koja će omogućiti dobru ekstrakciju bez međukonverzije specija. U tu svrhu idealna su blaga ekstrakcijska otapala kao što su kombinacija metanol-voda ili metanol-kloroform ovisno o tome da li se vrši ekstrakcija polarnih ili nepolarnih specija. Osim odabira pravilne metode pripreme uzorka, vrlo je bitan i pravilan odabir instrumentne tehnike koja će postići dobro razdvajanje specija od interesa i njihovu detekciju. U tu svrhu najčešće se koriste različiti oblici tekućinskih kromatografija vezanih uz ICP-MS kao što su tekućinska kromatografija sa anionskom izmjenom (analiza  $\text{As}^{\text{III}}$ , DMA, MMA i  $\text{As}^{\text{V}}$ ), sa kationskom izmjenom (analiza arsenovih specija sa pozitivnim nabojem), tekućinska kromatografija obrnutih faza (za analizu arsenolipida), tekućinska kromatografija ionskih parova (za istovremenu analizu ionskih i neutralnih specija) te tekućinska kromatografija s hidrofilnim reakcijama (za istovremenu analizu neutralnih, anionskih i kationskih specija). Kao detektor za kvantifikaciju se najčešće koristi ICP-MS, a za identifikaciju specija ESI-MS.

U zadnje vrijeme sve se više razvijaju i primjenjuju i druge metode za detekciju i razdvajanje specija arsena kao što je IC-MICAP-MS, GC-ICP-MS, CE i nanometerijali.

## 7. LITERATURA

1. M.S. Reid , K. S. Hoy, J. R.M. Schofield, J. S. Uppal, Y. Lin, X. Lu, H. Peng, X. C. Le, Arsenic speciation analysis: A review with an emphasis on chromatographic separations, *Trends. Anal. Chem.* **123** (2020)
2. E. Byeon , H.M. Kang, C. Yoon, J.S. Lee Toxicity mechanisms of arsenic compounds in aquatic organisms, *Aquat. Toxicol.* **237** (2021)
3. R. Guillod-Magnin, B. J. Brüscheiler, R. Aubert, M. Haldimann: Arsenic species in rice and rice-based products consumed by toddlers in Switzerland, *Food Addit. Contam.* **34** (2018)
4. Julieta R. Camurati & Vanesa N. Salomone: Arsenic in edible macroalgae: an integrated approach, *J. Toxicol. Environ. Health -B*, **23** (2020)
5. EFSA (European Food Safety Authority), Arcella D, Cascio C and Gomez Ruiz JA, 2021. Scientific report on the chronic dietary exposure to inorganic arsenic. EFSA Journal 19(1):6380, 50 pp, (2021)
6. PREPORUKA KOMISIJE (EU) 2015/1381 od 10. kolovoza 2015. o praćenju arsena u hrani, [EUR-Lex - 32015H1381 - EN - EUR-Lex \(europa.eu\)](#)
7. UREDBA KOMISIJE (EU) 2023/465 od 3. ožujka 2023. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1881/2006 u pogledu najvećih dopuštenih količina arsena u određenim vrstama hrane, [Regulation - 2023/465 - EN - EUR-Lex \(europa.eu\)](#)
8. UREDBA KOMISIJE (EU) 2023/915 od 25. travnja 2023. o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani i o stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br. 1881/2006, [Regulation - 2023/915 - EN - EUR-Lex \(europa.eu\)](#)
9. S, Singh, R. Yadav. S. Sharma, A. N. Singh: Arsenic contamination in the food chain: A threat to food security and human health, *J. appl. biol. biotechnol.* **11** (2023)
10. J.K. Biswas, M. Warke, R. Datta, D. Sarkar: Is Arsenic a Major Human Health concern ?; *Curr. Pollution Rep.* **6**, 37-42 (2020)
11. Zhujun Gu, S. de Silva, S. M. Reichman; Arsenic Concentrations and Dietary Exposure in Rice-Based Infant Food in Australia; *Int. J. Environ. Res. Public Health* **17**, (2020)
12. Ş. Saçmacı, M. Saçmacı, Determination of Arsenic(III) and Total Arsenic at Trace Levels in Baby Food Samples via a New Functionalized Magnetic Graphane Oxide Nanocomposite, *Biol. Trace Elem. Res.* **199** (2021)

13. R. Ejaz, M. K. Sharif, A. Sameen, R. Batool, S. Tehseen, M. Aziz., Arsenic in Rice: An Emerging Challenge in Context of Food Security, *Food Nutr. Chem.* **1** (2023)
14. L. Ruzik, M. Jakubowska: Speciation of Arsenic(III) and Arsenic(V) in Plant-Based Drinks. *Foods*, **11** (2022)
15. C. Luvonga, C.A. Rimmer, L.L. Yu, S. B. Lee: Determination of total arsenic and hydrophilic arsenic species in seafood, *J. Food Compos.* **96** (2021)
16. A. Augustsson, A. Qvarforth, E. Engström, C. Paulukat, I. Rodushkin: Trace and major elements in food supplements of different origin: Implications for daily intake levels and health risks, *Toxicol. Rep.* **8** (2021)
17. S.Mukta, A.G.Graham, Ion chromatography – nitrogen-sustained microwave inductively coupled atmospheric pressure plasma – mass spectrometry (IC-MICAP-MS) for arsenic speciation analysis in rice, *J. Anal. At. Spectrom.* **39** (2024)
18. H. Yu, C. Li, Y. Tian, X. Jiang: Recent developments in determination and speciation of arsenic in environmental and biological samples by atomic spectrometry, *Microchem. J.* **152** (2020)
19. H. Matusiewicz, M. Ślachciński: Development of a new hybrid technique for inorganic arsenic speciation analysis by microchip capillary electrophoresis coupled with hydride generation microwave induced plasma spectrometry, *Microchem. J.* **102** (2012)
20. K. Pyrzynska, Nanomaterials in speciation analysis of metals and metalloids, *Talanta* **212** (2020)