

TOMÁŠ MATOUŠEK

Rozvoj metod speciální analýzy arsenu pro aplikace v toxikologickém výzkumu

Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i.

Arsen je prvek, který je proslulý zejména svou akutní toxicitou. Jeho sloučeniny se však v průběhu času používají a používají nejen jako nástroj travičů, ale i jako léčiva na různé neduhy či dokonce svérázné doplňky stravy. Připomeňme třeba roztok arsenitanu známý jako Fowlerův roztok, předepisovaný v 19. století na nejrůznější choroby, od kožních nemocí přes malárii a syfilis po chudokrevnost. Mimochodem oxid arsenitý se používá k léčení leukemie i v moderní medicíně. Kuriozitou byl zvyk požívání arsenu ve Štýrsku pro lepší dýchání v horách a zažívání i pro zlepšení pleti u žen. Dle vědeckých zpráv z druhé poloviny 19. století požívající arsenu běžně užívali dávky pro normálního člověka smrtelné. V české literatuře pak podobné praktiky posloužily jako zápletky Arbesova romaneta *Zázračná madona*.

Arsen se běžně vyskytuje v přírodě přirozeně i jako následek kontaminace životního prostředí. Hlavním původcem arsenu v lidském těle bývá pitná voda. Maximální hodnota doporučená WHO pro arsen v pitné vodě i česká norma je 10 µg/l. Ve světě však existují rozsáhlé oblasti, kde není dostupná pitná voda obsahující arsen v bezpečných koncentracích. WHO odhaduje, že ve světě je tak ohroženo arsenem přibližně 100 milionů lidí. Z potravin se arsen nalézá zejména v mořských rybách nebo v rýži, která arsen akumuluje. Předmětem zájmu toxikologů v posledních letech jsou hlavně chronické účinky relativně nízkých dávek arsenu. Bylo prokázáno, že chronická expozice způsobuje řadu závažných onemocnění, včetně rakoviny, diabetu a kardiovaskulárních chorob.

Arsen nalézáme v celé řadě sloučenin. Toxicita i další vlastnosti arsenu, ovlivňující například transportní procesy v přírodě, silně závisí na jeho chemické formě. Některé, třeba oxid arsenitý (známý jako arzenik, otrušik, utřejch), jsou prudce jedovaté. Na druhé straně arsenocukry nacházející se v mořských řasách nebo arsenobetain, který je převládající formou arsenu v potravinách mořského původu, jsou toxické velmi málo nebo úplně neškodné.

Metabolismus arsenu a mechanismy jeho působení jsou intenzivně studovány v mnoha laboratořích. Tyto studie samozřejmě vyžadují adekvátní analytické metody. Nestačí znát celkovou koncentraci prvku, ale také v jakých chemických formách – speciích – se vyskytuje a jak se zastoupení jednotlivých forem (metabolitů) mění, to vše ve stopových koncentracích.

Plasma v ICP-MS spektrometru.



Současné nejběžnější postupy pro kvantitativní analýzu specií arsenu jsou založeny na postupech kombinujících separační krok, nejčastěji vysokoučinnou kapalinovou chromatografi (HPLC), s citlivou prvkově specifickou detekcí. Problémem je ale nutnost extrakce arsenových specií z biologické matrice, kde hrozí nedokonalá účinnost. Při extrakci a separaci existuje riziko rozkladu, respektive přeměny vysoce nestabilních a přitom silně toxických specií původně přítomných ve vzorku. Limitem i při využití moderních hmotnostně spektrometrických technik je také citlivost metod, daná objemem dávkovaného vzorku omezeným separační metodou na desítky až stovky mikrolitrů.

Alternativou jsou postupy využívající generování těkavých hydridů, tj. v případě As arsenodidů – arsanů. Vzorek se nechává zreagovat v kyselém prostředí s redukčním činidlem – tetrahydridoboritanem. Původní arsenové specie s různým počtem methylových skupin se přemění na plynné methylované arsany. Ty se oddělí od kapalně reakční směsi obsahující zbytky vzorku a zachytí se ve vymrazovací trubici chlazené kapalným dusíkem. Po ukončení reakce se trubice zahřeje, arsany se podle bodu varu postupně uvolňují a jsou detekovány citlivými metodami analytické atomové spektrometrie. Použitím různých reakčních podmínek lze také selektivně generovat arsany pouze z vybraných specií. Techniky založené na generování hydridů poskytují vysokou citlivost danou možností

prekoncentrace a nevyžadují složitou přípravu vzorků, mají však z principu omezenou selektivitu, protože dokážou rozlišit pouze čtyři těkavé sloučeniny arsenu: arsan a mono-, di- a trimethylarsan.

Oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i., je předním světovým pracovištěm zaměřeným na generování hydridů pro analytickou atomovou spektrometrii. Od roku 2004, kdy začali odborníci z tohoto oddělení spolupracovat s toxikologickou laboratoří v Department of Nutrition, University of North Carolina at Chapel Hill (UNC), se věnují také speciální analýze arsenu, zejména s využitím generování hydridů. V rámci této spolupráce rozvinuli postup selektivního generování hydridů s vymrazováním a detekcí atomovou absorpční spektrometrií pro stanovení troj- a pěti-mocných methylovaných specií v biologických vzorcích. Metodika umožňuje i stanovení přímo z buněčných lysátů nebo ze suspenze homogenizované tkáně bez rizikových kroků rozkladu nebo extrakce.



Aparatura pro ultrastopovou speciální analýzu arsenu s generováním hydridů, vymrazováním a ICP-MS detekcí.

Od roku 2012 v rámci projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy Kontakt II LH12040 pro spolupráci s USA byla tato metodika adaptována pro spojení s vysoce citlivou detekcí hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Výsledný postup dosahuje v současnosti nejlepších mezi detekce pro speciální analýzu arsenu vůbec, na úrovni pikogramů pro anorganický arsen a ještě o řád méně pro methylované specie. To umožňuje provádět metabolické experimenty odpovídající přirozeným hladinám zátěže nebo provádět analýzy v mikrovzorcích. Metoda je kromě laboratoře oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i., zavedena pro rutinní analýzy i na UNC. Publikována už byla například studie založená na analýzách z moči izolovaných buněk odložených z výstelky močového měchýře jako indikátoru expozice arsenu v korelaci s výskytem arsenem indukovaného diabetu. Součástí tohoto projektu byl i vývoj srovnávací separační HPLC metody pro stanovení nestabilních arsenových specií s ICP-MS detekcí.

V pokračování tohoto projektu na roky 2016–2017 (projekt Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy Kontakt II LH15174) jsou plánovány v těsné spolupráci s UNC úpravy a testování vyvinutých metod pro obtížné matrice vzorků před jejich aplikací na rozsáhlejší studie. Obecným smyslem tohoto projektu je rozvoj metod stopové speciální analýzy, které povedou k lepšímu pochopení rizika a mechanismu závažných onemocnění spojených s chronickou expozicí arsenu. Jedná se především o vývoj metod pro stanovení specií arsenu v krvi, kde dosavadní metody nedostačují citlivostí, a o metody pro rychlý screening i exaktní analýzu obsahu zejména anorganického arsenu v potravinách mořského původu.

Přestože formálním partnerem projektu je laboratoř na UNC, tento výzkum je součástí sítě neformální spolupráce s dalšími partnery. Jde zejména o spolupráci s laboratořemi Mexiku – Universidad Autónoma de Chihuahua a CINVESTAV, Department of Toxicology –, které úzce spolupracují s laboratoří UNC při získávání vzorků z oblastí s vyšším výskytem arsenu ve vodě. Součástí projektu je také stanovení toxikologicky významných forem arsenu, zejména arseničnanů a arsenitanů, v mořských potravinách ve spolupráci s National Research Council v Ottawě (NRC), Kanada. Toto pracoviště je mimo jiné významným světovým producentem certifikovaných referenčních materiálů a průkopníkem referenčních materiálů s certifikovanou speciální informací.

Výhodou pracoviště oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i., při řešení analytických problémů je dostupná kombinace metod, které se vzájemně doplňují. Role zahraničního partnera v projektu vychází z úspěšného modelu dosavadní spolupráce, kdy se laboratoř Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i., věnuje vývoji a validaci analytické metody, která je pak zavedena a aplikována na UNC. Výsledky jsou publikovány formou článků autorů z obou pracovišť.