

Stabilnost i toksični učinci specija arsena u uzorcima voda

Alispahić, Amra

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:885388>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Amra Alispahić

STABILNOST I TOKSIČNI UČINCI SPECIJA ARSENA U UZORCIMA VODA

DOKTORSKI RAD

Mentori: dr. sc. Adela Krivohlavek, znanstveni suradnik

Prof. dr. sc. Nives Galić, redoviti profesor

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Amra Alispahić

**STABILITY AND TOXIC EFFECTS OF ARSENIC
SPECIES IN WATER SAMPLES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors: Adela Krivohlavek PhD, Research Associate

Nives Galić PhD, Full Professor

Zagreb, 2022.

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Adeli Krivohlavek na svesrdnoj i nesebičnoj pomoći, prijedlozima, savjetima te podršci tijekom vođenja, izrade i pisanja ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem i komentorici prof. dr. sc. Nives Galić na velikoj pomoći, konstruktivnim savjetima i sugestijama od samog početka istraživanja do napisanog rada te nesebičnom odvajanju svoga vremena kada god je to bilo potrebno.

Najveći dio eksperimentalnog rada urađen je na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ u Zagrebu. Ovim putem se zahvaljujem svim uposlenicima Zavoda, a posebno uposlenicima Službe za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju. Posebno se zahvaljujem kolegama iz Centra za sigurnost i kvalitetu hrane i Odjela za zajedničke i potvrđne analitičke metode, koji su mi pomagali u radu, kad god je to bilo potrebno. Zahvaljujem se i dr. sc. Lei Ulm koja mi je pomogla pri ekotoksikološkim ispitivanjima.

Dio eksperimentalnog rada urađen je na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu te se ovim putem posebno zahvaljujem dr. sc. Ivanu Pavičiću i dr. sc. Ivani Vinković Vrček na pomoći pri citotoksikološkim ispitivanjima, kao i na srdačnosti i divnom druženju tijekom rada na Institutu.

Veliko hvala mojim kolegicama i kolegama na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Sarajevu na pruženom razumijevanju i podršci. Posebno hvala mojim dragim prijateljicama i kolegicama prof. dr. Huriji Džudžević-Čančar, doc. dr. Alemi Dedić, prof. dr. Ervini Bečić i prof. dr. Belmi Imamović na svesrdnoj podršci i razumijevanju u najtežim životnim trenucima.

Najveće hvala mojoj dragoj prijateljici Senki Ninković, bez čije pomoći i podrške, u svakom smislu, izrada ove doktorske disertacije ne bi bila moguća.

Naravno, smisao svemu ovome dala je moja obitelj, koja je uvijek bila uz mene. Veliko hvala mojim roditeljima Osmanu i Refiji Hrvat na ljubavi, podršci, razumijevanju, odricanju i svemu što su mi omogućili. Hvala mojoj sestri Elmi Valjevčić i njenoj porodici koji su mi pružili ljubav i podršku. Također, veliko hvala mojoj svekrvi Sabini i svekru Enesu Alispahić što su mi bili potpora i podrška te što su brinuli o mojoj djeci tijekom mog odsustva od kuće. Hvala mojoj kćerki Ajli i mom sinu Kemalu, koji su moja najveća životna motivacija i poticaj. Hvala mom suprugu Nevresu na ljubavi, razumijevanju i strpljenju.

*Posvećeno mojoj sestri Ameli Hrvat (03.06.1997. – 07.07.2019.) koja nije dočekala
obranu moje doktorske disertacije.*

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	4
2.1. Arsen	4
2.1.1. Izvori i biodostupnost arsena.....	4
2.1.2. Arsen u ekološkim i biološkim uzorcima.....	6
2.1.3. Utjecaj arsena na zdravlje čovjeka.....	6
2.1.4. Zakonske odredbe i preporuke o spojevima arsena.....	7
2.1.5. Pojavni oblici arsena u prirodi.....	8
2.2. Očuvanje omjera anorganskih specija arsena u uzorcima prirodnih voda: prikupljanje uzorka, pohranjivanje i konzerviranje	11
2.3. Analitičke metode za dokazivanje i određivanje arsenovih specija	14
2.3.1. Kromatografske tehnike razdvajanja specija arsena.....	17
2.3.2. Vežani sustav LC–ICP–MS.....	21
2.3.3. Elektrokemijske metode analize.....	25
2.4. Nanomaterijali i interakcije s arsenom u okolišu.....	36
2.4.1. Primjena nanomaterijala Fe.....	36
2.5. Ekotoksikologija arsena	37
2.5.1. Ekotoksikološki učinci arsena.....	37
2.5.2. Ekotoksikološka ispitivanja arsena.....	38
2.5.3. Testni organizam <i>Daphnia magna</i>	39
2.5.4. Ekotoksikološki testni sustavi ispitivanja.....	40
2.6. Citotoksikologija	41
2.6.1. Ispitivanje citotoksičnosti tvari.....	41
2.6.2. HepG2 stanična linija.....	42
2.7. Ciljevi rada	43
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO – MATERIJAL I METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA.....	45
3.1. Kemikalije i reagensi	45
3.2. Korištena oprema i pribor	46
3.3. Priprava otopina za UPLC–ICP–MS određivanja	48

3.3.1. Priprava otopina osnovnih standarda	48
3.3.2. Priprava otopina radnih standarda	49
3.3.3. Priprava mobilne faze za UHPLC	49
3.3.4. Priprava otopina korištenih kao konzervansi	49
3.3.5. Priprava modelnih otopina vode.....	49
3.3.6. Uzorkovanje i priprava realnih uzoraka vode	49
3.4. Mjerenje, identifikacija i kvantifikacija kod UPLC–ICP–MS analize	50
3.4.1. Identifikacija specija arsena	50
3.4.2. Kalibracijski pravac.....	50
3.4.3. Analiza specija arsena pomoću UPLC–ICP–MS.....	50
3.5. Priprava otopina za voltametrijska određivanja	52
3.5.1. Priprava otopine osnovnog standarda.....	52
3.5.2. Priprava otopina radnih standarda	52
3.5.3. Priprava otopine za aktivaciju i čišćenje elektrode scTRACE Gold.....	52
3.5.4. Priprava otopine elektrolita za rad s elektrodom scTRACE Gold.....	52
3.5.5. Priprava otopine $KMnO_4$	52
3.5.6. Priprava uzoraka za voltametrijsko mjerenje	53
3.6. Voltametrijska analiza.....	53
3.6.1. Uređaj za voltametrijsku analizu	53
3.6.2. Aktivacija scTRACE Gold elektrode	53
3.6.3. Određivanje ukupnog arsena $As(tot)$ s 797 VA Computrace	54
3.6.4. Određivanje $As(III)$ s 797 VA Computrace.....	55
3.6.5. Granica detekcije i linearni radni raspon.....	56
3.7. Ispitivanje ekotoksičnosti na <i>Daphnia magna</i> sp.....	57
3.8. Analiza vitalnosti stanica HepG2.....	58
3.9. Statistička analiza	60
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	61
4.1. Stabilnost specija As u modelnim uzorcima vode ispitana metodom UPLC–ICP–MS	61
4.2. Stabilnost modelnih otopina $As(III)/As(V)$ s dodatkom različitih konzervansa	66
4.3. Stabilnost specija As u uzorcima prirodnih podzemnih voda ispitana metodom UPLC– ICP–MS.....	72
4.4. Stabilnost specija As u modelnim uzorcima vode ispitana metodom voltametrije anodnog otapanja.....	83
4.5. Stabilnost anorganskih specija arsena $As(III/V)$ u uzorcima prirodnih podzemnih voda..	87
4.6. Ekotoksični učinak arsena na <i>Daphnia magna</i> sp.....	97
4.6.1. Rezultati testa akutne imobilizacije vodenbuhe (<i>Daphnia</i> sp.)	97

4.7. Citotoksični učinak arsena na staničnu liniju HepG2	102
<i>4.7.1. Rezultati in vitro testa viabilnosti HepG2 stanica u prisustvu arsena.....</i>	<i>102</i>
§ 5. ZAKLJUČAK	110
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....	112
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	115
§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XLVIII
§ 8. DODATAK.....	XVII
§ 9. ŽIVOTOPIS	XVIII



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno–matematički fakultet

Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

STABILNOST I TOKSIČNI UČINCI SPECIJA ARSENA U UZORCIMA VODA

Amra Alispahić

Univerzitet u Sarajevu, Farmaceutski fakultet, Zmaja od Bosne 8, 71000 Sarajevo, Bosna i
Hercegovina

U ovom radu ispitana je stabilnost omjera anorganskih specija arsena As(III)/As(V) u modelnim otopinama i uzorcima prirodnih podzemnih voda s četiri lokacije u Hrvatskoj uz dodatak sljedećih konzervansa: limunska kiselina, natrijev citrat, kalijev oksalat, kalijev–natrijev tartarat i octena kiselina. Specijacijska analiza provedena je metodom voltametrije anodnog otapanja i UPLC–ICP–MS. Utvrđeno je kako kombinacija ispitanih konzervansa s octenom kiselinom uspješno stabilizira omjer specija arsena te je on u modelnim otopinama stabilan do 8 dana, dok je u uzorcima prirodnih voda stabilan 6 do 7 dana. Akutnim testom ekotoksičnosti određena je vrijednost LC₅₀ nakon 24 h na *Daphnia magna*. Dobivene vrijednosti su 5,07 ppm za As(III), 10,27 ppm za As(V) i 0,58 ppm za As(III) s nanočesticama željeza. MTT testom citotoksičnosti na HepG2 staničnoj liniji određena je vrijednosti LC₅₀ nakon 24 h. Najveća citotoksičnost određena je za As(III) uz dodatak SPIO nanočestica, dok As(V) ne inducira staničnu smrt.

(128 stranica, 52 slika, 24 tablica, 272 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: citotoksičnost/ ekotoksičnost/ specije arsena/ stabilnost/ voda/ voltametrija/ UHPLC–ICP–MS

Mentori: Dr. Sc. Adela Krivohlavek, znanstveni suradnik; Prof. Dr. Sc. Nives Galić, redoviti profesor

Rad prihvaćen: [dan sjednice Vijeća KO PMF]

Ocjenitelji (upisuju se tek nakon sjednice Vijeća PMF na kojoj se imenuje Povjerenstvo za ocjenu doktorskog rada, molimo ostaviti prazno tijekom postupka ocjenjivanja):

- 1.
- 2.
- 3.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

STABILITY AND TOXIC EFFECTS OF ARSENIC SPECIES IN WATER SAMPLES

Amra Alispahić

University of Sarajevo, Faculty of Pharmacy, Zmaja od Bosne 8, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

In this paper, the stability of inorganic arsenic species ratio As(III)/As(V) in model solutions and natural groundwater samples from four locations in Croatia was investigated. Selected preservatives were citric acid, sodium citrate, potassium oxalate, potassium sodium tartrate and acetic acid. Speciation analysis was performed by anodic stripping voltammetry method and UPLC–ICP–MS. It was shown that the combination of the tested preservatives with acetic acid stabilize the arsenic species ratio for up to 8 days in model solutions and for 6 to 7 days in natural water samples. The LC₅₀ values determined by acute ecotoxicity test on *Daphnia magna* after 24 h amounted to 5.07, 10.27 and 0.58 ppm for As(III), As(V), As(III)/iron nanoparticles, respectively. Cytotoxicity was determined by MTT test on human hepatocarcinoma cell line (HepG2) after 24 h and expressed as LC₅₀ value. The most pronounced effect was observed for As(III)/Fe nanoparticles, while As(V) was inactive.

(128 pages, 52 figures, 24 tables, 272 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: arsenic species/ cytotoxicity/ ecotoxicity/ stability investigation/ UHPLC–ICPMS–voltammetry/ water

Supervisor: Dr. Sc. Adela Krivohlavek, Research Associate; Dr. Sc. Nives Galić, Full professor

Thesis accepted: [dan sjednice Vijeća KO PMF]

Reviewers (upisuju se tek nakon sjednice Vijeća PMF na kojoj se imenuje Povjerenstvo za ocjenu doktorskog rada, molimo ostaviti prazno tijekom postupka ocjenjivanja):

§ 1. UVOD

Istraživanja arsena u znanosti, medicini i tehnologiji uvijek su u znaku štetnog i toksičnog djelovanja arsena na živa bića. Arsen je rasprostranjen u prirodi, nalazi se u atmosferi, tlu, stijenama, prirodnim vodama i živim organizmima¹. Pojava arsena u tlu i vodenim sustavima je izravno vezana za široku raznolikost As(III) i As(V) specija u prirodi. Ipak, najveća izloženost arsenu je preko vode za piće gdje je arsen prisutan u anorganskom obliku. Bilo koja količina arsena iznad $10 \mu\text{g L}^{-1}$ u vodi smatra se nesigurnom za konzumaciju². Poznavanje specija arsena u prirodnoj vodi je važno jer njegova toksičnost, pokretljivost i bioraspoloživost ovise o njegovoj kemijskoj vrsti.

Anorganski oblici arsena: arsenit, As(III) i arsenat, As(V) su osnovni oblici arsena prisutni u prirodnim vodama³. Uobičajeno se As(V) češće nalazi u površinskim, a As(III) u podzemnim vodama⁴. Postupci uzorkovanja i pohrane uzoraka voda ključni su zahtjevi za očuvanje količine pojedine specije arsena tijekom cijelog analitičkog procesa. U nedavnim publikacijama predloženo je nekoliko metoda očuvanja specija arsena⁵⁻⁸. Većina se temelji na snižavanju pH vrijednosti uzoraka vode do $\text{pH} = 2$, dodatkom klorovodične kiseline, hlađenju i deoksigenaciji ili primjeni jakih kompleksirajućih sredstava kao što je etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA). Za stabilizaciju izvornog omjera količine As(III/V) neophodno je konzerviranje uzorka i prikladna filtracija prije analize. Nažalost, u do sada dostupnoj literaturi metode za konzerviranje specija arsena nisu konzistentne, a eksperimentalni postupci za očuvanje stalne količine pojedinih specija nisu dovoljno objašnjeni⁸⁻¹¹. Andreae je u svom istraživanju koristio metodu filtracije morske i slatke vode uz pohranu uzoraka voda na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ kako bi očuvao omjer As(III/V) do 10 dana¹². Cherry i sur. objavili su rezultate niza testova na vodenim otopinama koje sadrže 50 mg L^{-1} As(III) i 50 mg L^{-1} As(V)¹³. Nisu uočili značajnu oksidaciju ili redukciju As tijekom razdoblja od 3 tjedna u otopinama izloženim zraku, a koje ne sadrže oksidanse ili reducense. Dodavanje oksidirajućih kiselina, kao što je HNO_3 , uobičajen je pristup za stabilizaciju uzoraka u kojima se određuju elementi u tragovima. Međutim, takav pristup nije primjenjiv kod analize specija, pri čemu treba izbjeći bilo kakvu transformaciju specija. Zakiseljavanje vodenih uzoraka široko se primjenjuje kako bi se onemogućilo taloženje Fe i Mn hidratiziranih oksida. Zakiseljavanje također pomaže u smanjenju mikrobne aktivnosti¹⁴.

Druga strategija očuvanja omjera količine specija arsena sastoji se od uklanjanja ili kompleksiranja potencijalnih redoks parova koji bi mogli utjecati na oksidaciju ili redukciju specija arsena. Budući da kisik, koji potječe iz zraka, nije u stanju sam oksidirati arsenit, za ubrzanje redoks reakcija potrebni su koloidni spojevi Fe ili dodatni redoks katalizatori. Prema tome, uklanjanje takvih spojeva pomoću sredstava za kompleksiranje iz reakcije može biti potencijalno dobra metoda za uspješno očuvanje omjera količine specija arsena^{6,15}. Svjetlost i temperatura su dodatni čimbenici koji mogu utjecati na omjer količine specija arsena. Svjetlost utječe na oksidaciju arsenita pa je stoga preporučljivo držati uzorke vode u mraku. Temperatura utječe na mikrobnu aktivnost kao i na kemijske reakcije pa se stoga preporučuje čuvati uzorke vode na hladnom (+4 °C)^{3,7}. Općenito, sredstva i uvjeti pohrane u svrhu očuvanja uzorka moraju biti takvi da minimiziraju neželjene učinke. McCleskey i sur. naveli su kako je za stabilizaciju otopljenih specija arsena neophodno filtrirati uzorke te ih konzervirati dodatkom HCl, H₂SO₄ ili EDTA te ih pohraniti u mraku⁶. Zakiseljavanje sprječava oksidaciju i taloženje željeznih hidroksida koji se mogu istaložiti i/ili adsorbirati arsen. Dodavanje EDTA inhibira stvaranje precipitata.

Koja će se metoda očuvanja As(III) u uzorku primijeniti ovisi o analitičkoj tehnici mjerenja količina specija arsena i potrebi stabilizacije drugih redoks specija, posebice Fe(II/III). Klorovodična kiselina dobar je konzervans za redoks specije As, Fe i Se u različitim uzorcima. Preferira se kada se koristi hidridna atomska apsorpcijska spektrometrija (HG–AAS) za određivanje elemenata koji tvore stabilne hidride. Pri analizi tehnikom tekućinske kromatografije s induktivno spregnutom plazmom u sprezi sa spektrometrijom masa (HPLC–ICP–MS), EDTA je preferirani konzervans, zbog poznate poliatomske izobarne interferencije s izotopom arsena, ⁷⁵As, od kojih su najznačajnije ⁴⁰Ar³⁵Cl⁺ i ⁴⁰Ca³⁵Cl⁺. Izobarne smetnje mogu uzrokovati značajne analitičke probleme u vodama bogatim kloridima ili vodama konzerviranim klorovodičnom kiselinom¹⁶.

Standardne otopine As(III) i As(V) u deioniziranoj vodi trebale bi biti stabilne u određenom vremenskom periodu zbog kalibracije. Tallman i Shaikh izvjestili su kako su standardne otopine arsena u deioniziranoj vodi (koncentracija reda veličine μg L⁻¹) bez i u prisutnosti uobičajenih redoks tvari (O₂, Fe(III), H₂S) stabilne najmanje 3 tjedna bez dodavanja konzervanasa¹⁷. Međutim, nekoliko studija navodi kako su specije arsena na koncentracijskoj razini μg L⁻¹ u deioniziranoj vodi podložne redoks transformaciji ako nisu konzervirane. Bednar i sur. su izvjestili da su nekonzervirane standardne otopine As(III) i As(V) stabilne samo 24 h⁸.

Kvantifikacija specija elemenata u tragovima vrlo je zahtjevan zadatak jer su ti elementi prisutni u koncentracijama koje su blizu detekcijskim granicama većine instrumentalnih analitičkih metoda. ICP–MS je često metoda izbora za određivanje arsena zbog svoje osjetljivost i mogućnosti povezivanja s HPLC. Takvim vezanim sustavom moguće je odvajati i kvantificirati specije arsena prisutne u niskim koncentracijama⁵. Osim navedene tehnike utvrđeno je kako su elektrokemijske metode također prikladne i pouzdane za određivanje specija arsena¹⁸.

Ekotoksikološki i citotoksikološki aspekti arsena su veoma značajni jer je veliki broj ljudi širom svijeta kronično izložen arsenu. Zooplankton je jedna od skupina organizama izrazito osjetljivih na toksične tvari. Budući da ovi organizmi zauzimaju središnji položaj u hranidbenom lancu, najčešće se koriste u ekotoksikološkim testovima¹⁹. Uporaba vrste *Daphnia magna* u ekotoksikologiji prihvaćena je u nekoliko zemalja za praćenje sustava za pročišćavanje otpadnih voda kako bi se uspostavili kriteriji kvalitete za određivanje dopuštenih koncentracija onečišćenja u vodi prirodnih efluenata, te za utvrđivanje djelotvornosti metoda pročišćavanja otpadnih voda²⁰. Citotoksičnost (svojstvo tvari da izazovu staničnu smrt) se izražava kao LD₅₀ vrijednost, koja predstavlja smrt 50 % ispitivane populacije stanica pri određenoj koncentraciji ksenobiotika²¹. Stanična linija humanog hepatocelularnog karcinoma (HepG2) redovito se primjenjuje kao *in vitro* model hepatocita te služi u ispitivanjima toksičnosti spojeva²².

Značaj ovog istraživanja je u pronalaženju pogodnog konzervansa ili smjese konzervansa za očuvanje izvornog omjera anorganskih specija arsena u vodi, a kako bi ujedno bio praktičan za primjenu. Predloženi konzervans trebao bi očuvati omjer specija arsena u uzorcima iz okoliša bez promjene do laboratorijske analize. Kako slična istraživanja nisu provedena u ovom dijelu Europe, pored znanstvenog doprinosa, rezultati ovog istraživanja trebali bi imati i praktičnu primjenu, ukoliko se dokaže da odabrane tvari djeluju kao pogodno konzervirajuće sredstvo.

Cilj ovog istraživanja je primjeniti normiranu metodu UPLC–ICP–MS i voltometrije anodnog otapanja sa scTRACEGold elektrodom za određivanja specija arsena i ispitivanje njihove stabilnosti na modelnim i prirodnim uzorcima vode uz praćenje koncentracije As(III), As(V) i ukupnog arsena As(tot) tijekom vremena u prisutnosti različitih tvari za konzerviranje uzoraka. Također će se ispitati eko i citotoksičnost modelnih uzoraka vode s dodatkom As(III) i As(V), kao i nanočestica željeza, te ustanoviti stupanj toksičnosti ispitivanih uzoraka na vrsti *Daphnia magna*, te na staničnoj liniji ljudskog hepatocelularnog karcinoma (HepG2).

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Arsen

Arsen je element V skupine, po svojim svojstvima je polumetal s izrazitijim metalnim osobinama od fosfora, ali manje izraženima od antimona. Arsen (grčki: *arsen = muški*) sinonim je za toksičnost. Istraživanja arsena u znanosti, medicini i tehnologiji uvijek su u znaku njegovog toksičnog djelovanja na živa bića. Od kada ga je Albert Magnus izolirao 1250. godine, arsen ne prestaje biti u središtu znanstvenih istraživanja. Arsen je dvadeseti element prema zastupljenosti na Zemlji, a osobito je rasprostranjen u vulkanskim stijinama, a u nešto manjem postotku zastupljen je i u Zemljinoj kori. Zbog svoje izrazite mobilnosti vrlo je raširen u prirodi te se tragovi arsena mogu naći posvuda, a najčešće uz rude bakra, srebra, olova, nikla, kobalta, cinka i dr.^{1,23}. Arsen je danas vrlo zanimljiv za svjetsku znanost o okolišu. Spojevi arsena također umjetnim se putem unose u podzemne vode i tla različitim sredstvima kao što su pesticidi²⁴, sredstava za zaštitu drveta²⁵, sredstva koja se koriste u rudarstvu i pri obradi metala^{26–28} te ratni kemijski agensi²⁹. Također, spojevi arsena upotrebljavaju se u nekim prehrambenim aditivima i veterinarskim lijekovima³⁰.

2.1.1. Izvori i biodostupnost arsena

Arsen je rasprostranjen posvuda u prirodi, nalazi se u atmosferi, tlu, stijinama, prirodnim vodama i živim organizmima. Prirodne aktivnosti kao što su djelovanje spojeva prirodno prisutnih u atmosferi, erupcija vulkana, erozija stijena i šumski požari mogu dovesti do oslobađanja arsena u okoliš. Atmosferske aktivnosti pojavljuju se kao prirodni procesi u pretvorbi sulfida arsena iz ruda u vrlo pokretne arsenove kemijske oblike As(III) ili As(V), koji mogu ući u ciklus arsena izravno kao prašina ili otapanjem u kiši, akumulacijama ili podzemnim vodama^{31,32}. As(III) može se širiti i među biljkama i životinjama kroz hranidbeni lanac. Ovakva raspodjela arsena u cijeloj Zemljinoj kori, tlu, sedimentu, vodi, zraku i živim organizmima dovodi do ozbiljnih štetnih učinaka na okoliš. Upravo pojava arsena u nekim mineralima, tlu i vodnim sustavima izravno utječe na veliku raznolikost specija As(III) i As(V) u podzemnim vodama.

U prirodne vode arsen dospjeva kao zagađivač uslijed prirodnih erozija i otapanja stijena koje u svom sastavu sadrže arsen, ali i kao posljedica antropogenog utjecaja. Raspon koncentracija u kojima se može naći u prirodi je širok (u prirodnim vodama od 0,5 do 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$, u stijenama od 500 do 2500 $\mu\text{g kg}^{-1}$). U organskim i anorganskim spojevima u prirodi arsen je zastupljen u različitim valentnim stanjima. Relativno je mobilan i ima ga u tragovima u svim materijalima. Prisustvo arsena u okolišu, čak i u niskim koncentracijama, ugrožava zdravlje ljudi i životinja. U organizam čovjeka arsen dospjeva vodom ili putem hranidbenog lanca. Prisustvo arsena u podzemnim vodama, koje predstavljaju prirodni izvor vode za piće, aktualan je nacionalni i svjetski problem^{33,34}.

Postoji nekoliko teorija o tome kako arsen ulazi u sustave vodoopskrbe. Prema Roychowdhury i sur. arsen se oslobađa u aluvijalnim vodonosnicima iz rude željeznog pirit bogatog arsenom u sedimentima Bengalske delte³⁵. Autor sugerira da postoji veza između udjela arsena u vodi i željeznog pirit. Piritna oksidacija i redukcija željezova oksihidroksida dvije su osnovne pretpostavke izvora kontaminacije podzemne vode. Druga pretpostavka povezuje unos arsena s mikrobno–posredovanom redukcijom željeza³⁶. Mikroorganizmi reduciraju spojeve željeza prisutne u sedimentu. Minerali koji sadrže arsen i željezo djeluju kao donori elektrona koji olakšavaju razvoj mikroorganizama. Kao rezultat dolazi do otapanja spojeva arsena, što rezultira u njegovoj biorasploživosti. Oslobađanje arsena može biti i rezultat procesa neovisnih o mineralima željeza³⁷. Istraživanja pokazuju kako bakterije koje reduciraju arsen izravno otapaju spojeve arsena te dolazi do iskorištavanja arsena kao akceptora elektrona. Navedene tri teorije dominiraju trenutnim studijama mehanizma otapanja i biorasploživosti arsena. Kada su arsen i njegovi spojevi biorasploživi, biljke uzimaju takve spojeve te podliježu daljnjim transformacijama različitim biološkim putovima. Ti se biološki putovi razlikuju ovisno o biljci, stoga su arsenove specije unutar različitih biljaka brojne i raznovrsne³⁸. Jedan od načina kako biljke detoksiciraju arsen predložili su Pikerling i sur.³⁹. Autori su naveli da arsenat ulazi u korijen biljke indijske gorušice (*Brassica juncea*) kao fosfatni analog gdje se zatim reducira do arsenita. Prema Dhankheru i sur. biljka može zadržati arsenit u korijenu kako bi se spriječilo oštećenje na nadzemnim reproduktivnim tkivima biljke, tako da mala količina arsena dolazi u biljna tkiva iznad zemlje⁴⁰. Može se zaključiti da transformaciju arsenovih specija u biljnim tkivima treba pomno pratiti te spojeve arsena treba identificirati i kvantificirati u različitim biljkama i hrani kako bi se što točnije odredila toksičnost arsenom.

2.1.2. Arsen u ekološkim i biološkim uzorcima

Arsen se najčešće određuje u pitkoj vodi iako kontaminacija postoji i u površinskoj i u podzemnoj vodi. Pitka voda obično je od najveće važnosti glede unosa arsena u organizam. Nedavne studije pokazuju kako navodnjavanje kontaminiranom vodom dovodi do prisutnosti spojeva arsena u usjevima hrane, uglavnom riže i povrća⁴¹⁻⁴³. Arsen se određuje u dijelovima biljaka – korijenu, izdancima, listovima i ostalim jestivim dijelovima. Dahal i sur. pratili su apsorpciju arsena u biljkama (riža, cvjetača, luk i krumpir) koje su navodnjavane kontaminiranom vodom⁴². Autori su utvrdili da je sadržaj arsena najveći u korijenu biljaka, nakon čega slijede izdanci i lišće.

Prema Chenu i sur. arsenove specije u ljudskom urinu stabilne su najmanje 6 mjeseci, duže od anorganskog arsena u vodenim otopinama standarda⁴⁴. Zbog svoje široke primjene u industriji i poljodjelstvu, arsen i njegovi spojevi predstavljaju veliku toksikološku opasnost za ekosustav. Spojevi arsena uglavnom su zabranjeni za upotrebu. Brojni arsenovi spojevi u pravilu su perzistentni, anorganski dio molekule se taloži u tlu, dok se organski dio razgradi⁴⁵.

2.1.3. Utjecaj arsena na zdravlje čovjeka

Toksičnost arsena osnovni je razlog velikog interesa za spojeve arsena u vodi. Arsen u elementarnom obliku nije otrovan, ali su otrovni njegovi spojevi. Smatra se da je anorganski arsen toksičniji od organskog⁴⁶. U ljudski organizam arsen dospijeva konzumiranjem zagađene hrane ili vode. Od anorganskih vrsta arsena za čovjeka se najtoksičnijim smatra plinoviti arsin, H_3As , koji nije prirodan sastojak vode, a zatim slijede spojevi trovalentnog arsena – arseniti – i spojevi petovalentnog arsena – arsenati⁴⁷. Istraživanja dugotrajnog izlaganja arsenu iz pitke vode pokazala su kako je arsen povezan s rakom jetre, pluća, bubrega, mokraćnog mjehura, kao i raka kože^{47,48}. Arsen se u hrani, naročito u ribama i školjkama, najčešće nalazi u obliku manje toksičnih organskih spojeva. Na temelju raspoloživih literaturnih podataka, pretpostavlja se da je oko 25% arsena u hrani prisutno u anorganskom obliku¹⁸. Treba naglasiti kako je najveća izloženost arsenu preko pitke vode u kojoj je arsen prisutan u anorganskom obliku. Smatra se da je voda za piće u s koncentracijom arsena većom od $10 \mu g L^{-1}$ dominantan izvor izloženosti i ugroženosti čovjeka arsenom^{46,18}.

Arsen nije prirodan sastojak ljudskog organizma. Akutno trovanje arsenom iz vode zabilježeno je pri visokoj koncentraciji arsena, od oko $20 mg L^{-1}$ ¹⁸. Trovanje arsenom konzumacijom vode koja sadrži arsen nije trenutačno (jednokratna konzumacija vode s višim

koncentracijama arsena), već akumulativne (dugotrajna konzumacija vode s nižim koncentracijama arsena). U velikom broju epidemioloških studija^{46,18} istražena je veza između rizika pojave raka i oralnog unosa arsena vodom. Bez obzira na različite pristupe i metodologije istraživanja, smatra se kako postoje dokazi da je konzumacija vode s povećanim sadržajem arsena povezana s razvojem različitih malignih oboljenja⁴⁷. Povećan rizik od malignih oboljenja uočen je u slučajevima konzumacije vode s više od $50 \mu\text{g L}^{-1}$ arsena⁴⁸.

2.1.4. Zakonske odredbe i preporuke o spojevima arsena

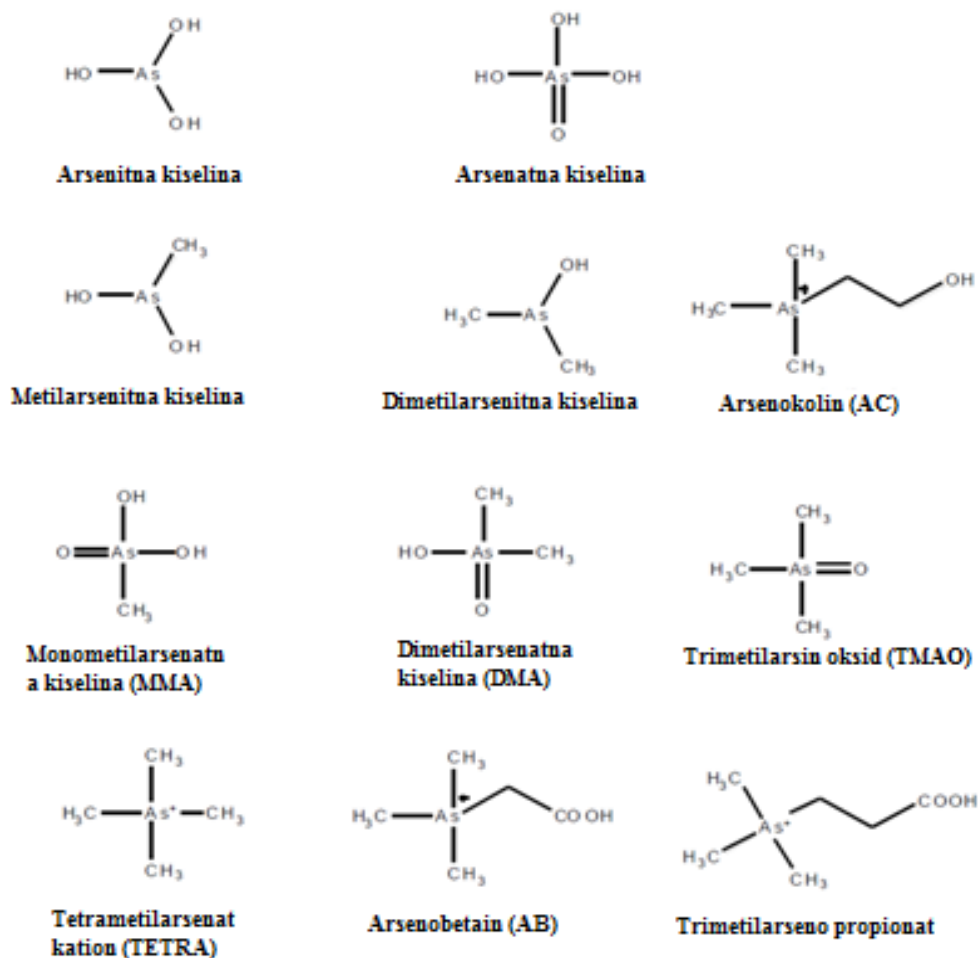
Praćenje i kontrola arsena (koncentracije i oblika) u različitim ekosustavima vrlo je važna za zaštitu zdravlja ljudi i okoliša. Eksperimentalna ispitivanja na životinjama i epidemiološke studije na humanoj populaciji dokazala su toksična i kancerogena svojstva arsena. Brojni su podaci o povezanosti rizika od pojave raka i konzumacije vode s povećanim sadržajem arsena, ali još nije procijenjen točan rizik uzrokovan niskim koncentracijama arsena u vodi. Imajući u vidu sve neodređenosti u vezi s procjenom rizika, Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) je 1993. godine dala preporuku za Minimalnu dozvoljenu koncentraciju (MDK) arsena u vodi za piće od $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Bilo koja količina arsena iznad $10 \mu\text{g L}^{-1}$ u vodi smatra se nesigurnom za konzumaciju.

Prema klasifikaciji Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC)⁴⁷ anorganski trovalentni arsen svrstan je u grupu I, što znači da je dokazano karcinogen za čovjeka, dok su peterovalentni anorganski i organski arsen, kao i njihovi spojevi, svrstani u toksične tvari⁴⁹. Osim toga, u ograničenom broju *in vivo* i *in vitro* studija utvrđeno je i mutageno djelovanje arsena (kromosomske aberacije). Na temelju dobivenih rezultata maksimalna dozvoljena koncentracija arsena u vodi za piće regulirana je na 10 ppb od strane regulatornih tijela, uključujući i Američku agenciju za zaštitu okoliša (engl. *United States Environmental Protection Agency*, USEPA)⁴⁸, te na temelju preporuka WHO⁴⁹.

Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) također navodi potrebu za razradom podataka o udjelu pojedinih specija u različitim prehrambenim proizvodima radi procjene izloženosti populacije putem hrane i mogućim zdravstvenim učincima u ovisnosti o dozi⁵⁰. Kako bi se smanjila izloženost arsenu putem hrane, EFSA je 2009. godine preporučila smanjenje vrijednosti referentne doze temeljene na riziku (engl. *Benchmark dose*, BMDL₀₁) od 0,3 do $8 \mu\text{g}$ anorganskih specija arsena po kilogramu tjelesne mase po danu⁵⁰.

2.1.5. Pojavni oblici arsena u prirodi

Poznavanje koncentracije arsenovih specija u prirodnoj vodi vrlo je važno jer njegova toksičnost, pokretljivost i bioraspoloživost ovise upravo o njegovom kemijskom obliku. Neki najvažniji kemijski oblici arsena, od anorganskih i organskih oblika, do spojeva arsena i šećera, arsena i lipida te glutationskih kompleksa u okolišnim i biološkim sustavima prikazani su na Slici 1.

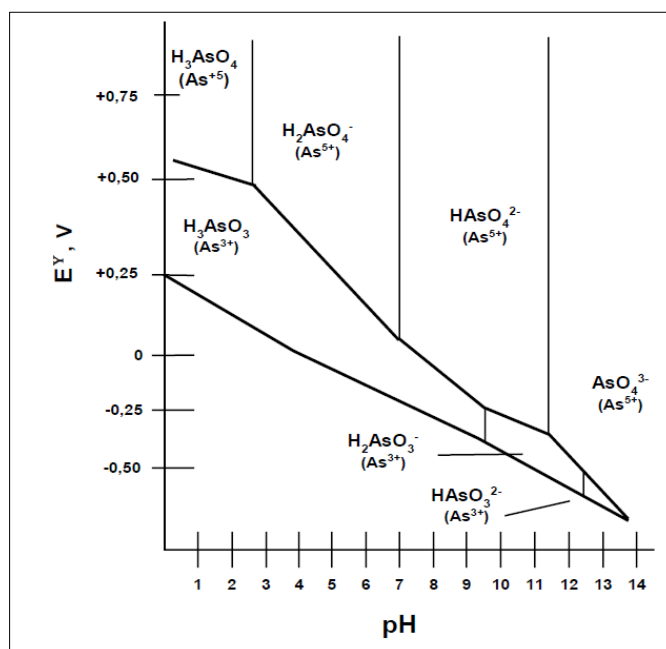


Slika 1. Kemijske formule uobičajenih specija arsena u okolišnim i biološkim sustavima⁵¹.

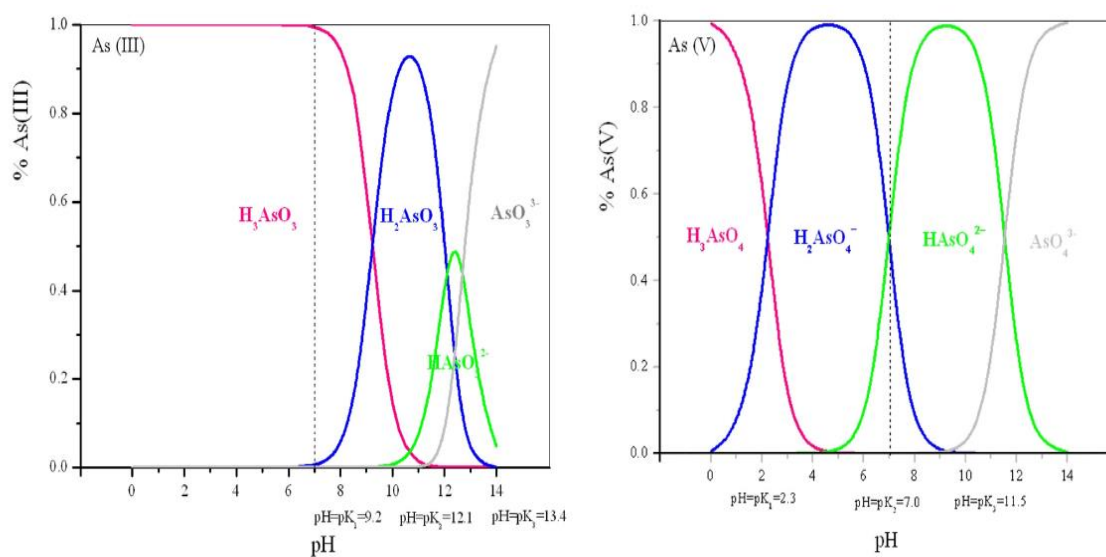
Arsenat As(V) je glavna specija arsena prisutna u površinskoj vodi, dok se arseniti As(III), monometilarsonska kiselina (MMA), dimetilarsinska kiselina (DMA) i arsenobetain (AB) često nalaze u površinskim i podzemnim vodama pri nižim koncentracijama⁴. Do sada je identificirano 20 do 30 spojeva arsena, od kojih su mnogi rezultat metaboličkih procesa uslijed uzimanja kontaminirane vode od strane biljaka i mikrobne konverzije. Molekulski oblik arsena

utječe na njegovu toksičnost, mobilnost kao i izbor metoda uklanjanja. Anorganski reducirani oblik arsena, arsenit, As(III) i oksidirani oblik, arsenat, As(V), su osnovni oblici arsena prisutni u prirodnim vodama, a praćeni su njihovim metiliranim oblicima³. Arsen također postoji u kemijskim oblicima As^0 i As^{3-} koji nisu od velikog značaja za prirodne vode⁴. U prirodnim vodama u prisutnosti kisika, As(V) ioni su prisutni u udjelu od oko 90% u odnosu na ukupni arsen⁵². Ioni As(III) i As(V) su takođe osnovne arsenove specije prisutne i u podzemnoj vodi.

Ozbiljne zdravstvene i neizbježne posljedice visokog unosa arsena prijavljene su u Zapadnom Bengal, Bangladešu, Tajvanu i Unutrašnjoj Mongoliji, a uglavnom se pripisuju visokim udjelima anorganskog arsena u bunarskoj vodi⁵³. Zbog razlika u toksičnosti arsenovih specija, njihovo poznavanje je ključno za poboljšanje razumijevanja zdravstvenih posljedica i dizajniranja procesa za smanjenje udjela arsena prisutnog u vodi za piće. Kao što je prije naglašeno, povišen udio arsena u prirodnim vodama posljedica je erozije tla i otapanja minerala koji sadrže arsen. Iako prirodne vode sadrže arsen u obliku organskih i anorganskih spojeva, anorganski spojevi arsena uglavnom su prevladavajuća specija. Oksidacijski broj (valencija) arsena ovisi o oksidacijsko–redukcijskim uvjetima i pH vrijednosti vode. Slike 2. i 3. prikazuju najvažnije arsenove kemijske vrste u vodi s obzirom na pH vrijednost i redoks potencijal. Arsenat se javlja u četiri različita oblika – H_3AsO_4 , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} i AsO_4^{3-} , a arsenit u pet oblika – H_4AsO_3^+ , H_3AsO_3 , H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-} i AsO_3^{3-} .



Slika 2. Specije arsena u prirodnim vodama u ovisnosti o pH vrijednosti i redoks potencijal⁵⁴.



Slika 3. Stabilnost arsenovih spojeva u vodi, As(III) i As(V), ovisno o pH vrijednosti vode⁴.

Pri uklanjanju arsena iz zagađenog izvora i osiguravanja zdravstveno ispravne vode za piće neophodno je ne samo poznavati udio arsena, već i identificirati kemijske vrste arsena prisutne u uzorku vode, kao i njihove interakcije s drugim sastojcima⁵⁵. Kao općenito pravilo, može se reći kako se peterovalentni arsen (arsenat) češće nalazi u površinskim vodama, a arsen u trovalentnom obliku (arsenit) u podzemnim vodama⁴. Međutim, kada je riječ o podzemnim vodama može doći do odstupanja od ovog pravila te se nekada u istom izvoru vode može naći arsen u oba kemijska oblika. Dosadašnje studije o arsenovim specijama u podzemnoj vodi većinom ukazuju na prisutnost iona As(V) kao osnovne ionske vrste arsena. Daljnja istraživanja, provedena neposredno poslije sakupljanja uzoraka podzemnih voda zagađenih arsenom, pokazuju značajne koncentracije i prisustvo iona As(III)⁵⁶. Kim i sur. su proučavali uzorke podzemne vode iz jugoistočnog Michigana, SAD i pokazali su kako je 53–98 % arsena prisutno u obliku As(III) za koji je poznato da je znatno toksičniji od As(V)⁵⁷.

Organske arsenove kemijske vrste prisutne su u prirodnim vodama kao posljedica biometiliranja mikroorganizama i primjene arsenovih organskih pesticida⁵⁸. Od organskih oblika arsena najčešće su prisutni monometilirana arsenatna kiselina (MMA) i dimetilirana arsenatna kiselina (DMA). Utvrđeno je kako su organske kemijske vrste više prisutni u površinskim, nego u podzemnim vodama⁵⁹. Ipak, iako se organske kemijske vrste arsena samo u tragovima javljaju u prirodnim vodama, značajne su za proučavanje metabolizma biljaka i životinja⁶⁰.

2.2. Očuvanje omjera anorganskih specija arsena u uzorcima prirodnih voda: prikupljanje uzorka, pohranjivanje i konzerviranje

Svako uzorkovanje vode iz okoliša dovodi do potencijalnih reakcija koje mijenjaju omjer sastojaka uzorka, što može, ako se ne poduzmu primjereni koraci, rezultirati nepouzdanim rezultatima analiza. Općenito, postupci uzorkovanja i pohranjivanja uzorka smatraju se ključnim zahtjevom za očuvanje omjera specija elemenata tijekom cijelog analitičkog procesa. Za postizanje navedenog cilja mogu se izdvojiti dvije glavne strategije. Prvo, potrebno je kemijske specije od interesa očuvati nepromijenjenim tijekom svih koraka analize kako bi se izbjegle promjene u oksidacijskom stanju, promjene inducirane mikrobnom aktivnošću i gubici isparavanjem ili adsorpcijom. Drugo, specije je moguće kvantitativno preoblikovati u prikladne derivate za daljnje odvajanje, akumulaciju i kvantifikaciju. Nekoliko metoda očuvanja omjera arsenovih redoks-specija predloženo je u literaturnim izvorima^{61,62,6,8}, pri čemu se većina temelji na zakiseljavanju uzorka vode do $\text{pH} = 2$, dodatku klorovodične kiseline, hlađenju ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) i uklanjanju kisika iz uzorka ili primjeni jakih kompleksirajućih sredstava, kao što je EDTA.

Određivanje koncentracije arsenovih specija u uzorcima vode važno je za određivanje njegove ukupne toksičnosti, pokretljivosti i geokemijskih transformacija u okolišu. Pravilno filtriranje i konzerviranje uzorka neophodni su za stabilizaciju omjera specija As(III/V) prije analize. Nažalost, metode za konzerviranje redoks-specija u literaturnim izvorima nisu dosljedne, a eksperimentalne studije očuvanja specija nisu dovoljno objašnjene^{9–11,63}. Al-Sibai i Fogg izvijestili su da se 50% As(III) iz otopine masene koncentracije $\gamma = 20\text{ mg L}^{-1}$ pohranjene u staklenoj posudi oksidira nakon 33 dana⁹. Međutim, standardne otopine As(III) pripremaju se otapanjem As_2O_3 u otopini NaOH koncentracije $c = 1\text{ mol L}^{-1}$, te bi se brzo oksidira tijekom pripreme jer As(III) brzo oksidira pri visokom pH vrijednostima⁶⁴. Andreae ukazuje kako je filtriranje uzoraka morske i slatke vode, a zatim hlađenje na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ stabilizira omjer As(III/V) unutar 10 dana¹². Za dulje pohranjivanje uzorka korišteno je zamrzavanje na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cherry i sur. objavili su rezultate niza testova oksidacije i redukcije otopina koje sadrže 50 mg L^{-1} As(III) i 50 mg L^{-1} As(V)¹³. Nije uočena značajna oksidacija ili redukcija As tijekom 3 tjedna za otopine izložene zraku, koje ne sadrže druge oksidanse ili reducense uz korištenje destilirane i deionizirane vode. Feldman je izvijestio o brznoj oksidaciji As(III) u rasponu koncentracija od $1 - 1000\text{ mg L}^{-1}$ ¹⁰. Ova oksidacija bila je inhibirana dodatkom askorbinske kiseline. Iz svega

navedenog proizilazi kako na temelju literaturnih podataka ne postoji dosljednost vezano s najprikladnijim postupcima očuvanja anorganskih arsenovih specija.

Dodavanje oksidirajućih kiselina, kao što je dušična kiselina, najčešći je pristup za stabilizaciju uzoraka u svrhu određivanja elemenata u tragovima. Iako je takav pristup vrlo čest, nije izvediv za analizu specija u kojem se redoks uvjeti ne bi smjeli mijenjati kako bi se izbjegla bilo kakva promjena kemijskih specija. S obzirom da je HNO_3 oksidacijsko sredstvo koje oksidira As(III) u As(V) ne može se koristiti za konzerviranje specija arsena. Iako teoretski, redoks potencijal zajedno s pH vrijednosti određuje omjer dviju arsenovih specija, u stvarnosti arsenove specije često nisu u ravnoteži zbog kinetičkih učinaka. Zakiseljavanje vodenih uzoraka često je pravilo čiji je cilj suzbijanje taloženja Fe i Mn povećanjem njihove topljivosti. Zakiseljavanje pomaže i u smanjenju mikrobne aktivnosti¹⁴.

Drugi pristup očuvanju arsenovih specija sastoji se od uklanjanja ili kompleksiranja potencijalnih redoks-parova bez utjecaja na ravnotežu između različitih arsenovih specija. Budući da kisik, koji potječe iz zraka, nije u stanju oksidirati arsenit, za ubrzanje reakcija potrebni su dodatni redoks katalizatori, kao što su otopljeni ili koloidni spojevi željeza ili mangana. Prema tome, isključivanje takvih spojeva iz reakcije može biti pogodna metoda za uspješno očuvanje arsenovih specija kompleksiranjem^{6,15}. Svjetlost i temperatura su dodatni čimbenici koji mogu utjecati na omjer količine arsenovih specija. Svjetlost utječe na oksidaciju arsenita pa je stoga preporučljivo držati uzorke vode u mraku. Temperatura utječe na mikrobnu aktivnost kao i na kemijske reakcije pa se stoga preporuča čuvati uzorke vode na hladnom (+4 °C)^{62,63}. Dodatkom H_3PO_4 koncentracije $c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ za konzerviranje uzoraka vode arsenove specije su bile stabilne tijekom 28 dana u prisutnosti visokih koncentracija željeza i mangana (do 100 mg L^{-1}). Koncentracija arsenovih specija u svim uzorcima bila je veća od 90 % početne vrijednosti nakon 3 mjeseca s usmjerneosti blagog smanjenja sadržaja arsenita⁷. Hall i sur. uočili su da same kiseline, HCl i HNO_3 ne mogu inhibirati oksidaciju As(III) u As(V)¹¹. Cheam i Agemain su uočili kako je omjer arsenovih specija nakon zakiseljavanja s 0,2 % (v/v) H_2SO_4 na sobnoj temperaturi u prirodnim i modelnim deioniziranim uzorcima vode stabilan⁶⁵. Međutim, treba napomenuti kako nije poželjno upotrebljavati H_2SO_4 budući da nije dovoljno čista za primjenu kod određivanja kromatografskim metodama. Nadalje, H_2SO_4 se obično ne upotrebljava za očuvanje metala u tragovima zbog mogućnosti taloženja BaSO_4 .

Općenito, sredstvo za konzerviranje mora ispuniti predviđeni zadatak s minimalnim neželjenim učincima na uzorku. Prema Segura i sur. arsenove specije u vodi su stabilne u

neutralnim uvjetima tijekom 4 mjeseca ukoliko su pohranjene u polipropilenske boce u hladnjaku⁶⁶. McCleskey i sur. naveli su da je za stabilizaciju otopljenih arsenovih specija kao redoks-specija neophodno filtriranje i konzerviranje uzoraka s HCl, H₂SO₄ ili EDTA kako bi se maskiralo Fe te da takve uzorke treba pohraniti u mraku⁶. Filtriranjem uzorka vode uklanja se većina koloidnog materijala i mikroorganizama koji mogu utjecati na omjer otopljenog As(III/V). Zakiseljavanje sprječava oksidaciju i taloženje Fe i Mn hidroksida koji se mogu istaložiti i adsorbirati arsen. Dodavanjem EDTA-e inhibira se stvaranje precipitata.

Očuvanje As(III) u uzorku ovisi o analitičkoj tehnici i potrebi stabilizacije drugih redoks specija, osobito Fe(II/III). Klorovodična kiselina služi kao dobar konzervans za redoks specije As, Fe i Se za širok raspon uzoraka, osobito pri primjeni tehnike HG-AAS za određivanje elemenata koji tvore hidride. Za određivanje arsena vezanim sustavom HPLC-ICP-MS, EDTA je pretpostavljeni konzervans radi poznate poliatomske izobarne interferencije s izotopom arsena ⁷⁵As, od kojih su najvažniji ⁴⁰Ar³⁵Cl⁺ i ⁴⁰Ca³⁵Cl⁺. Izobarne interferencije mogu uzrokovati značajne analitičke probleme pri analizi uzoraka voda bogatih kloridima ili uzorcima voda konzerviranima klorovodičnom kiselinom¹⁶.

Standardne otopine As(III) i As(V) u deioniziranoj/destiliranoj vodi za kalibraciju morale bi biti stabilne u određenom vremenskom periodu. Tallman i Shaikh su izvjestili da su standardne otopine anorganskih arsenovih specija reda veličine $\mu\text{g L}^{-1}$ u destiliranoj vodi, bez kao i u prisutnosti uobičajenih redoks agenasa (O₂, Fe(III), H₂S), bile stabilne najmanje 3 tjedna bez dodavanja konzervanasa¹⁷. No, nekoliko studija navodi da su arsenove specije koncentracija reda veličine $\mu\text{g L}^{-1}$ u deioniziranoj vodi podložne redoks transformaciji ukoliko nisu konzervirane. Primjerice, pri sobnoj temperaturi u deioniziranoj vodi kojoj je dodan As(III) i As(V) (0,5–20 $\mu\text{g L}^{-1}$) dolazi do redukcije As(III) unutar nekoliko dana. Bednar i sur. izvijestili su da su nekonzervirane standardne otopine As(III) i As(V) stabilne samo 24 h⁸. Feldman je izvijestio o potpunoj oksidaciji As(III) u standardnim otopinama koncentracija 1–10 $\mu\text{g L}^{-1}$ unutar 4 dana¹⁰. Iskustvo Francesconija i Kuehnelta bilo je iznenađujuće. Unutar 36 h pri sobnoj temperaturi standardne otopine As(III) potpuno su oksidirane, a standardne otopine As(V) potpuno su reducirane⁶⁷. Polya i sur. zapazili su da je zakiseljena standardna otopina As(III) stabilna do 3 godine⁵.

Velike različitosti uočene u razdoblju stabilizacije posljedica su kako prirode matriksa uzoraka, tako i mikrobne aktivnosti. Važno je napomenuti i da se u većini ispitivanja postupaka konzerviranja arsena upotrebljava modelni uzorak, odnosno deionizirana voda bez tipičnog

pozadinskog utjecaja matriksa. Na primjer, modelne otopine priređene u dvostruko destiliranoj vodi stabilne su duži period jer destilacija inaktivira većinu mikroorganizama^{13,68}. Glavni su uzroci promjena u pogledu omjera arsenovih specija tijekom uzorkovanja i pohrane precipitacija hidratiziranih oksida željeza (HFO) i adsorpcija arsena, fotokemijske reakcije između Fe(III)/Fe(II) i As(III)/As(V) te mikrobna aktivnost. Željezo se nalazi u okolišu kao Fe(II) ili Fe(III), ovisno o pH vrijednosti i elektrodnom potencijalu. Kad atmosferski kisik reagira s otopljenim Fe(II), dolazi do taloženja željeza u obliku HFO na koje se adsorbiraju otopljene specije arsena. Ovakvi HFO pogodni su za taloženje As(V) kao anionske specije⁶⁹. U prisutnosti Fe(III) u modelnoj otopini uočena je brza oksidacija As(III) u As(V)⁶⁸. Dodavanjem Fe(II) u uzorke podzemne vode bogate željezom koji imaju $\text{pH} < 2$ dobiva se izvrsna stabilnost As(III)⁷⁰.

Pokazano je da dodavanje EDTA u uzorke vode iz drenaža rudnika može očuvati raspodjelu As(III/V) do 3 mjeseca⁸. EDTA kompleksira Fe i sprječava fotokemijske, oksidacijske i taložne reakcije. Bednar i sur. navode da je koncentracija Fe u većini uzoraka vode koju su ispitali manja od 500 mg L^{-1} i preporučuju dodavanje 5% (v/v) EDTA koncentracije $c = 0,25 \text{ mol L}^{-1}$ uzorcima radi očuvanja omjera As(III/V)⁸. Međutim, za uzorke s većim udjelom Fe bila bi potrebna puno veća količina EDTA. Iako su McCleskey i sur. pokazali da je HCl učinkovit konzervans za anorganski arsen, djelujući kao biocid i inhibirajući Fe(II) oksidaciju i Fe(III) hidrolizu⁶, ovi nalazi su u suprotnosti s podacima Borha i Wilderera⁶⁹. Dodavanje EDTA^{8,71} ili fosfatne kiseline⁷² uzorcima vode korišteno je za minimiziranje taloženja metalnih oksihidroksida specija arsena s Al, Fe i Mn. Gomez–Ariza i sur. dali su pregled metoda očuvanja specija arsena, uključujući zamrzavanje, hlađenje, zakiseljavanje, dodatak askorbinske kiseline i pohranu u mraku⁷³. U literaturnim izvorima uglavnom ne postoji suglasnost za postupke prikupljanja i konzerviranja uzoraka u svrhu laboratorijske analize zbog specifičnosti, složenosti i razlika u matriksu uzoraka⁷³.

2.3. Analitičke metode za dokazivanje i određivanje arsenovih specija

Idealno rješenje za izravno određivanje specija bila bi *in situ* analiza. Međutim, vrlo malo tehnika osigurava potrebnu selektivnost i osjetljivost potrebnu za analizu specija elemenata u tragovima. To su: nuklearna magnetska rezonancija (NMR), rendgenska fotoelektronska spektrometrija (XPS), elektronska spektrometrija za kemijsku analizu (ESCA), spektrometrija

fine strukture s rentgenskom apsorpcijom (XAFS), elektronska spinska rezonancija (ESR), tandemna spektrometrija masa (TMS) i Mössbauerova spektrometrija^{74,75}.

U realnom okruženju za određivanje specija obično se primjenjuju najmanje dva koraka odvajanje i detekcija. Metode izbora za rutinsko određivanje specija u velikom broju uzoraka vode dobro su poznate metode koje uključuju povezivanje tehnika odvajanja, kao što su ionska kromatografija (IC)⁷⁶ i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)⁶⁶ s osjetljivim sustavom detekcije, kao što su induktivno spregnuta plazma sa spektrometrijom masa (ICP–MS), hidridna tehnika–atomska fluorescencijska spektrometrija (HG–AFS), hidridna tehnika–atomska apsorpcijska spektrometrija (HG–AAS)⁷⁷ i elektrotermička atomska apsorpcijska spektrometrija (GF–AAS, tehnika grafitne peći)⁷⁸ su metode izbora za rutinsko određivanje specija u velikom broju uzoraka vode. Nadalje, elektrokemijske metode su također moćni alati za specijacijsku analizu.

Spregnute tehnike koje kombiniraju kromatografske metode odvajanja ili neke ekvivalentne tehnike odvajanja s detekcijom najosjetljivijim atomskim spektrometrijskim tehnikama su najučinkovitije u analizi specija elemenata. Prednosti navedenih tehnika su višestruke: visok stupanj automatizacije, visoka propusnost uzorka i dobra reproducibilnost, kratko vrijeme analize, smanjeni rizik za neželjnu pretvorbu specija tijekom analize, smanjenje onečišćenja zbog zatvorenog sustava i visok stupanj točnosti rezultata zbog povećane selektivnosti i preciznosti kombiniranih tehnika^{79,80}. Analitičke metode za određivanje različitih specija arsena postaju sve važnije zbog različite toksičnosti i kemijskog ponašanja različitih specija arsena. Analitičke metode za određivanje anorganskog arsena kao prevladavajuće specije u vodi, mogu se podijeliti u četiri grupe kako je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Najvažnije tehnike koje se koriste u laboratorijskoj analizi arsena⁸¹.

Spektrofotometrijske tehnike	Hidridna atomsko apsorpcijska spektrometrija (HG–AAS) Hidridna atomsko fluorescencijska spektrometrija (HG–AFS) Grafitno–plamena atomsko apsorpcijska spektroskopija (GF–AAS) Srebro–dietilditiokarbamatni postupak u spektrofotometriji (SDDC)
Tehnike induktivno spregnute plazme (ICP)	Spektrometrija masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP–MS) Induktivno spregnuta plazma atomska emisijska spektroskopija (ICP–AES) Induktivno spregnuta plazma atomska fluorescencijska spektroskopija (ICP–AFS) Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i induktivno spregnuta plazma sa spektrometrijom masa HPLC–ICP–MS
Neutron aktivacijska analiza	(NAA)
Elektrokemijske metode	Polarografske tehnike Voltometrija katodnog otapanja (CSV) Voltometrija anodnog otapanja (ASV) Mikrolitografski nizovi

Hidridna tehnika je najčešća metoda atomske spektrometrije koja prije analize prevodi arsenit i arsenat u isparljivi, jako toksični plin arsin upotrebom natrijevog borhidrida ili kalijevog borhidrida. U kombinaciji s metodama AAS ili AFS, određivanje arsena je moguće do detekcijskih granica od $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Kod grafitno plamene tehnike nema nastajanja hidrida, ali pak dolazi do isparavanja arsena s grafitne cijevi na vrlo visokoj temperaturi. Metodom GF–AAS postižu se slične ili bolje detekcijske granice u usporedbi s metodom HG–AAS. Tehnika induktivno spregnute plazme (ICP) uključuje raspršivanje zakiseljenog uzorka na visokoj temperaturi plazme što dovodi do prevođenja prisutnog arsena u atome i ione svih oblika i ne zahtjeva razaranje kao pri određivanju metodom HG–AAS. Velika prednost uporabe ICP je simultana analiza širokog spektra elemenata. Vezani sustavi kao što su HPLC s ICP–MS imaju posebnu primjenu u analizi arsenovih specija, a ICP–MS sve više dobija na popularnosti. Analiza metodom neutronske aktivacije je izuzetno osjetljiva tehnika za analizu arsena, ali se uglavnom koristi kao referentna metoda pri razvoju novih metoda. Među elektrokemijskim metodama voltometrija anodnog otapanja (ASV), najčešće nalazi primjenu u malim laboratorijama zahvaljujući nižoj cijeni. Karakteriziraju je jednaka osjetljivost prema ionima

As(III) i As(V), te mogućnost alternative za tehnike AAS i ICP koje su veoma skupe te nisu dostupne u svim laboratorijama⁸¹.

2.3.1. Kromatografske tehnike razdvajanja specija arsena

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s obrnutom fazom (RPLC) i plinska kromatografija (GC) su uobičajeno korištene tehnike odvajanja arsenovih specija. U literaturnom pregledu suvremenih kromatografskih tehnika povezanih s metodom ICP–MS pri određivanju specija elemenata zabilježeno je dosta poboljšanja u procesu odvajanja^{82,83}. Kod analize metodom HPLC, svođenjem na najmanju moguću mjeru duljine kolone i unutarnjeg promjera smanjuje se širinu pikova. Različite vrste raspršivača također su opcija kada matriks uzorka postane problem. Organska otapala u ekstrakcijskim postupcima trebale bi se koristiti u niskim koncentracijama kako bi se smanjila nestabilnost plazme⁸⁴. Odvajanje As(III), As(V), MMA i DMA iz uzoraka kojima su dodani standardni referentni materijali može se postiću vezanog sustava HPLC–ICP–MS. Hamilton *PRP–X100*, 10 μm anionska izmjenjivačka kolona koristi $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ koncentracije $c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ kao mobilnu fazu. Odvajanje arsenovih specija iz biljnog materijala, postiže se anionskom izmjenom na koloni *PRP–X100* ili kationskom izmjenom na koloni *Zorbax 300–SCX*. Arsenove specije u uzorcima biljnog materijala mogu se odvajati i pomoću kolone *Dionex AS7* s anionskom izmjenom^{85,86}.

Tekućinska kromatografija (LC) je analitička tehnika koja se koristi za odvajanje otopljenih tvari. Razdvajanje se temelji na interakciji analita s različitim kemijskim i fizičkim svojstvima između stacionarne faze (nepokretne faze) i mobilne faze (eluenta). Tvari iz otopina u različitoj mjeri stupaju u interakciju sa stacionarnom i tekućom mobilnom fazom zbog razlika u adsorpciji, ionskoj izmjeni, raspodjeli među fazama ili veličini čestica tvari koje se razdvajaju, te imaju različita vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni⁸².

Postoje različite vrste kromatografije ovisno o svojstvima dviju faza kao što su: kromatografija normalnih faza (polarna stacionarna faza, nepolarna mobilna faza), kromatografija obrnutih faza (nepolarna stacionarna faza, polarna mobilna faza) koje spadaju u razdjelnu kromatografiju, ionsko–izmjenjivačka kromatografija (privlačenje otopljenih iona iz mobilne faze prema suprotno nabijenoj stacionarnoj fazi), kromatografija isključenjem (razdvajanje na temelju veličine čestice, ali i oblika te naboja), adsorpcijska (razdvajanje na temelju afiniteta analita prema površini stacionarne faze) te afinitetna kromatografija

(razdvajanje analita pomoću interakcije s ligandom vezanim na stacionarnu fazu). Postoji veliki raspon stacionarnih i mobilnih faza za optimalno razdvajanje u analitičkim i biokemijskim analizama⁸³.

2.3.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je višenamjenska tehnika za odvajanje otopljenih tvari⁸². Neke druge separacijske tehnike, poput plinske kromatografije (GC), nisu pogodne za razdvajanje toplinski nestabilnih molekula ili se ne mogu direktno spregnuti s nekim od osjetljivih detektora, kao što je to slučaj kod izoelektričnog fokusiranja. Tekućinska kromatografija se može uspješno koristiti za razdvajanje širokog spektra polarnih i nepolarnih molekula kao što su peptidi i proteini, polimeri i male molekule npr. lijekovi ili njihovi metaboliti. Analiza se provodi razdvajanjem ciljanog analita od ostalih sastojaka smjese na kromatografskoj koloni koja je punjena česticama stacionarne faze i detekcijom istog prikladnom tehnikom⁸².

Tekućinski kromatograf je sustav u kojem se većinom polarni analiti razdvajaju na kromatografskoj koloni i detektiraju pomoću prikladnog detektora. Tekućinski kromatograf sastoji se od sustava za dovod mobilne faze, sustava za unošenje (injektiranje) uzorka, kolone, te detektora. Sustav za dovod mobilne faze i sustav crpki sastoji se od spremnika mobilne faze (1–4 kanala), ventila, odzračivača i sustava dovoda helija, crpke (samostojeće, binarne ili kvarterne), regulacijskog ventila na ulazu i izlazu iz crpke, sustava za ujednačavanje pulsova, ventila za ispiranje sustava, regulatora tlaka u sustavu, te dinamičke ili statičke miješalice⁸³. Kromatografske kolone nose oznake prema vrsti stacionarne faze (C18, C8, C4, CN, grafitna, SiO₂, gel–propusna itd.). Stacionarnu fazu najšire primjenjenu u tehnici HPLC čine čestice polarnog anorganskog materijala (silikagel) na kojeg su vezani lanci n–oktadodecila⁸⁷. Popularan naziv navedenih kolona je C18 kolone. Silikagel na svojoj površini sadrži reaktivne silanolne (–Si–OH) skupine što omogućava njegovu derivatizaciju C18 lancima ugljikovodika. Detektori koji se koriste u tekućinskoj kromatografiji mogu biti UV/VIS – od jedne do četiri valne duljine ili detektori s nizom dioda (DAD, PDA itd.), fluorescencijski detektori, indeksa loma, raspršenja svjetla, elektrokemijski, amperometrijski, spektrometar masa itd.

Pokretna faza (mobilna faza) u tekućinskoj kromatografiji je tekućina, uglavnom voda i smjese otapala, organska otapala i pufferi. Također može biti polarna ili nepolarna. Često se radi o smjesi dvaju ili više otapala. U slučaju kombinacije dvaju otapala tijekom analize, sastav

mobilne faze može biti konstantan, tada je riječ o izokratnom eluiranju. Suprotno tome, ako se sastav mobilne faze mijenja s vremenom, radi se o gradijentnom eluiranju⁸⁸.

2.3.1.2. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) je separacijska tehnika nastala poboljšanjem metode HPLC čije su glavne prednosti robusnost, jednostavnost, dobra selektivnost i osjetljivost, ali je ograničena u primjeni. Razlog je u tome što metoda UHPLC ima niži koeficijent difuzije u tekućoj fazi što utječe i na nizak koeficijent difuzije na čvrstoj fazi. Učinkovitost se može povećati smanjenjem veličine čestica stacionarne faze ispod 2,5 μm . Metoda UHPLC radi pri tlakovima do 400 bara, a smanjenje čestica utječe na povećanje tlakova, tako da se u UHPLC–u koriste kraće kolone koje su ispunjene česticama veličine manje od 4 μm koje moraju biti otporne na rad pri visokim tlakovima⁸⁹.

Prednosti metode UHPLC–a su mnoge: kraće vrijeme analize, povećana osjetljivost zbog oštrijih pikova, poboljšana selektivnost, manja potrošnja otapala, niža cijena analize i drugo. Nedostaci su većinom vezani uz veličinu čestica. Zbog povećanog tlaka potrebno je češće održavanje, a vijek kolona je smanjen. Kolone kojima je veličina čestica manja od 3 μm u većini slučajeva se ne mogu regenerirati pa imaju ograničen broj korištenja te je zahtjevnija priprava uzoraka. Primjenjiva je za analize prirodnih produkata i tradicionalnih biljnih lijekova, identifikaciju biotransformacije metabolita, proučavanje biokemijskih promjena koje se odvijaju u biološkim sustavima, proučavanje ADME (adsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija), bioanalize, testiranje topivosti kod kontrole kvalitete u farmaceutskoj industriji, ispitivanje transformacije spojeva kroz vrijeme pod različitim vanjskim utjecajima. Metoda se također koristi kod proizvodnje, osiguranja kvalitete i kontrolu kvalitete, za identifikaciju, provjeru čistoće, razvoj novih metoda, validaciju, sigurnost i učinkovitost, što je posebno bitno u proizvodnji lijekova kod kojih se zahtijeva velika čistoća sirovina te konačnog proizvoda^{87,88}.

Princip rada UHPLC–a je isti kao i za HPLC, ali je izvedba uređaja nešto drugačija. Glavna razlika je veličina čestica stacionarne faze koje su manje od 3 μm . Zbog sitnijih čestica razvijaju se veći tlakovi, a kako bi se oni smanjili potrebno je povisiti temperaturu što uzrokuje smanjenje viskoznosti mobilne faze te ubrzanje protoka mobilne faze. U Tablici 2. prikazane su razlike između HPLC–a i UHPLC–a⁹⁰.

Tablica 2. Usporedba tehnika HPLC–a i UHPLC–a.

Karakteristike	HPLC	UHPLC
Veličina čestica	3 do 5 μm	< 2 μm
Maksimalni radni tlak	35 – 40 MPa	103,5 MPa
Dimenzije kolone	150 \times 3,2 mm	150 \times 2,1 mm
Temperatura kolone	30 $^{\circ}\text{C}$	65 $^{\circ}\text{C}$
Volumen injektiranja	5 μL	2 μL

Kod pripreme uzorka mogu se koristiti pročišćavanje ili načelo „razrijedi i injektiraj“ („*dilute and shoot*“). Kada se koristi ova tehnika, uzorci se jednostavno razrijede i injektiraju u uređaj LC–MS/MS. Problem nastaje ako je uzorak jako onečišćen što može oštetiti kolonu, zaustaviti rad uređaja te dovesti do smanjene osjetljivosti. U tom slučaju se uređaj mora isključiti, a kolona očistiti. Kod pročišćavanja je cilj ukloniti tvari iz matriksa uzorka koje bi mogle reagirati s punilom kolone, a najčešće se koristi ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid phase extraction*, SPE). Problem je u tome što svaki korak pročišćavanja dovodi do novih izvora mjerne nesigurnosti i pogrešaka u rezultatima analize^{91,92}.

2.3.1.3. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je analitička tehnika koja se koristi u kemiji, biokemiji, farmaciji, medicini i mnogim drugim srodnim granama znanosti. Temelji se na analizi molekula prema omjeru masa i naboja (m/z). Molekule se prevode u ione koji se mogu fragmentirati na druge ionske fragmente⁹².

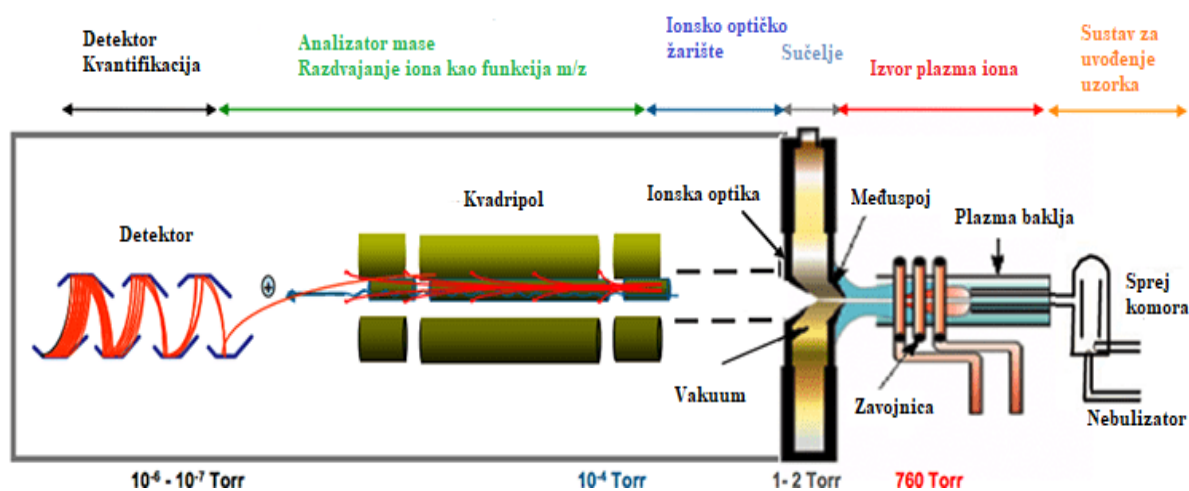
Sam uređaj se sastoji od ionskog izvora gdje nastaju ioni, analizatora masa koji nastale ione razdvaja prema omjeru m/z , detektora i sustava za obradu podataka. U spektrometru masa, analiti se prvo isparavaju i ioniziraju. Dobiveni ioni zatim se ubrzavaju i usmjeravaju prema analizatoru masa u kome se separiraju na osnovu omjera m/z . Ioni koji napuste analizator masa se detektiraju. Rezultati se prikazuju grafički spektrom masa koji prikazuje ovisnost relativnog intenziteta iona o njihovom omjeru m/z . Ukoliko se analiza provodi tandemnom spektrometrijom masa, za kvantifikaciju se koristi ona tranzicija koja daje najbolji omjer signala i šuma te najveći odziv. Za kvalifikaciju, odnosno potvrdu se koristi drugi dio pomoću kojega se potvrđuje je li riječ o analitu koji se određuje⁹². Ukoliko se metoda MS koristi bez prethodne

metode odvajanja (npr. kod razvoja metode), uzorak se može injektirati direktno kroz crpku koja će omogućiti konstantan protok otopine.

2.3.2. Vezani sustav LC–ICP–MS

2.3.2.1. Princip rada i primjena ICP–MS sustava

Induktivno spregnuta plazma sa spektrometrijom masa (ICP-MS) ima primjenu u znanstvenim istraživanjima i pri rutinskim analizama. Prednosti ove tehnike su u brzjoj multielementnoj analizi s mnogo nižim detekcijskim granicama u usporedbi s već poznatim tradicionalno korištenim tehnikama, kao što su atomska emisijska spektrometrija (AES) ili atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS). Pomoću metode ICP-MS moguće je određivanje preko 90 elemenata periodnog sustava, kako metala, tako i nemetala, određivanje njihovih izotopa kao i izotopskih odnosa pojedinih elemenata. Detekcijske granice je reda veličine ppt (*part per trillion*). Ova tehnika zasniva se na zajedničkom djelovanju induktivno spregnute plazme (za ionizaciju) i masenog detektora (za odvajanje i detekciju analita). Osnovni dijelovi instrumenta ICP-MS prikazani su na Slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz instrumenta ICP–MS⁹³.

Sustav za unošenje uzorka sastoji se od peristaltičke pumpe, raspršivača i komore za raspršivanje (engl. *spray chamber*). Da bi uzorak bio u obliku koji je prihvatljiv za plazmu uređaja, uvodi se u raspršivač s unakrsnim raspršivanjem koji služi da se iz tekućine nastane aerosol. Dobivene kapljice razdvajaju se u komori za raspršivanje, pri čemu se krupnije kapi (veličine većih od 10 μm) odvajaju i napuštaju komoru preko drenažnog sustava, a sitnije kapi

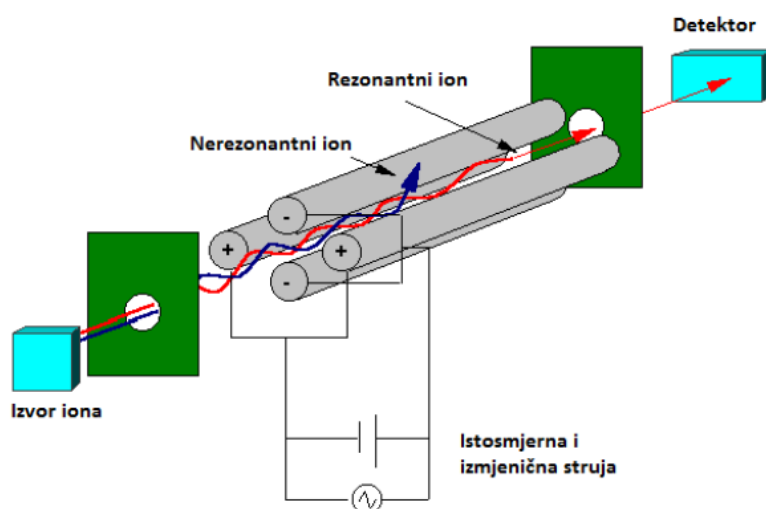
(veličine 5–10 μm) koje imaju odgovarajuću veličinu i brzinu za uvođenje u plazmu se nose u injektor. Pumpa omogućava konstantan protok uzorka, bez obzira na viskoznost tekućine⁹⁴.

Tekućinski kromatograf i spektrometar masa povezani su međuspojem ili sučeljem (engl. *interface*) koji ima višestruku ulogu: otparavanje tekućine, ionizacija neutralnih molekula i uvođenje analita u analizator. Međuspoj predstavlja poveznicu između atmosferskog tlaka ionskog ICP izvora i visokog vakuuma spektrometra masa. Vakuumski sustav omogućuje visoki vakum za ionsku optiku, kvadrupol i detektor. Međufazni prijelazi koji se događaju u međuspoju su otparavanje i desorpcija. Ionska optika upravlja ione u snop za prijenos u kvadrupol. Smještena je odmah iza međuspoja. Optimalna temperatura ionizacije je iznad 5000 °C i događa se u struji inertnog plina, najčešće argona⁹⁵.

Baklja ICP (engl. *torch*) proizvodi plazmu, odnosno predstavlja izvor iona, prevodi atome u ione. Plazma koju generira ICP je plin s dovoljnom količinom iona i elektrona koji ga čine provodljivim. Plazme koje se koriste u spektrokemijskim analizama su elektroneutralne, tj. svaki pozitivni naboj iona u ravnoteži je sa slobodnim elektronima. Većina pozitivnih iona je jediničnog naboja i s nekoliko negativnih iona i elektrona daje elektroneutralnu plazmu u svakoj jedinici njene zapremine. Temperatura koja se stvara u plazmi ICP je približna temperaturi na površini Sunca (oko 6000 °C) i to je temperatura dovoljna da se aerosol prevede u ione⁹⁴. Uz dovoljno argona, plazma postiže ravnotežu i ostaje na konstantnoj temperaturi od oko 6000 °C za vrijeme trajanja analiza. Aerosol proizveden putem raspršivača (nebulizatora) ulazi u ovu visokotemperaturnu plazmu, gdje se najprije suši u krutinu, a zatim zagrijava do plina, što se naziva atomizacija. Ovi atomi će nastaviti putovati kroz plazmu, apsorbirajući energiju dok se ne ioniziraju. Ionizacija se odvija tako da pokretna faza i analit ulaze u ionizator kroz kapilaru (iglu), koja ujedno predstavlja elektrodu pod visokim naponom (2–5 kV)^{95,96}. Na vršku igle formira se maglica sastavljena od niza kapljica otapala i nešto uparenog otapala. Kolektorska elektroda privlači tako nabijene kapljice i daje im dodatno ubrzanje. Kako otapalo otparava pod utjecajem struje plina, temperature i električnog potencijala (ioni unutar otapala pokušavaju doći na površinu), tako se kapljice smanjuju. Nakon što se dovoljno smanje da se svi mogući ioni nalaze na površini kapljica, sile kulonskog odbijanja postaju veće od sila napetosti površine i kapljice se otparavaju ili se razbiju na manje kapljice. Analit kristalizira ili prelazi u plinsku fazu. Ioni analita u trenutku napuštanja površine nisu u potpunosti bez otapala, oko njih se, naime, stvara sfera uparenog otapala. Nakon otparavanja kapljica, otvor iza kojeg je visoki

vakuum i analizator privlači tako formirane molekulske ione. Ti novo formirani ioni zatim putuju iz plazme i dolaze do međuspoja⁹⁷.

Analizator je dio spektrometra masa koji razdvaja ione različitog omjera mase i naboja (m/z). Različiti analizatori zahtijevaju različite ionizacijske izvore i različite detektore iona. Kvadrupol (Slika 5.) je jedan od najzastupljenijih analizatora, a sastoji se od četiri elektrode koje su dijagonalno električki povezane. Jedan par elektroda pri tome ima pozitivni, a drugi negativni polaritet. Dodatno su ti parovi još spojeni s radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje koji je za 180 stupnjeva izvan faze. Ioni koji ulaze u analizator imaju različite vrijednosti m/z i u ovisnosti o primijenjenoj struji i polju mogu zadržati stabilnu putanju i proći analizator ili dotaknuti elektrode i postati neutralne molekule. Kvadrupol ima ulogu masenog filtra koji razdvaja ione na osnovu različitih omjera mase i naboja (m/z)⁹⁸.



Slika 5. Presjek kvadrupola⁹⁹.

Oktopol (*Octopole Reaction Cell, ORC*) predstavlja dodatak kvadrupolu (nije neophodan dio uređaja) i ima ulogu u povećanju transmisije iona i sniženju granice detekcije. Detektor broji pojedinačne ione koji prođu kroz kvadrupol. Ioni napuštaju spektrometar masa i udaraju o površinu detektora, uzrokujući mjerljivi električni signal. Softverski sistem omogućuje kontrolu svih dijelova instrumenata koje je potrebno kontrolirati tijekom rada i obrade finalnih rezultata¹⁰⁰.

2.3.2.2. Primjena ICP-MS za određivanje ukupnog arsena i specija arsena

ICP-MS je visoko osjetljiva tehnika koja se široko koristi za detekciju tragova elemenata u vodenim uzorcima. Međutim, drugi sastavni dijelovi matriksa mogu rezultirati visokim ili niskim rezultatima za određeni element. Za određivanje arsena, analiza ICP-MS zahtijeva veliku pozornost u razmatranju matriksa kao što su koncentracija kiseline, interferencija klorida na m/z 75 i efekt sadržaja ugljika^{101,102}. Promjena koncentracije kiseline utječe na lokalnu temperaturu plazme, što utječe na kinetičku energiju iona i učinkovitost prijenosa iz plazme u MS detektor. Povećanjem koncentracije kiseline smanjuje se temperatura u plazmi, što smanjuje učinkovitost ionizacije datog analita¹⁰³. Osobito je ispitana dušična kiselina s obzirom na njezino isparavanje s površine vodenih kapljica, relativnog doprinosa ukupnoj energiji sustava i doprinosa produkata razgradnje učinkovitom prijenosu energije na središnji kanal plazme. Učinak koncentracije klorida na signal arsena dobro je istražen. Argon-kloridni dimer $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ nastaje iz argona, plina nosača u plazmi i visokih koncentracija klorida u matriksu uzorka. Dimer uzrokuje interferenciju kod m/z 75, što potencijalno rezultira previsokim vrijednostima signala.

Vrijednosti signala također mogu postati visoke s uvođenjem ugljika u plazmu. Poznato je da ugljik povećava intenzitet ionizacije elemenata u plazmi prema reducirajućoj masi. Iako je točan mehanizam nepoznat, nekoliko studija je pokazalo da postoji prijenos naboja iz C^+ specije na atom analita, što rezultira povećanjem signala za analit¹⁰⁴. Usporedba postojećih analitičkih metoda za određivanje ukupnog arsena prikazana je u Tablici 3. Metode s ICP-MS detekcijom rezultiraju širokim dinamičkim rasponom metode u usporedbi s drugim metodama kao što su hidridna tehnika-fluorescencijska spektrometrija (HG-AFS) i hidridna tehnika-atomska apsorpcijska spektrometrija (HG-AAS)¹¹².

Tablica 3. Analitičke metode za određivanje arsena u različitim okolišnim i biološkim uzorcima.

Uzorak	Metoda	Arsen, specija	Referenca
Riža	HPLC–ICP–MS	As ukupni	105
Morska voda	GC–AED	As anorganski	106
Vino		DMA	
Pivo		MMA	
Tlo, standardni dodatak	HPLC–ICP–MS	As(III), As(V), DMA, MMA	107
Riblje ulje	HPLC–ICP–MS	Arsenolipidi	108
Humani urin	HPLC–ICP–MS	As(III), As(V), DMA, MMA, AsB, AsC	109
Arsin, gas	ICP–DRC–MS	Arsin, plin	110
NIES Humani urin	Protočno ubrizgavanje	As ukupni	111
Školjke, tkivo ribe, jastog	ICP–MS		

2.3.3. Elektrokemijske metode analize

Elektroanalitičke metode čine skupinu analitičkih metoda kod kojih se podatak o koncentraciji, aktivitetu ili drugim termodinamičkim svojstvima određivane molekulske specije dobiva u ovisnosti o električnom naponu, struji ili naboju. Prema signalu pobude, čija je posljedica odvijanje elektrokemijske reakcije na radnoj elektrodi i mjerenoj varijabli iz koje se dobiva željeni analitički ili drugi podatak o ispitivanoj otopini, dijele se na: potenciometriju, voltometriju, kronoamperometriju, elektrogravimetriju, kronopotenciometriju, kulometriju i konduktometriju¹¹³. Razvojem tehnika i instrumenata za proučavanje elektrokemijskih reakcija i reakcija na površini elektrode dolazi do velikog napretka u razumijevanju elektrokemijskih procesa^{114,115}.

Za ćeliju s dvije elektrode, ukupnu reakciju čine dvije polureakcije koje uključuju procese na elektrodama. Obično se jedan od ovih procesa odvija na radnoj (u dinamičkoj elektrokemiji) ili na indikatorskoj elektrodi (u potenciometriji). Druga elektroda, koja se naziva referentna elektroda, služi da osigura konstantni potencijal koji se uzima kao referentni potencijal i prema kojem se mjeri potencijal radne elektrode. Danas se najčešće primjenjuje srebro/srebroklorid

elektroda kao referentna elektroda pri potenciometrijskim mjerenjima. Srebro/srebroklorid elektroda se shematski označava $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}$ i sastoji se od srebrne žice uronjene u otopinu AgCl (presvučene s AgCl), a kao elektrolit koristi se zasićena otopina KCl . Suprotno potenciometriji, gdje se mjeri potencijal elektroda (bez prolaska struje), u dinamičkoj elektrokemiji potencijal radnih elektroda u većini slučajeva kontroliran je prema referentnoj elektrodi i mjeri se rezultirajuća struja^{113,115}.

2.3.3.1. Voltometrija

Voltometrija obuhvaća skupinu elektroanalitičkih tehnika koje su se počele razvijati otkrićem polarografije 1922. češkog kemičara Jaroslava Heyrovskog, dobitnika Nobelove nagrade 1959. Voltometrija se temelji na mjerenju struje radne elektrode nastale kontinuiranim mijenjanjem njezinog potencijala. Prikaže li se ovisnost struje o potencijalu, dobiva se voltamogram. Najčešće primjenjivane voltometrijske metode su: ciklična, diferencijalna pulsna, pravokutnovalna i metoda otapanja prethodno nataloženog analita (engl. *Stripping voltammetry*), kao i različite vrste polarografije koje se od ostalih voltometrijskih tehnika razlikuju po tome što se kao radna mikroelektroda koristi kapajuća živina elektroda¹¹³.

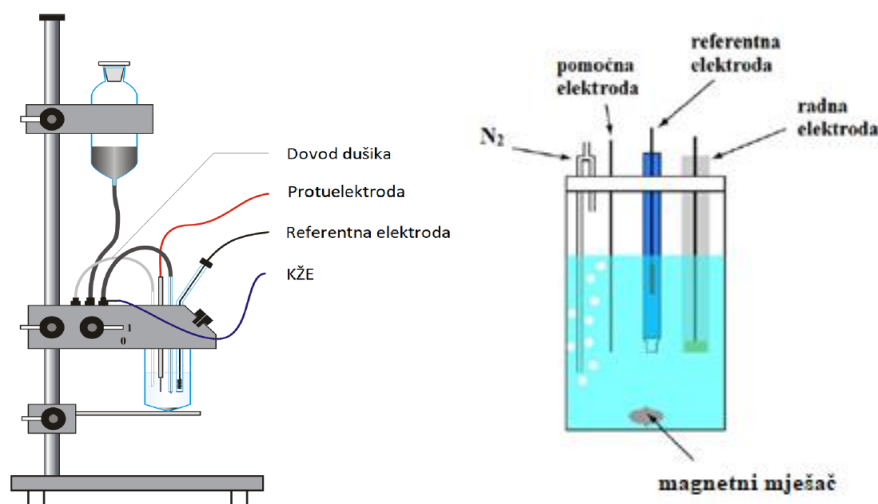
Voltometrijske metode primjenjuju se u kvantitativnoj analizi organskih i anorganskih tvari u vodenim i nevodenim medijima, za određivanje redoks potencijala, istraživanje kinetike i mehanizma redoks reakcija, kao i za elektrokemijsku detekciju eluiranih analita u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC). Osnovne su jedinice modernog voltometrijskog instrumenta, osim računala, potenciostat i elektrokemijski članak. Uloga je potenciostata primijeniti određeni potencijal i izmjeriti jakost struje. Elektrokemijski članak služi kao nosač otopine analita u koju su uronjene elektrode. U otopinu analita može se dodati otopina elektrolita koja povećava vodljivost. U voltometrijskim mjerenjima koriste se tri elektrode: radna elektroda, pomoćna ili protuelektroda i referentna elektroda. Potencijal se mjeri između radne i referentne elektrode, a struja između radne i protuelektrode. U voltometriji se koriste elektrode koje konstantnom površinom osiguravaju reproducibilnost mjerenja^{113,115}.

Na radnoj elektrodi se odvija redoks reakcija. Reakcije redukcije najčešće se proučavaju na kapajućoj ili statičnoj živinoj elektrodi, visećoj živinoj kapi ili živinoj film elektrodi. Krute elektrode rabe se za oksidacijske procese. Postoji više vrsta krutih elektroda, npr. staklasta ugljikova elektroda, grafitna elektroda impregnirana voskom, ugljikova, platinska, zlatna elektroda, itd. Općenito, radnu elektrodu u voltometriji karakterizira mala površina, koja

pospješuje polarizaciju. Drugi je razlog za primjenu elektroda malih površina smanjenje razgradnje analita elektrolizom. Izbor radne elektrode veoma je važan za osjetljivost i reproducibilnost mjerenja¹¹⁶.

2.3.3.2. Klasična polarografija

Polarografija s jednosmjernom strujom (engl. *Direct current*, DC), odnosno klasična polarografija, je elektrokemijska tehnika kod koje se sporom promjenom potencijala polarizira elektroda male površine, tzv. radna elektroda. U klasičnoj polarografiji kao radna elektroda se obično koristi tzv. kapajuća živina elektroda (engl. *Dropping mercury electrode*, DME). Ona se sastoji od staklene kapilare vrlo malog unutarnjeg promjera, povezane s rezervoarom s živom, dok se na donjem kraju, koji je uronjen u otopinu, formira kap žive. Kap raste nekoliko sekundi, nakon čega se otkida i počinje formiranje nove kapi. Ta uvijek svježa kap žive na otvoru kapilare je radna elektroda. Da bi strujno kolo bilo zatvoreno u otopinu se uranja i pomoćna elektroda. Da bi polarizacija pomoćne elektrode bila minimalna, gustoća struje na njoj je manja nego na površini radne elektrode te joj je stoga površina višestruko veća u odnosu na radnu elektrodu. Pomoćna elektroda je najčešće od inertnog materijala, platine, zlata ili staklastog ugljika (Slika 6.).



Slika 6. Shematski prikazi eksperimentalnog sustava i elektrokemijske ćelije za polarografiju¹¹⁷.

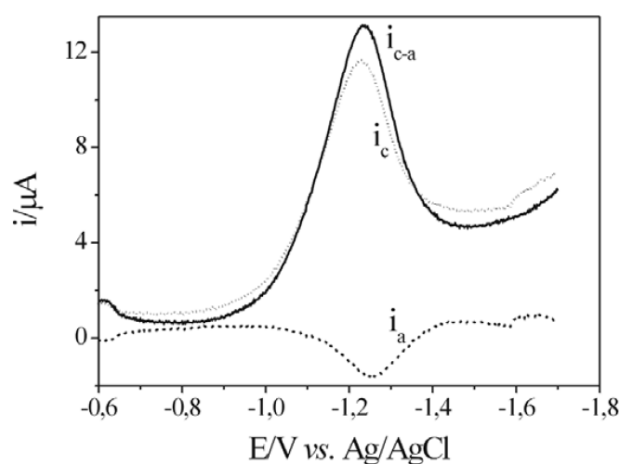
Treća elektroda u elektroanalitičkoj ćeliji je referentna ili standardna elektroda s poznatom vrijednošću potencijala¹¹⁸. Ona se s radnom elektrodom povezuje strujnim krugom velikog otpora s ciljem da kroz taj krug praktično ne protiče struja i služi za davanje razlike potencijala

između radne i referentne elektrode. Iz te razlike potencijala i poznate vrijednosti potencijala referentne elektrode određuje se potencijal radne elektrode. Kada se sporom promjenom potencijala polarizacije radna elektroda dovede na potencijal na kojem se neka kemijska vrsta (ion ili molekula prisutan u otopini) oksidira ili reducira, ta elektrokemijska reakcija dovodi do depolarizacije radne elektrode i do protoka električne struje između radne i pomoćne elektrode. Tijekom polarografske analize snima se ovisnost jačine struje od potencijala radne elektrode, a dobijena krivulja se naziva iE krivulja, odnosno polarogram. Svaka elektroaktivna specija koja reagira na radnoj elektrodi daje na polarogramu tzv. polarografski val^{116,118}. Polarografski val ima dvije važne karakteristike: visinu, koja se zove granična difuzijska struja i označena je s i_d koja je proporcionalna koncentraciji specije koja reagira na elektrodi i poluvalni potencijal $E_{1/2}$. Poluvalni potencijal je potencijal na kome difuzijska struja dostiže polovinu svoje maksimalne (granične) vrijednosti. Vrijednost poluvalnog potencijala je karakteristična za određenu kemijsku vrstu. Poluvalni potencijal se koristi za kvalitativnu, a vrijednost granične struje (visina vala) za kvantitativnu analizu¹¹⁶.

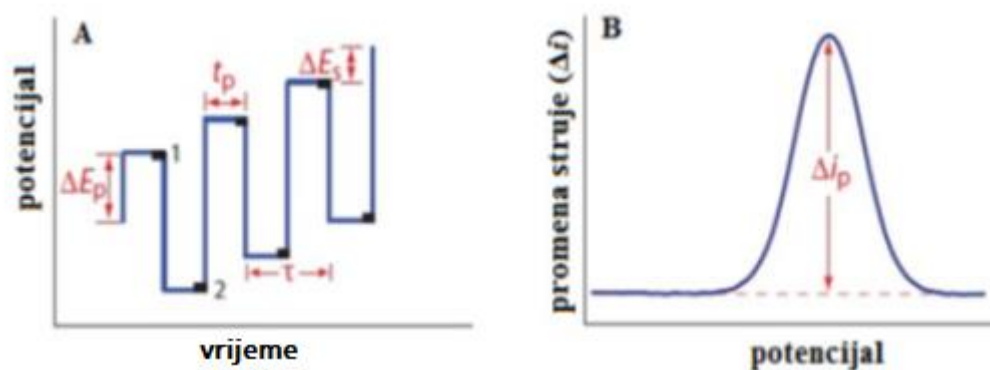
2.3.3.3. Pravokutnovalna voltometrija (SWV)

Najveća je prednost pravokutnovalne voltetrije njezina velika brzina. Frekvencije od 1 do 100 ciklusa u sekundi dopuštaju upotrebu ekstremno brzih promjena potencijala. Vrijeme analize time se skraćuje te cijeli voltamogram može biti snimljen za nekoliko sekundi, dok je kod diferencijalne pulsne voltetrije potrebno nekoliko minuta.

Signal pobude dobiva se kad se niz pravokutnovalnih pulseva doda na stupnjeviti signal potencijala^{118,119}. Struja se mjeri dva puta tijekom svakog ciklusa, jednom na početku polaznoga pulsa i drugi put na kraju pulsa suprotnoga smjera. Za reverzibilnu reakciju redukcije veličina pulsa dovoljna je da se oksidacija produkta stvorenog na polaznom pulsu dogodi za vrijeme pulsa suprotnoga smjera, stoga se tehnika može primjenjivati i za istraživanje mehanizama prijenosa elektrona. Polazni puls producira katodnu struju, a povratni puls stvara anodnu struju. Razlika tih struja proporcionalna je koncentraciji analita u otopini, a potencijal maksimuma može se upotrijebiti za potvrdu identiteta analita (Slika 7. i 8.). Pravokutnovalna voltetrija je brza, jednostavna i točna metoda određivanja¹²⁰.



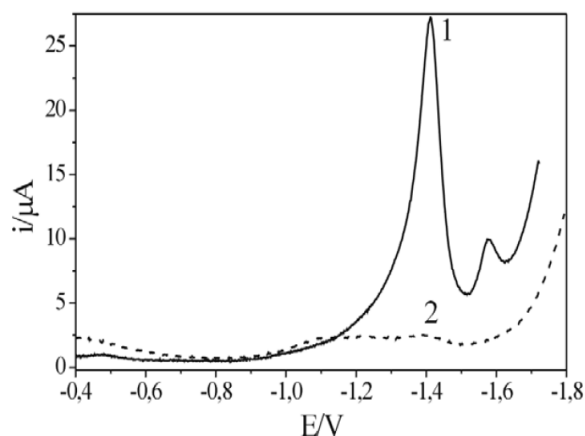
Slika 7. Pravokutnovalni voltamogram pravastatina na elektrodi s visećom živinom kapi u Britton–Robinson puferu pri pH 7; frekvencija pulsa 400 Hz¹¹⁹.



Slika 8. Oblik ekscitacijskog vala za SWV (A) i izgled voltamograma (B). Vrijeme trajanja jednog ciklusa, τ ; vrijeme trajanja pulsa, t_p ; potencijal pulsa, ΔE_p ; promjena potencijala po ciklusu, ΔE_s ; vrijeme mjerenja/uzorkovanja struje, 1 i 2; razlika intenziteta struje, Δi_p ¹¹⁷.

2.3.3.4. Voltometrija anodnog otapanja

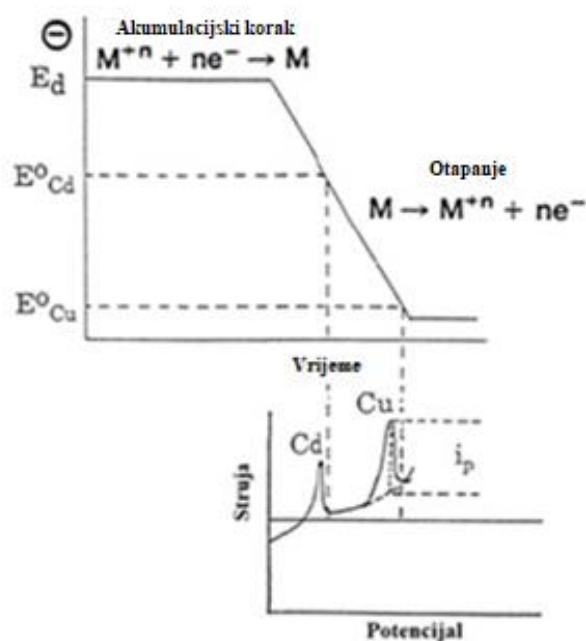
U analizi uzoraka s koncentracijom analita ispod granice detekcije primijenjene metode, često je potrebno upotrijebiti neku vrstu prethodnog takoženja (predkoncentriranja) analita prije samog određivanja (Slika 9.). Voltometrija anodnog otapanja (SV) uključuje elektrolitičko ili adsorpcijsko predkoncentriranje analita na površini elektrode prije voltametrijskog mjerenja¹²¹.



Slika 9. Pravokutnovalni voltamogram simvastatina na elektrodi s visećom živinom kapi u fosfatnom puferu koncentracije $c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pri pH 7 nakon (1) i prije (2) akumulacije od 30 sekundi¹¹⁹.

Analit se istaloži na radnoj elektrodi pri određenom potencijalu iz otopine koja se miješa. Nakon određenoga vremena (vrijeme akumulacije), miješanje se zaustavlja te se istaloženi analit određuje voltametrijski. Analit se otapa s elektrode (engl. *stripping*) primjenom promjene potencijala. Mjerenje, odnosno promjena potencijala, može se napraviti primjenom diferencijalne pulsne ili pravokutnovalne voltametrije. Ovisno o promjeni potencijala, istaloženi analit se oksidira (voltametrija anodnog otapanja, ASV) ili reducira (voltametrija katodnog otapanja, CSV) natrag u otopinu, a struja snimljena tijekom ovoga koraka proporcionalna je koncentraciji analita na elektrodi. Koncentracija analita na površini elektrode veća je nego u otopini te se mogu odrediti vrlo niske koncentracije (10^{-8} do $10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$). U elektrokemiji adsorpcija je čvrsto vezivanje molekula ili iona iz otopine na površini radne elektrode pri čemu se stvara monomolekularni sloj adsorbiranih molekula. Voltametrijski odziv izravno ovisi o količini adsorbiranih čestica (Slika 9.)^{121,122}. Tijekom akumulacije treba primijeniti optimalne uvjete za adsorpciju analita da bi se postigla maksimalna osjetljivost metode. Visina strujnoga vrha ovisi o mnogo čimbenika, kao što su vrsta i površina elektrode, vrijeme i potencijal akumulacije, svojstva analita, otapalo, ionska jakost, pH i temperatura¹¹³.

Voltametrija anodnog otapanja najčešće se primjenjuje za određivanje tragova metala. Kod ASV tehnike metal se na površini radne elektrode predkoncentrira elektrokemijskom redukcijom u toku određenog vremenskog perioda uz miješanje nakon čega se vrši otapanje odnosno određivanje ispitivanog metala procesom elektrokemijske oksidacije u mirnom otapalu (Slika 10.)^{113,116}.



Slika 10. Voltometrija anodnog otapanja. Oblik vala potencijal–vrijeme i rezultirajući voltamogram. Metalni ion, M^{+n} ; broj razmjenjenih elektrona, n ; standardni redoks potencijal bakra, $E^0_{(Cu)}$; standardni redoks potencijal kadmijuma, $E^0_{(Cd)}$; potencijal depozicije, E_d ; intenzitet maksimuma pika, i_p ¹¹³.

2.3.3.5. Određivanje arsena pomoću voltametrijske metode anodnog otapanja

As(V) je elektrokemijski neaktivan. Stoga, da bi se identificirao i kvantificirao, mora biti reduciran *in situ* do As(III) s pomoću nascentnog vodika. Zajedno s As(III) prisutnim u uzorku, As(V) je elektrokemijski reduciran do As(0) u trenutku taloženja na zlatnu elektrodu. U koraku određivanja, akumulirani As(0) reoksidira se u As(III) stvarajući analitički signal. Potencijal taloženja koji se koristi za akumuliranje As(III) je manje negativan od onog koji se koristi za određivanje ukupnog arsena. Pri datoj vrijednosti potencijala samo su As(III) ioni reducirani u elementarni arsen i nataloženi na zlatnu radnu elektrodu. As(V) se ne reducira ili deponira pod tim uvjetima. U koraku uklanjanja, depozicije As(0) reoksidira se u As(III), producirajući analitički signal^{123–125}.

Za određivanje ukupne koncentracije arsena, As(III)/As(V) su reducirani na površini zlatne elektrode na 1200 mV pomoću vodika u As(0), koji se koncentrira na površini elektrode. Tijekom sljedećeg koraka, prethodno koncentrirani As(0) se ponovno oksidira do As(III). Voltamogram se snima prema parametrima preporučenim u uputama za uporabu instrumenta. Prvi stupanj je korak taloženja (akumulacije analita na elektrodi) pri potencijalu od $-0,2$ V: u

ovoj fazi odvija se predkoncentracija As na elektrodi, tako da je vrijeme taloženja odabrano na temelju koncentracije As u uzorku. Potencijal se tada povećava na +0,04 V za 10 s i nakon 2 s uravnoteženja, dolazi do otapanja pomoću pulsnog diferencijalnog postupka. Za ovaj posljednji korak, početni potencijal je postavljen na +0,2 V, a krajnji potencijal na +0,3 V primjenom brzine skeniranja od 20 mV s⁻¹ i amplitude impulsa 50 mV. Za svaki uzorak i dodani standard mjerenje se ponavlja dva puta (više nije potrebno ponavljati jer je signal vrlo reproducibilan). ASV metoda je primjer ultra osjetljive analize; svi korišteni reagensi moraju imati najviši mogući stupanj čistoće i bez arsena. Štoviše, ASV je vrlo osjetljiva na prisutnost organske tvari, koje se moraju razoriti UV digestijom uzorka za voltametrijsku analizu¹²⁴⁻¹²⁶.

2.3.3.6. Voltametrijska senzorska elektroda s zlatnom mikro žicom

Voltametrijska senzorska elektroda s zlatnom mikro žicom komercijalno dostupna pod nazivom scTRACE Gold (Metrohm) sadrži sve tri elektrode potrebne za voltametrijsko određivanje. Radna elektroda je zlatna mikro žica. Referentna i pomoćna elektroda su printane elektrode (engl. *screen printed*). Za razliku od drugih elektroda u čvrstom stanju scTRACE Gold ne treba opsežna kondicioniranja prije upotrebe. Novu elektrodu je potrebno aktivirati samo jedan put što traje oko 10 minuta i elektroda je spremna za prvo određivanje. Zbog svoje konstrukcije scTRACE Gold ne treba posebno održavanje. Može se elektrokemijski očistiti, dok mehaničko čišćenje nije potrebno niti moguće. Čišćenje se može napraviti prije, poslije i u toku serija određivanja. Ali čišćenje bi se trebalo provoditi samo ako je neophodno, npr. kada je pozadinska struja (engl. *background current*) neuobičajeno visoka ili kada su pikovi neuobičajene visine i oblika, obzirom da se tako skraćuje „život“ elektrode. Kao i kod svake druge elektrode, učinkovitost scTRACE Gold se smanjuje s brojem određivanja. Signali se smanjuju i krivulje postaju manje reproducibilne. Tada je vrijeme za zamjenu elektrode, ako se ništa ne može poboljšati elektrokemijskim čišćenjem. Prije pohranjivanja elektrode, potrebno ju je temeljito isprati ultra čistom vodom. Da bi se ponovno koristila, nakon što se nije koristila neko vrijeme, često je dovoljno snimiti slijepu probu primjenom određene metode samo zamjenom uzorka ultra čistom vodom¹²⁷⁻¹²⁹.

Kod korištenja metode voltametrije anodnog otapanja s scTRACE Gold elektrodom za određivanje ukupnog arsena As(tot), oksidacijsko stanje As(III) je osjetljivije od As(V). Kada su obje specije prisutne u uzorku, As(III) se kemijski oksidira u As(V) dodavanjem otopine KMnO₄ kako bi se osigurali ispravni rezultati. Oksidacija se događa spontano nakon dodavanja

KMnO₄ tako da nije potrebno čekati neko vrijeme da se odvija reakcija. Dodavanje KMnO₄ nije potrebno ako je sigurno da je samo As(V) prisutan u uzorku¹²⁹.

2.3.3.7. Određivanje specija arsena pomoću scTRACE Gold elektrode

Za određivanje As(III) potencijal taloženja ne bi trebao biti negativniji od -0,6 V, inače je i As(V) djelomično smanjen i deponiran. Za određivanje As(V) potreban je negativniji potencijal. Kada se ovaj potencijal primijeni na radne elektrode mogu se promatrati mjehurići plina. Nastali vodik nastao na ovom potencijalu je neophodan da reducira As(V) na As(III). Potencijal 1 mora biti što je moguće negativniji kako bi se generirala dovoljna količina nastalog vodika za redukciju As(V). S druge strane, previše negativan potencijal rezultira lošijom reproduktivnošću signala i smanjenim vijekom trajanja elektrode.

Potencijal 2 (ili „Potencijal nanošenja“ npr. u slučaju Metrohm, 797 VA Computrace) koristi se za čišćenje. Kada se taj potencijal primijeni, drugi metali, koji se također talože tijekom primjene potencijala 1, otapaju se s radne elektrode. Potencijal 2 treba odabrati što je moguće bliže signalu arsena. Ovisno o matriksu može se promijeniti točan položaj signala arsena. Stoga treba paziti da se arsen ne „skine“ tijekom ovog koraka. Odlaganje se vrši kada se primjenjuje Potencijal 1 (ili „Potencijal čišćenja“ u slučaju 797 VA Computrace)^{127–129}. Obično se podzemne vode, pitka voda i mineralna voda mogu izravno analizirati metodom voltametrije anodnog otapanja s scTRACE Gold elektrodom. Interferencije, kao što su veće koncentracije bakra, mogu se ukloniti pomoću SPE patrone za izmjenu kationa. Voda koja sadrži nisku i srednju razinu organske kontaminacije tretira se s UV digestorom. Interferencije kod određivanja As s scTRACE Gold elektrodom mogu biti različite.

a) Interferencija organskih tvari;

Ispitan je utjecaj organske tvari na određivanje arsena koncentracija γ (As(III)) = 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ i γ (As(V)) = 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Interferencija jednako utječe na As(III) i As(V).

- EDTA – Ne interferira. Testirano je do koncentracije gdje se EDTA počinje taložiti (približno 0,03 mol L⁻¹).
- Triton X-100 – 25 mg L⁻¹ smanjuju visinu signala As za približno 35 %. Organske smetnje mogu se ukloniti prilikom pripreme uzorka, za uzorke s slabim i umjerenim onečišćenjem. Kada se određuje As(III), nije moguće eliminirati organske smetnje digestijom. Digestija bi utjecala na oksidacijsko stanje arsena¹²⁹.

b) Interferencija aniona

Ispitan je utjecaj aniona na određivanje arsena koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$ i $\gamma(\text{As(V)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$.

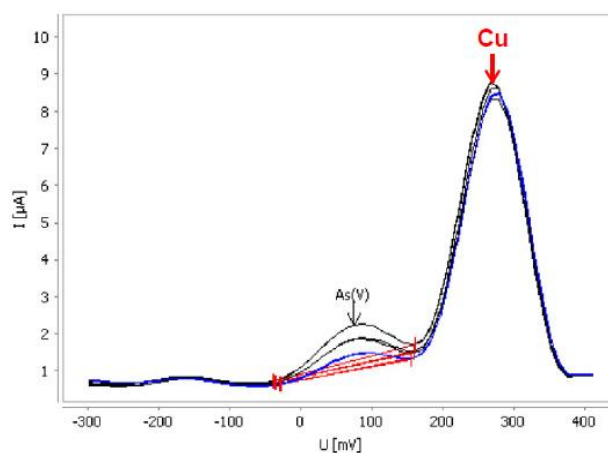
- I^- – Zbog oksidacijskih sposobnosti jodida, čak i tragovi čine određivanje As(III) nemogućim. Za određivanje As(V) cijela se krivulja pomiče prema višim strujama. U prisutnosti $c(\text{I}^-) = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ visina signala As(V) je smanjena za oko 30 %.
- Cl^- – Koncentracija klorida utječe na referentni potencijal. Stoga se potencijal čišćenja i taloženja mora prilagoditi za uzorke s većom koncentracijom klorida kako se ne bi smanjila osjetljivost. Za morsku vodu ($c(\text{Cl}^-) = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$), pomak potencijala je približno +100 mV. Nadalje, klorid olakšava oksidaciju zlata. Stoga se pozitivni potencijal u ciklusima kondicioniranja mora prilagoditi za veće koncentracije klorida. Za morsku vodu koristi se +0,85 V umjesto +1,0 V.
- NO_2^- – U prisutnosti $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ visina signala As je smanjena za cca. 40 %¹²⁹.

c) Interferencija kationa

Ispitan je utjecaj kationa na određivanje arsena koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$ i $\gamma(\text{As(V)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$.

- Al – Ne interferira.
- Bi – Signal na +0,15 V, preklapa se s stražnjim dijelom signala arsena. U višku Bi dolazi do gubitka signala arsena.
- Ca – Ne interferira.
- Cd – Pik na -0,15 V, pojavljuje se kao dodatni pik na prednjoj strani signala arsena. Povećanje koncentracije Cd 15 puta ne pokazuje utjecaj na visinu signala arsena.
- Co – Ne utječe na određivanje As(III). Ne ometa određivanje As(V) pri povećanju koncentracije Co do 15 puta. S povećanjem koncentracije do 1000 puta signala As se smanjuje za 50 %.
- Cr(VI) – Oksidira As(III) do As(V), stoga se ne može očekivati prisustvo As(III) kada je prisutan Cr(VI). Ne utječe na određivanje As(V) do povećanja koncentracije do 100 puta. S 1000 puta većom koncentracijom, visina signala As se smanjuje za 30 % i pojavljuje se dodatni maksimum na +0.25 V.
- Cu – Pik na +0.25 V ne ometa analizu do povećanja koncentracije do 5 puta. Kod većeg viška Cu signal se preklapa sa stražnjim dijelom signala As, a osjetljivost se smanjuje.

S viškom Cu 20 puta, signal As nestaje u Cu signalu. Čest problem u analizi vode iz vodovoda i podzemnih voda je prisutnost značajnih količina bakra. Višak Cu može uzrokovati lažne niske vrijednosti očitavanja za arsen ili čak može potpuno sakriti signal As (Slika 11.).



Slika 11. Interferencija Cu u uzorku podzemne vode¹³⁶.

- Fe(III) – Ne interferira. Sa suviškom Fe od 100 puta dolazi do formiranja žutog Fe(III) –tri–citratnog kompleksa s elektrolitom i pojavom maksimuma na +0.4 V.
- Hg – Nema interferencije do povećanja koncentracije Hg do 10 puta. Sa suviškom od 100 puta dolazi do formiranja amalgama radne elektrode što onemogućuje određivanje arsena.
- Mg – Ne interferira.
- Mn – Ne ometa određivanje do povećanja koncentracije Mn do 100 puta. Sa suviškom od 4000 puta dolazi do deformacije signala As i smanjenja osjetljivosti. Pik As je cca. 30 % manje.
- Ni – Ne interferira. Blago se smanjuje osjetljivost signala As. Sa suviškom Ni od 4000 puta pojavljuje se pik na +0.25 V.
- Pb – Signal na –0,15 V, nema interferencije ako je koncentracija jednaka. Ako je veća koncentracija, preklapa se s prednjom dijelom signala As. S 10 puta većom koncentracijom dolazi do smanjenja osjetljivosti, a s 25 puta većom koncentracijom signal As smanjuje se za cca. 60 %.
- Sb(III) – Pik na 0 V s istom osjetljivošću kao arsen.

- Sb(V) – Nema interferencije do suviška koncentracije od 1000 puta. Veće koncentracije Sb(V) pokazuju pik na 0 V koji se pojavljuje kao dodatni signal na signalu As.
- Se(IV) – Ne interferira ako je jednaka koncentracija. Ali već 5 puta veća koncentracija uzrokuje deoblikciju signala As i gubitak osjetljivosti. Signal As je oko 30 % manji.
- Se(VI) – Ne interferira do 1000 puta veće koncentracije. Veće koncentracije uzrokuju deformaciju signala As i gubitak osjetljivosti.
- Sn(IV) – Ne interferira do 10 puta veće koncentracije. 100–struki suvišak uzrokuje deformaciju signala As i maksimum na $-0,2$ V.
- Zn – Ne utječe na određivanje As(III). Ne utječe na određivanje As(V) do 10 puta veće koncentracije. Veće koncentracije ometaju formiranje nastalog vodika što rezultira smanjenom visinom signala. Sa suviškom koncentracije od 40 puta, signal As je približno 50 % manje¹²⁹.

2.4. Nanomaterijali i interakcije s arsenom u okolišu

2.4.1. Primjena nanomaterijala Fe

Nanomaterijali (NM) na bazi Fe primjenjuje se zbog svojih jedinstvenih karakteristika, kao što su mala veličina čestica, površinska aktivnost i magnetska svojstva. Pored nekih posebnih primjena, npr. u magnetskim britvama i tintama, pohrani podataka i ferrofluidima, dva najviše istaknuta područja primjene NM na bazi Fe jesu u medicini i sanaciji okoliša¹³⁰. Ovisno o kemijskim svojstvima kontaminanta, identificirani su različiti mogući putovi uklanjanja onečišćenja, uključujući sorpciju, kompleksiranje, površinski posredovanu kemijsku redukciju¹³¹. Mnogi su autori pisali da je NM na bazi Fe učinkovit za uklanjanje ili razgradnju širokog spektra kemijskih kontaminanata okoliša. Zbog svoje niske toksičnosti (u usporedbi s drugim tvarima, npr. reaktivnim kemijskim oksidansima) i učinkovitosti u odnosu na širok spektar zagađivača, NM Fe se sve više primjenjuje u sanaciji okoliša. Proizvodi korozije mogu biti Fe hidroksidi ili oksidi, koji također mogu utjecati na zadržavanje kontaminanata, produkte transformacije i njihovu koloidnu stabilnost. Budući da su Fe oksidi dominantni oblik NM na bazi Fe u prirodnim okruženjima, fokus je istraživanja na ekološki relevantnijim superparamagnetskim nanočesticama željeznog oksida (engl. *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles*, SPION)¹³².

Primjenom NM Fe u svrhu sanacije okoliša tone materijala nanočestica otpuštaju se u okoliš s nepoznatim rizicima za organizme. Svojstva koja čine NM Fe korisnim za primjenu u okolišu, posebno njihova mala veličina i njihova visoka redoks reaktivnost, također ih čine potencijalno štetnima za organizme, jer može doći do njihove interakcije s drugim tvarima, te im time povećati toksičnost¹³³. Njihovi potencijalni ekološki rizici *in situ* uglavnom su nepoznati¹³⁴. Većina studija usredotočena je na *in vitro* ispitivanje toksičnosti NM Fe¹³⁵. Smatra se da su prevladavajući mehanizmi za stanično oštećenje rezultat redukcije Fe, što vodi stvaranju reaktivnih vrsta kisika (engl. *Reactive oxygen species*, ROS)¹³³. Superparamagnetske nanočestice Fe₃O₄ oksida visoko su citotoksične i ciljaju stanice raka s visokom specifičnošću. No mehanizam kojim SPION inducira citotoksičnost specifičnu za stanice raka ostaje nejasan. Željezni oksidi uobičajeni su spojevi koji su široko rasprostranjeni u prirodi i mogu se lako sintetizirati u laboratoriju. Magnetski oksidi Fe se upotrebljavaju kao kontrastno sredstvo za *in vitro* dijagnostiku gotovo pola stoljeća^{136–138}. U proteklom desetljeću intenzivno se razvijala sinteza magnetskih SPION-a, ne samo zbog svog temeljnog znanstvenog interesa, već i zbog mnogih tehnoloških primjena, poput ciljane dostave lijekova, snimanja magnetskom rezonancijom (engl. *Magnetic resonance imaging*, MRI), bioseparacije i biosenzibilizacije^{139–142}. Veliku pozornost osobito su privukle bioaplikacije na temelju magnetskih nanočestica (engl. *Nanoparticles*, NP) jer pružaju jedinstvene prednosti u odnosu na ostale materijale. Na primjer, magnetske SPION-e je jeftino proizvesti, fizički i kemijski su stabilni, biokompatibilni su i ekološki sigurni¹⁴³. Iako SPION-i pokazuju mnoga jedinstvena svojstva koja pružaju različite prednosti i mogućnosti u biomedicinskoj primjeni, potrebno je više toksikoloških istraživanja na sintetiziranim SPION-ima, a kriteriji za procjenu toksičnosti moraju biti jasno definirani^{144,145}.

2.5. Ekotoksikologija arsena

2.5.1. Ekotoksikološki učinci arsena

Veliki broj ljudi kronično je izložen arsenu širom svijeta. Izloženost arsenu ostvaruje se oralnim putem (gutanjem), udisanjem, kontaktom preko kože, te donekle parenteralnim putem. Za većinu ljudi prehrana je najveći izvor izloženosti arsenu, s prosječnim unosom od oko 50 µg dnevno. Unos iz zraka, vode i tla obično je mnogo manji, ali izloženost iz tih medija može postati značajna u područjima onečišćenim arsenom¹⁴⁶. Kronično izlaganje arsenu utječe na gastrointestinalni trakt, krvožilni sustav, kožu, jetru, bubrege, nervni sustav i srce.

Epidemiološka istraživanja jasno dokazuju da izloženost anorganskom arsenu povećava rizik od pojave raka¹⁴⁷. Kada je izlaganje arsenu oralno, glavni kancerogeni učinak je povećani rizik od raka kože¹⁴⁸. S izloženošću arsenu, uz rak kože, povećan je rizik od ostalih unutarnjih tumora (uglavnom jetre, bubrega, pluća i mokraćnog mjehura)¹⁴⁹. Američka agencija za zaštitu okoliša (engl. *U.S. Environmental Protection Agency*, US EPA) iznosi da je učestalost povezanosti raka kože s vodom kontaminiranom arsenom (koncentracije 290–600 $\mu\text{g L}^{-1}$) između 0,26 % i 2,14 %. Također je procjenjen rizik od razvoja raka za unos pitke vode koja sadrži 0,022, 0,0022 i 0,00022 $\mu\text{g L}^{-1}$ As ili za konzumaciju vodenih organizama koji žive u kontaminiranoj vodi koja sadrži 0,175, 0,0175 i 0,00175 $\mu\text{g L}^{-1}$ As¹⁵⁰.

U okolišu se arsen može prenositi vjetrom ili vodenom erozijom sitnih čestica, te ispuštanjem u kišnicu ili snijeg. Transport arsena u vodi ovisi o kemijskim oblicima arsena i o interakciji s drugim prisutnim materijalima¹⁵¹. Biokoncentracija arsena javlja se u vodenim organizmima, prvenstveno algama i nižim beskralješnjacima. U vodi arsen može proći kroz niz pretvorbi, uključujući reakcije oksido–redukcije, razmjenu liganda i biotransformaciju¹⁵¹. Čimbenici koji utječu na specije arsena uključuju oksido–redukcijски potencijal, pH, koncentraciju metalnih sulfida i sulfidnih iona, koncentraciju Fe, temperaturu, slanost, raspodjelu i sastav biote¹⁵². Analiza toksičnih učinaka arsena je zahtjevna i složena jer arsen može postojati u više različitih oblika ili oksidacijskih stanja, te u mnogim različitim anorganskim i organskim spojevima. U nekoliko je studija navedeno da toksičnost arsena ovisi o dozi, učestalosti i trajanju izloženosti, biološkoj vrsti, dobi i spolu, kao i o pojedinačnoj osjetljivosti, genetskim i prehrambenim čimbenicima^{153–155}.

2.5.2. Ekotoksikološka ispitivanja arsena

U prirodnim staništima, organizmi se obično istodobno izlažu različitim onečišćivačima okoliša. Biološki učinci koji proizlaze iz takvog izlaganja mogu biti znatno različiti od onih induciranih izlaganjem svakom od pojedinačnih onečišćivača zbog toksikoloških interakcija. Zooplankton je jedna od skupina organizama izrazito osjetljivih na toksične tvari. Budući da ovi organizmi zauzimaju središnji položaj u hranidbenom lancu, najčešće se koriste u ekotoksikološkim testovima¹⁵⁶. Dafnije su vodeni organizmi koji se često koriste u toksikološkim studijama širom svijeta zbog njihovog brzog rasta, velike reproduktivne brzine i kratkog životnog ciklusa, te je upotreba *Daphnia* sp. kao indikatora toksičnosti dosta dobro opisana^{19,157,158}. Na toksičnost arsena mogu utjecati mnogi faktori okoliša. Na primjer,

nanomaterijali mogu apsorbirati arsen i mijenjati njegovu bioraspodjelivost u organizmima. Međutim, studije o dugoročnim učincima arsena u prisutnosti nanočestica su ograničene.

2.5.3. Testni organizam *Daphnia magna*

Daphnia magna, koja se obično naziva vodenbuha, je zooplankton koji se reproducira putem partenogeneze u optimalnim uvjetima. *Daphnia magna* prikladan je testni organizam jer je vrlo osjetljiva vrsta na toksične tvari, ima kratak životni vijek, vrlo brzo se razmnožava, lako se aklimatizira na laboratorijske uvjete, može se uzgojiti u vrlo malom prostoru i može se mjeriti toksični učinak u relativno kratkom razdoblju^{159,160}. Spada u red Cladocera i rod *Daphnia*. Rasprostranjena je širom svijeta s više od 50 vrsta i čini važnu kariku u hranidbenom lancu. Ti se organizmi hrane algama, bakterijama, gljivicama, protozoama i organskim tvarima tako što kroz svoju hranilicu filtriraju vodu. Reproductivnu zrelost normalno doseže 4 – 5 dana nakon rođenja. Životni vijek ovisi o temperaturi, a pri 20 °C dafnije obično žive oko 8 tjedana¹⁶¹.

Dafnije nastanjuju slatke vode poput jezera i močvara, ali se mogu naći i u malim (privremenim) bazenima i lokvama, kao i sporij tekućoj vodi. Koloniziraju plitke zone vodenih sustava u toplim eutrofnim zonama. Dafnije imaju važnu ulogu u mnogim slatkovodnim ekosustavima. Budući da su često prevladavajući oblik zooplanktonske biomase, dafnije su važan izvor hrane za vrste koje se hrane planktonom, igrajući tako bitnu ulogu u hranidbenoj mreži površinskih voda. Zbog svojih golemih kapaciteta filtriranja vode, dafnije mogu znatno utjecati na ravnotežne koncentracije različitih tvari u površinskim vodama (Slika 12.)²⁰.



Slika 12. Vodena buba *Daphnia magna* sp. (lijevo), funkcionalna anatomija *Daphnia* sp. (desno)¹⁶².

Upotreba *Daphnia magna* sp. u ekotoksikologiji prihvaćena je u nekoliko zemalja za praćenje sustava za pročišćavanje otpadnih voda, kako bi se uspostavili kriteriji kvalitete za određivanje dopuštenih koncentracija onečišćenja u vodi prirodnih efluenata, te za utvrđivanje djelotvornosti metoda pročišćavanja voda²⁰.

2.5.4. Ekotoksikološki testni sustavi ispitivanja

Kemikalije iz okoliša mogu djelovati na mnogim biološkim razinama, od pojedinačnih molekula do cjelovitih ekosustava. Unatoč tome, većina ekotoksikoloških studija izvodi se na razini jednog ili nekoliko organizma. Tipične vrste u ekotoksikološkim testovima lako se kultiviraju u laboratoriju. Iako ti pojednostavljeni testovi ne mogu odražavati složenu situaciju u prirodi, oni mogu pružiti pouzdane informacije o mogućim utjecajima toksičnih tvari u ekosustavu. Pouzdana procjena načina djelovanja toksičnih tvari na okoliš moguća je samo s nizom različitih ispitivanja te s različitim vrstama¹⁶³. Većina klasičnih *in vivo* testova provodi se na vodenim organizmima. U ekotoksikologiji voda, standardni testni sustavi dijele se na akutne i kronične. Testni sustavi se temelje na statičkim ispitivanjima s i bez obnove medija. Najjednostavniji testovi su statički i polustatički akutni testovi. Ovo su kratkotrajna testiranja u trajanju od nekoliko sati do nekoliko dana (maksimalno 96 h). Krajnje točke obično su stupanj preživljavanja ili smrtnosti¹⁶⁴. Iako su akutni testovi vrlo ekonomični, oni su najmanje reprezentativni i osjetljivi testovi. Nasuprot tome, kronični testovi imaju uobičajeno trajanje od 21 ili 28 dana, ili barem za cijeli životni ciklus testnog organizma, i mogu se izvoditi kao polustatički ili protočni testovi^{164,165}. Njihova izvedba je vremenski zahtjevna u usporedbi s akutnim testovima. Međutim, oni su osjetljiviji i pružaju daleko više informacija o utjecaju štetnih tvari na testne organizme. Ove dodatne informacije važne su za razumijevanje i tumačenje složenih procesa u prirodi i za procjenu opasnosti.

Kako bi se osiguralo standardizirano ispitivanje utjecaja štetnih kemikalija, nekoliko metoda ekotoksikoloških ispitivanja s širokim rasponom ispitnih vrsta razvijeni su i propisani standardnim testovima. Umjetni testni sustavi s dafnijama – uglavnom s vrstom *Daphnia magna*, opisani su u nekoliko smjernica i ne razlikuju se bitno jedni od drugih. Slijedeći međunarodne standarde, ove metode koriste vladine agencije, industrija i neovisni laboratoriji (Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj, engl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD)¹⁶⁶. Primjerice, kod toksičnosti vodenih uzoraka, *Daphnia magna* test akutne imobilizacije obično se koristi kao mjera kemijske toksičnosti (smjernice OECD-a za

ispitivanje kemikalija – *Daphnia* sp. Acute Immobilisation test 202). Svi akutni testovi se izvode kao statični ili polustatička ispitivanja¹⁶⁶. Testovi se provode s novorođenim organizmima, jer su u ovom životnom stadiju najosjetljiviji. Na početku testa jedinke moraju biti mlađe od 24 sata. Nakon izlaganja u periodu od 24 i/ili 48 h ispituje se imobilizacija ili smrtnost jedinki. Imobilizacija znači izostanak normalnog plivanja unutar 15 sekundi nakon nježnog miješanje ispitne posude. Iz rezultata se mogu izračunati krivulje doza–odgovor i procjena smrtonosne koncentracije (*Lethal Concentration 50/Effective Concentration 50*, LC₅₀/EC₅₀) koja predstavlja onu koncentraciju tvari koja dovodi do smrti 50 % ispitane populacije jedinki¹⁶⁶.

2.6. Citotoksikologija

2.6.1. Ispitivanje citotoksičnosti tvari

Svojstvo tvari koje se smatraju stranim cijelom biološkom sustavu (ksenobiotici) da pri određenoj koncentraciji izazovu staničnu smrt naziva se citotoksičnost. Različiti su načini djelovanja citotoksičnih spojeva. Nekroza je gubitak integriteta stanične membrane što rezultira lizom stanice, stanice se prestaju dijeliti i rasti te se aktivira apoptoza – genetički programirana stanična smrt²¹.

Citotoksičnost se izražava smrtonosnom dozom (*Lethal doze 50*, LD₅₀) koja predstavlja smrt 50 % ispitivane populacije stanica pri određenoj koncentraciji ksenobiotika, a određuje se s pomoću dvije vrste testova: klasičnih (istraživanja na životinjama) i alternativnih testova toksičnosti (istraživanja na mikroorganizmima ili staničnim linijama). *In vitro* testovi citotoksičnosti uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva ili kulturama organa¹⁶⁷. Primjenjuju se u procjeni sigurnosti proizvoda prije odobrenja za uporabu i stavljanja na tržište, poput farmaceutika, kozmetike, prehrambenih aditiva i pesticida. Primjenu pronalaze i u ispitivanjima potencijalnog citostatskog odnosno antineoplastičnog djelovanja. Primarni *in vitro* testovi uključuju listu 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija za testiranje djelovanja raznih komponenti u definiranim rasponima koncentracija, kako bi se utvrdio stupanj inhibicije rasta ili tzv. bazalne citotoksičnosti spoja za svaku staničnu liniju¹⁶⁸. Vrlo je bitno da se svako *in vitro* ispitivanje može interpretirati na razini *in vivo* odgovora u istim ili sličnim stanicama. Sustavom koji je jednostavniji od čitavog organizma postiže se dobra ponovljivost rezultata. Doprinos *in vitro* testova citotoksičnosti značajan je u planiranju *in vivo* pokusa u smislu odabira spoja i

odgovarajuće koncentracije za daljnje testiranje. Metali koji se najčešće pojavljuju u otpadnim vodama uključuju Cu, Cd, Pb, Ni, Cr, As, Mn, Zn i Hg te njihove metalne koloide i komplekse s organskim tvarima¹⁶⁹. Teški metali s visokom razinom sorpcije i precipitacije ne predstavljaju prijetnju kao onečišćivači podzemnih voda zbog slabe migracije, no bez obzira na to mogu dostići kritične razine zbog sposobnosti da se bioakumuliraju u tkivima živih organizama^{170–172}.

2.6.2. HepG2 stanična linija

Stanična linija humanog hepatocelularnog karcinoma HepG2 redovito se primjenjuje kao *in vitro* model hepatocita te služi u ispitivanjima toksičnosti spojeva²². Jetra je ključni metabolički organ, pa se HepG2 stanice upotrebljavaju za proučavanje metabolizma brojnih tvari, posebno lijekova. HepG2 je prva humana, tumorska stanična linija jetre koja je zamijenila „zlatni standard” modela za ispitivanja metabolizma ksenobiotika i citotoksičnosti tvari – humane hepatocite. Iako primarne kulture humanih hepatocita najbolje odražavaju *in vivo* sustav (jetru), njihova je primjena problematična zbog oskudnih količina odnosno nedostupnosti materijala (svježi uzorci jetre), komplicirane izolacije, ograničenog životnog vijeka te varijabilnosti jedinki unutar kulture¹⁷³. HepG2 stanična linija svoju je primjenu našla kao prvi korak u ispitivanjima spojeva potencijalnog antitumorskog djelovanja, a jedan su od brojnih primjera flavonoidi koji uzrokuju apoptozu u staničnoj liniji¹⁷⁴. Istraživanja su pokazala da trovalentni oblik arsena, kao što je arsenov trioksid (AT), ima sposobnost izazivanja značajne citotoksičnosti i indukcije značajnog broja stresa gena u stanicama karcinoma ljudske jetre (HepG2). No literatura upućuje i na to da toksičnost arsena ovisi o njegovu oksidacijskom stanju i kemijskom obliku. U ovom istraživanju upotrebljavali smo stanice ljudskog hepatoma HepG2, koje zadržavaju normalne stanične funkcije i upotrebljavane su u velikom broju toksikoloških ispitivanja. Da bismo testirali ovu hipotezu, dodatno smo procijenili stanične i molekularne reakcije HepG2 stanica nakon izloženosti As(III), As(V), SPION–u te njihovoj kombinaciji u određenom omjeru koncentracija, s obzirom na to da podzemne vode koje su ispitivane u radu sadrže dosta veliku količinu Fe. Citotoksičnost je procijenjena upotrebom MTT testa za staničnu vitalnost. Stanična linija HepG2 odabrana je jer zadržava mnoga genotipska i fenotipska obilježja normalnih parenhimskih stanica jetre, uključujući svojstveni metabolizam poput sinteze i izlučivanja proteina plazme¹⁷⁵. Već je pokazano da humane

hepatocelularne stanične linije mogu poslužiti kao dobar model za ispitivanje odgovora na različite tvari u stanicama jetre, kao organu u kojem se akumuliraju toksične tvari^{176,177}.

2.7. Ciljevi rada

Brojna su istraživanja praćenja količine ukupnog arsena u uzorcima iz životne okoline i hrane, ali analitički znatno zahtjevnije utvrđivanje pojedinih pojavnih specija arsena u ovakvim uzorcima je malobrojno, a istovremeno značajnije za utvrđivanje njegovog djelovanja kao onečišćujuće tvari. Značaj ovog istraživanja je u pronalasku pogodnog konzervansa ili smjese konzervanasa, koji bi bio praktičan za primjenu, a koji će očuvati raspodjelu specija arsena u uzorcima vode bez promjene do laboratorijskog određivanja, što je bitno obzirom na njegovo štetno djelovanje na zdravlje ljudi.

Kako se slična istraživanja nisu provodila u ovom dijelu Europe, a u svijetu ograničeno, pored znanstvenog doprinosa, rezultati ovog istraživanja trebali bi postati i primjenjivi, ukoliko se za odabrane supstance dokaže da djeluju kao pogodno konzervirajuće sredstvo.

Kao što većina elemenata u tragovima ne može biti određena na licu mjesta iz različitih razloga, opća je praksa prikupiti reprezentativni uzorak i sačuvati ga do analize u laboratoriju. Postupak očuvanja ima za cilj održanje omjera specija i njihove koncentracije. Prilikom čuvanja uzoraka vode cilj je usporiti redoks reakcije, koprecipitaciju, hidrolizu, adsorpciju, biorazgradnju i fotokemijske reakcije koje se mogu pojaviti tijekom pohranjivanja. Stoga je važno uzeti u obzir utjecaj tih čimbenika na stabilnost specija kako bi se dobila reprezentativnost ispitivanog uzorka i točna procjena problema u okolišu. Mnoštvo metoda je dostupno za ispitivanje specija arsena, ali sposobnost očuvanja izvornog uzorka od mjesta uzorkovanja As(III) i As(V) do analize u laboratoriju je donekle izazovniji zadatak. Postoji nekoliko studija o stabilnosti specija arsena u uzorcima vode, ali s kontradiktornim zaključcima u vezi postupaka filtracije, zakiseljavanja te temperaturama pohranjivanja i tipu matriksa.

Također, na temelju objavljene literature i našeg iskustva pokušati ćemo dati prijedloge odabira odgovarajućih strategija očuvanja uzoraka vode za određivanje As(III)/As(V) u vidu dodatka dostupnih, komercijalnih soli i kiselina uzorcima vode, koje također djeluju i kao kompleksirajuće sredstvo za Fe, a radi spriječavanja njegovog utjecaja na proces oksidacije As(III).

Ciljeve ovog istraživanja možemo predstaviti na slijedeći način:

- Primjeniti normiranu metodu UPLC–ICP–MS za određivanja specija arsena i ispitivanje njihove stabilnosti na modelnim i prirodnim uzorcima vode uz praćenje koncentracije As(III), As(V) i ukupnog arsena As(tot) tijekom vremena.
- Primjeniti metodu voltametrije anodnog otapanja sa scTRACEGold elektrodom za ispitivanje stabilnosti specija arsena na modelnim i prirodnim uzorcima vode uz praćenje koncentracije As(III), As(V) i ukupnog arsena As(tot) tijekom vremena.
- Ispitati stabilnost As(III) u modelnim vodenim otopinama u prisustvu različitih supstanci za konzerviranje uzoraka kao što su anorganske i organske kiseline, kompleksirajuća sredstva, soli i ioni metala.
- Ispitati stabilnost As(III) u modelnim vodenim otopinama pri različitim koncentracijama As(III) u uzorku, te pri različitim koncentracijama sredstva za konzerviranje.
- Ispitati stabilnost As(III) u modelnim vodenim otopinama pri različitim koncentracijama As(III) u uzorku, te pri različitim pH vrijednostima sredine.
- Ispitati stabilnost prirodnih uzoraka podzemnih voda u prisustvu potencijalnih konzervanasa ispitanih na modelnim otopinama.
- Ispitati utjecaj koncentracije iona Fe prisutnih u prirodnim bunarskim vodama na stabilnost redoks para As(III)/As(V).
- Ispitati ekotoksičnost modelnih otopina vode s dodatkom As(III)/As(V), kao i uzoraka s dodatkom SPION nanočestica, te ustanoviti stupanj toksičnosti ispitivanih otopina na vrsti *Daphnia magna*, jednog od preferiranih testnih organizama u vodenoj ekootoksikologiji.
- Ispitati citotoksičnost modelnih otopina vode s dodatkom As(III)/As(V), kao i otopina s dodatkom SPION nanočestica, te ustanoviti stupanj citotoksičnosti ispitivanih uotopina na staničnoj liniji ljudskog hepato karcinoma (HepG2).
- Predstaviti i evaluirati dobijene rezultate.
- Na osnovu provedenih ispitivanja, te dobivenih rezultata predstaviti zaključke doktorskog rada.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO – MATERIJAL I METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA

3.1. Kemikalije i reagensi

Tijekom izrade eksperimentalnog dijela ove doktorske disertacije korištene su kemikalije visoke čistoće. Za pripremu uzoraka i otopina korištena je deionizirana voda otpornosti $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

- Standardna otopina arsenata (As^{5+}), CPChem Ltd, Stara Zagora, Bugarska (1000 mg L^{-1})
- Standardna otopina arsenita (As^{3+}), Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, USA (1000 mg L^{-1})
- Sumporna kiselina H_2SO_4 95–97 %, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Dušična kiselina HNO_3 65 %, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Octena kiselina CH_3COOH 99,8 % (HAc), Lach–Ner s.r.o., Neratovice, Češka Republika
- Sulfaminska kiselina $\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$ 99,3 % krutina, Sigma–Aldrich Company Ltd, Dorset, UK
- Limunska (citratna) kiselina $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (CA), Fisher Scientific UK Ltd, Bishop Meadow Road, Loughborough, UK
- Kalijev klorid KCl 99,5 %, Lach–Ner s.r.o., Neratovice, Češka Republika
- Kalijev permanganat KMnO_4 , Merck, Darmstadt, Njemačka
- Metanol CH_3OH 99,9 %, HPLC, PanReac, AppliChem GmbH, Darmstadt, Njemačka
- Natrijev citrat dihidrat $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (NaC), Merck, Darmstadt, Njemačka
- Natrijev oksalat $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (OKS), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kalijev–natrijev tartarat tetrahidrat $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (TAR), Merck, Darmstadt, Njemačka
- Amonijev dihidrogenfosfat $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Amonijev nitrat NH_4NO_3 , Alkaloid, Skoplje, Makedonija
- Amonijev hidroksid NH_4OH 25 %, Sigma–Aldrich Company Ltd, Dorset, UK

- Standardi pojedinačnih elemenata Fe, Mn, Ca, PO₄, SO₄, Na i Cl, Sigma–Aldrich Company Ltd, Dorset, UK. (1000 mg L⁻¹)
- Deionizirana voda (DI) < 18 MΩ cm⁻¹, Millipore Element A10, Millipore UK, Watford, UK
- Stanice humanog hepatocelularnog karcinoma (HepG2) iz Europske zbirke (ECACC, Salisbury, Velika Britanija).
- Esencijalni medij (MEM), Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Njemačka)
- Dulbeccova fosfatna otopina, fiziološka otopina (PBS), Sigma–Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka).
- Fetalni goveđi serum (FBS), Sigma–Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka).
- Albumin goveđeg seruma (BSA) (broj proizvoda A–7906), Sigma–Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka).
- Penicilin, Sigma–Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka).
- Streptomycin, Sigma–Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka).

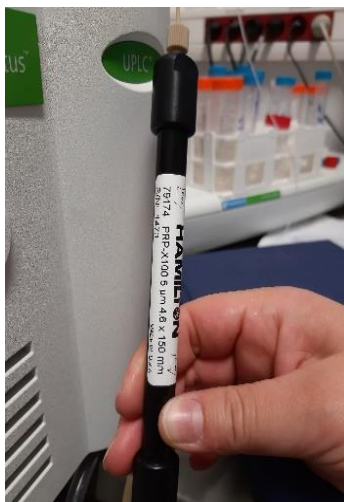
3.2. Korištena oprema i pribor

- UPLC uređaj Perkin Elmer, s automatskim uzorkivačem (engl. *autosampler*), sustavom za dostavu mobilne faze, Perkin–Elmer, Norwalk, CT, USA (Slika 13.)
- Softver za obradu podataka Empower 3, Waters, Milford, MA, USA
- ICP–MS uređaj Nexion 300D, Perkin–Elmer, Norwalk, CT, USA (Slika 13.)
- Odmjerne tikvice od 25, 50, 100, 200 i 1000 mL
- Plastične epruvete i kivete od 15 i 50 mL
- Boce za mobilnu fazu, staklene od 1000 mL
- Polipropilenske bočice za automatski uzorkivač
- Ultrazvučna kupelj, Branson 1210, Branson Ultrasonics, Berkshire, England, UK
- Vakum pumpa
- Hladnjak + 4 °C
- Syringe filter, politetrafluoretan (PTFE) membrana, 0,45 μm
- Analitička kolona Hamilton PRP–X100, duljine 150 mm, unutarnjeg promjera 4,6 mm, ispunjena punilom veličine čestica 5 μm, Hamilton Company, Reno, Nevada, USA (Slika 14.)
- Vaga s mogućnošću očitavanja ≤ 1 mg, Ohaus Explorer Pro, Parsippany, NJ, USA

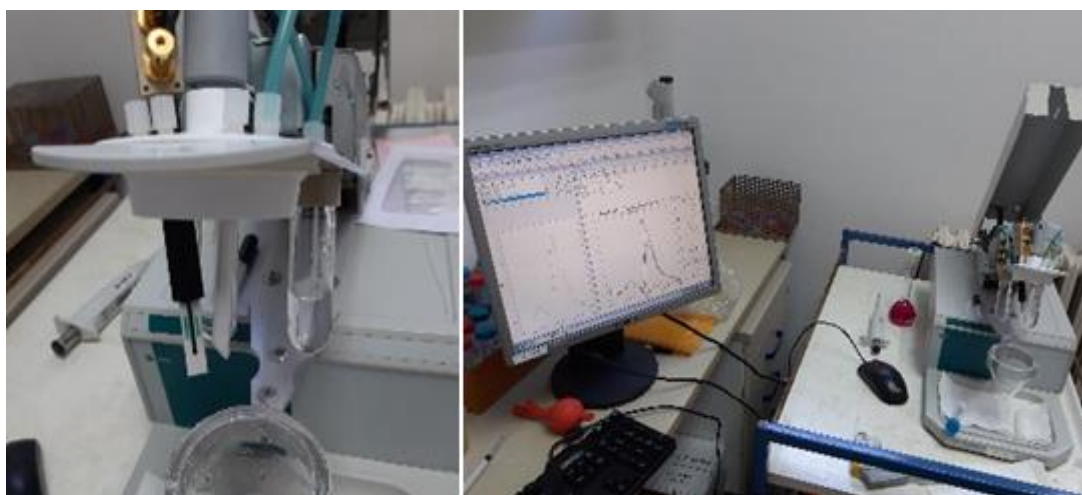
- pH metar, MPC 227, Mettler Toledo, Ohio, USA
- Sustav za filtriranje mobilne faze
- Klipne pipete od 1–10 μL , 10–100 μL i 100–1000 μL
- Šprice za jednokratnu upotrebu
- Pipete staklene od 10 mL i 20 mL
- Elektroda za voltametrijsku analizu: scTRACE Gold, koja se sastoji od zlatne elektrode (radna elektroda), grafitne elektrode (pomoćna elektroda) i Ag/AgCl elektrode (referentna elektroda), Metrohm AG, Herisau, Switzerland
- Uređaj za voltametrijsko mjerenje Metrohm 797 VA Computrace, Metrohm AG, Herisau, Switzerland (Slika 15.)
- Softver za obradu podataka 797 VA Computrace, Metrohm AG, Herisau, Switzerland
- Kit za ispitivanje 3–(4,5–dimetiliazol–2–il) –2,5–difeniltetrazolij bromida (MTT), Roche Diagnostics GmbH (Njemačka).
- Spektrofotometar, Victor™ multilabel čitač, Perkin Elmer, Massachusetts, USA



Slika 13. Vezani sustav UHPLC–ICP–MS.



Slika 14. UHPLC kolona Hamilton PRP–X 100.



Slika 15. Sustav za voltametrijsku analizu korištenjem scTRACE Gold elektrode.

3.3. Priprava otopina za UPLC–ICP–MS određivanja

3.3.1. Priprava otopina osnovnih standarda

Početna smjesa standarda As(III) i As(V), koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \text{ mg L}^{-1}$ pripravljena je u plastičnoj kiveri od 15 mL iz certificirane standardne otopine koncentracije 1000 mg L^{-1} . Nadopunjeno je DI vodom do oznake od 10 mL. Koristile su se klipne pipete od 1–10 μL , 10–100 μL i 100–1000 μL . Početne otopine pohranjene su na + 4 °C i u tami kao mjera opreza protiv degradacije.

3.3.2. Priprava otopina radnih standarda

Razrijeđene otopine standarda za analizu pripravljene su svakodnevno. Vodeni standardi su korišteni pojedinačno ili u smjesama, i kao uzorci. Radni standardi pripravljene su iz početnog standarda koncentracije 10 mg L^{-1} razrjeđivanjem s deioniziranom vodom u plastičnim epruvetama, kako bi se dobili sljedeći miješani kalibracijski standardi: 2, 5, 10, 50, $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

3.3.3. Priprava mobilne faze za UHPLC

U 800 mL DI vode otopi se 1,5 g amonijeva dihidrogenfosfata i 0,8 g amonijeva nitrata. Dodano je 40 mL metanola te se takva otopina nadopunila DI vodom do 1000 mL. Podesila se pH vrijednost do 5,5 pomoću razrijeđene vodene otopine amonijaka. Mobilna faza se degazirala 5 min u ultrazvučnoj kupelji, te filtrirala kroz membranski filter $0,45 \text{ } \mu\text{m}$. Ovako napravljena mobilna faza čuvala se u hladnjaku pri temperaturi $+4 \text{ } ^\circ\text{C}$ do upotrebe.

3.3.4. Priprava otopina korištenih kao konzervansi

Otopine soli koncentracije $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, koje su se koristile kao potencijalni stabilizatori otopina koje sadrže As(III) i As(V), pripravljene su tako što se odvaži potrebna masa određene soli i otopi u deioniziranoj vodi. Na ovaj način pripravljene su otopine soli natrijeva acetata, natrijeva oksalata i kalijeva–natrijeva tartarata, te otopine limunske kiseline. Otopina octene kiseline pripravljena je razrjeđivanjem 99,8 % octene kiseline.

3.3.5. Priprava modelnih otopina vode

Modelni uzorci vode različitih poznatih koncentracija As(III) i As(V) pripravljene su na isti način kao i radni standardi.

3.3.6. Uzorkovanje i priprava realnih uzoraka vode

Uzorci podzemnih voda (pod nazivima 1A i 1B) prikupljeni su na dvije lokacije u okolini grada Osijeka, te na dvije lokacije u okolini grada Zagreba (pod nazivima 1C i 1D). Uzorci su sakupljeni u polietilenske boce od 5000 mL. Takvi uzorci su potom razdijeljeni u odmjerne tikvice od 200 mL, dodani su određeni volumeni pripremljenih otopina soli i kiselina, kako bi se spriječile promjene u raspodjeli anorganskih specija arsena, i dopunjeni s uzorkovanom vodom do oznake. Ovako pripravljene uzorci čuvani su na temperaturi od $+4 \text{ } ^\circ\text{C}$ tijekom

analize. Analiza je provedena unutar prva 24 sata nakon prikupljanja uzoraka, te je potom praćen sadržaj specija arsena u narednim danima. Analiza specija arsena provedena je pomoću vezanog sustava UPLC–ICP/MS–a. Prije analize, svi uzorci s i bez dodataka konzervanasa filtrirani su kroz filter od 0,45 μm načinjen od politetrafluoroetilena (engl. Polytetrafluoroethylene syringe filter, PTFE) i preneseni u bočice za autouzorkivač UPLC aparata. Na isti način su pripremljeni i uzorci za voltometrijsku analizu.

3.4. Mjerenje, identifikacija i kvantifikacija kod UPLC–ICP–MS analize

3.4.1. Identifikacija specija arsena

Prisutnost analita u uzorku utvrdila se usporedbom vremena zadržavanja (retencijskog vremena, t_R) analita u kromatogramu s vremenom zadržavanja radnog standarda. Ukoliko u kromatogramu nema pika na karakterističnom t_R , smatralo se kako ispitivani analit nije bio prisutan u uzorku. Određeni je analit prisutan ukoliko t_R pika na kromatogramu odgovara vremenu zadržavanja pika standarda uz toleranciju od $\pm 2,5$ %.

3.4.2. Kalibracijski pravac

Kalibracijski pravac napravljen je svaki put prije mjerenja uzoraka. Slijepa proba bila je deionizirana voda i uključena je u kalibracijski pravac. Početna smjesa standarda bila je otopina As(III) i As(V) koncentracije 10 mg L^{-1} . Otopine radnih standarda pripremale su se u deioniziranoj vodi na pet razina koncentracija: 2, 5, 10, 50 i $100 \mu\text{g L}^{-1}$ razrjeđivanjem početnog standarda. Početni standard i radni standardi pripremali su se neposredno prije svakog mjerenja.

3.4.3. Analiza specija arsena pomoću UPLC–ICP–MS

Uzorci su analizirani na As(III) i As(V) pomoću UPLC–ICP–MS sustava. Otopine standarda i uzoraka stavljaju se u automatski uzorkivač UPLC instrumenta. Radni uvjeti UPLC–ICP–MS mjerenja navedeni su u Tablici 4. Kalibracijski pravci za obje specije konstruirani su pomoću standardnih otopina As(III) i As(V) svaki dan prije mjerenja uzoraka. Na osnovu njih određene su koncentracije specija arsena u svim ispitivanim uzorcima. Nakon svakog desetog mjerenja snimala se standardna otopina As(III) i As(V) koncentracije $\gamma = 10 \mu\text{g L}^{-1}$, kako bi se provjerila sljedivost mjerenja i rezultata. Sva mjerenja su izvođena u duplikatu (veliki broj uzoraka i standarda).

Tablica 4. Sažetak parametara instrumenta za vezani sustav UPLC–ICP–MS.

Eksperimentalni uvjeti na UPLC–u	
Instrument	UPLC Perkin Elmer, Altus
Kolona	Hamilton PRP–X100 (150 × 4,6 mm, 5 μm)
Temperatura kolone	Sobna
Volumen injektiranja (μL)	10
Mobilna faza	10 mM NH ₄ H ₂ PO ₄ + NH ₄ NO ₃ , 4 % CH ₃ OH (pH = 5,5)
Protok (mL min ⁻¹)	0,9
Način dostave mobilne faze	Izokratno
Vrijeme mjerenja (min)	9
Vrijeme zadržavanja t _R As(III) (min)	1,83
Vrijeme zadržavanja t _R As(V) (min)	5,5
Eksperimentalni uvjeti na ICP–MS–u	
Instrument	NexION® 300D ICP–MS
RF snaga (W)	1550
Protok argona plazme (L min ⁻¹)	15
Rezolucija (amu)	0,6–0,8
Praćeni izotop (<i>m/z</i>)	As – 75
Protok plina nosača u nebulizatoru (L min ⁻¹)	0,95
Način rada	Standardni
Način nadzora	Pulsno skeniranje
Nebulizator	Koncentrični stakleni
ICP–MS softver	Syngistics

HPLC: high–performance liquid chromatography, ICP–MS: inductively coupled plasma–mass spectrometer.

Svi eksperimenti su provedeni s modelnom otopinom vode pripremljenom dodatkom arsena u deioniziranu vodu visoke čistoće (Milli–Qs, A10, Millipore). pH vrijednost je iznosila 6,0. Nakon injektiranja 10 μL otopine uzorka na UPLC kolonu, kromatografsko razdvajanje je postignuto anionskom izmjenom. ICP–MS instrument je korišten kao osjetljivi detektor koji je radio u pulsnom načinu skeniranja za praćenje signala arsena (⁷⁵As) u eluatu. Kontinuirani signal rezultirao je kromatogramom u ICP–MS softveru, ilustrirajući eluciju i odvajanje arsenskih specija tijekom vremena. Provjera učinka uključena je tijekom svakog analitičkog ispitivanja mjerenjem kalibracijskog standarda koncentracije od $c = 10 \mu\text{g L}^{-1}$, za praćenje promjene osjetljivosti mjerenja nakon svakih 10 uzoraka.

3.5. Priprava otopina za voltometrijska određivanja

3.5.1. Priprava otopine osnovnog standarda

Početni miješani standard As(III) i As(V), koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \text{ mg L}^{-1}$ pripremljen je u plastičnoj kiveri od 15 mL iz standardne otopine koncentracije $\gamma = 1000 \text{ mg L}^{-1}$. Nadopunjen je DI vodom do oznake od 10 mL.

3.5.2. Priprava otopina radnih standarda

Radni standardi As(III) i As(V) koncentracije $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ pripremljeni su iz početnog standarda koncentracije $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \text{ mg L}^{-1}$ razrjeđivanjem s DI vodom u plastičnim epruvetama. Ovako pripremljeni standardi kada su pohranjeni na tamno i hladno (oko + 4 °C) mjesto, stabilni su cca. 1 tjedan. Radni standardi za voltometrijsko određivanje koristili su se za određivanje ukupnog arsena As(tot) i As(III) metodom standardnog dodatka.

3.5.3. Priprava otopine za aktivaciju i čišćenje elektrode scTRACE Gold

U volumetrijskoj tikvici od 100 mL 0,373 g KCl ($c(\text{KCl}) = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$) otopljeno je u približno 80 mL ultra čiste vode. Zatim je pažljivo dodana 2,78 mL $w(\text{H}_2\text{SO}_4) = 96 \%$ ($c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Dobijena otopina je bila jako vruća. Nakon hlađenja otopine do sobne temperature dopunjena je do oznake na tikvici s ultra čistom vodom.

3.5.4. Priprava otopine elektrolita za rad s elektrodom scTRACE Gold

9,71 g sulfaminske kiseline $c(\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}) = 1 \text{ mol L}^{-1}$, 10,51 g limunske kiseline $c(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7) = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ i 3,35 g KCl $c(\text{KCl}) = 0,45 \text{ mol L}^{-1}$ otopljeno je u 100 mL ultra čiste vode. Kako bi se sve otopilo koristila se ultrazvučna kupelj.

3.5.5. Priprava otopine KMnO_4

1,6 mg KMnO_4 otopilo se u odmjerne tikvici i dopunilo do 50 mL ultra čistom vodom ($c(\text{KMnO}_4) = 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$).

3.5.6. Priprava uzoraka za voltametrijsko mjerenje

Podzemna, pitka i mineralna voda obično se može izravno analizirati bez prethodne priprave. Ako je potrebna posebna obrada uzorka, kvantifikacija As(III) nije moguća. U ovom slučaju, može se odrediti samo ukupni arsen.

3.6. Voltametrijska analiza

3.6.1. Uređaj za voltametrijsku analizu

Voltametrijsko određivanje As provedeno je s Metrohm 757 VA Computrace (Herisau, Švicarska), a parametri mjerenja su dati u Tablicama 5–7.

3.6.2. Aktivacija scTRACE Gold elektrode

U mjernu posudu se pipetira 12 mL otopine za čišćenje. Aktivacija se provodi pomoću parametara navedenih pod „Parametri za aktiviranje scTRACE Gold elektrode s 797 VA Computrace“ (Slika 16.).



Slika 16. Kompletan set elektroda scTRACE Gold za određivanje arsena ili žive.

Tablica 5. Parametri za aktivaciju scTRACE Gold elektrode s 797 VA Computrace.

Voltametrijski parametri	
Način (mod) mjerenja	DC – uzorkovana istosmjerna struja
Brzina miješanja	2000 min ⁻¹
Ciklovoltametrijska predobrada	
Početni potencijal	-1,5 V
Vertex potencijal	1,0 V
Broj ciklusa	10
Potenciostatska predobrada	
Potencijal 1	0,1 V
Vrijeme čekanja 1	10 s
Potencijal 2	-0,3 V
Vrijeme čekanja 2	10 s
Vrijeme uravnoteženja	5 s
Čišćenje	
Početni potencijal	-0,3 V
Krajnji potencijal	0,2 V
Potencijalni korak	0,6 V
Vrijeme potencijalnog koraka	0,025 s

3.6.3. Određivanje ukupnog arsena $As(tot)$ s 797 VA Computrace

10 mL uzorka se pipetira u mjernu posudu i doda se 2 mL elektrolita. Potrebno je dodati i 0,1 mL otopine $KMnO_4$ ako uzorak sadrži $As(III)$ i $As(V)$. Ako uzorak sadrži samo $As(V)$, dodavanje otopine $KMnO_4$ nije potrebno. Određivanje se provodi pomoću parametara navedenih pod „Parametri za $As(ukupni)$ s 797 VA Computrace“. Koncentracija $As(tot)$ se kvantificira pomoću dva dodavanja standardne otopine $As(V)$.

Tablica 6. Parametri za određivanje As(tot) s 797 VA Computrace.

Voltametrijski parametri	
Način (mod) mjerenja	SQW – Pravokutnovalna voltametrija
Brzina miješanja	2000 min ⁻¹
Ciklovoltametrijska predobrada	
Početni potencijal	-0,2 V
Vertex potencijal	1,0 V
Broj ciklusa	5
Potenciostatska predobrada	
Potencijal 1	-1,0 V
Vrijeme čekanja 1	60 s
Potencijal 2	-0,25 V
Vrijeme čekanja 2	5 s
Vrijeme uravnoteženja	5 s
Čišćenje	
Početni potencijal	-0,3 V
Krajnji potencijal	0,4 V
Potencijalni korak	0,01 V
Frekvencija	100 Hz
Amplituda impulsa	0,02 V
Supstanca	
Ime	As (tot)

3.6.4. Određivanje As(III) s 797 VA Computrace

10 mL uzorka se pipetira u mjernu posudu i doda se 2 mL elektrolita. Određivanje se provodi pomoću parametara navedenih pod „Parametri za As(III) s 797 VA Computrace“. Koncentracija As(III) je kvantificirana pomoću dva dodavanja As(III) standardne otopine.

Tablica 7. Parametri za određivanje As(III) s 797 VA Computrace.

Voltametrijski parametri	
Način (mod) mjerenja	SQW – Pravokutnovalna voltometrija
Brzina miješanja	2000 min ⁻¹
Ciklovoltametrijska predobrada	
Početni potencijal	-0,2 V
Vertex potencijal	1,0 V
Broj ciklusa	5
Potenciostatska predobrada	
Potencijal 1	-0,5 V
Vrijeme čekanja 1	60 s
Potencijal 2	-0,25 V
Vrijeme čekanja 2	5 s
Vrijeme uravnoteženja	5 s
Čišćenje	
Početni potencijal	-0,3 V
Krajnji potencijal	0,4 V
Potencijalni korak	0,01 V
Frekvencija	100 Hz
Amplituda impulsa	0,02 V
Supstanca	
Ime	As (III)
Karakteristični potencijal	0,0 V

3.6.5. Granica detekcije i linearni radni raspon

Granica detekcije određena je pomoću regresijskog pristupa, pri čemu je granica detekcije izračunata kao $3 s_d$, pri čemu je s_d rezidualna standardna devijacija linearne regresije. Granica kvantifikacije je izračunata kao $10 s_d$. Linearni radni raspon očitao je iz kalibracijske krive. Tablica 8. daje pregled gornje granice detekcije i linearnog područja ovisno o vremenu taloženja. Granica detekcije sa scTRACE Gold elektrodom je znatno ispod koncentracije od $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Vrijeme analize po uzorku je oko 10 minuta.

Tablica 8. Granica detekcije i linearni radni raspon.

Trajanje depozicije	Granica detekcije	Linearno područje
30 s	2,1 $\mu\text{g L}^{-1}$	40 $\mu\text{g L}^{-1}$
60 s	0,9 $\mu\text{g L}^{-1}$	20 $\mu\text{g L}^{-1}$
90 s	0,7 $\mu\text{g L}^{-1}$	7 $\mu\text{g L}^{-1}$

3.7. Ispitivanje ekotoksičnosti na *Daphnia magna* sp.

Eksperimenti ispitivanja toksičnosti provedeni su prema smjernicama OECD-a za ispitivanje kemikalija na *Daphnia* sp. – Smjernica za test akutne imobilizacije 202 (OECD 2004)¹⁶⁶. Test akutne toksičnosti proveden je akreditiranom i normiranom metodom (HRN EN ISO 6341:2013). Načelo testa za akutnu toksičnost je odrediti koncentraciju koja kemijski imobilizira 50 % ispitivanih organizama nakon 24 i 48 sati, što osigurava EC₅₀ vrijednost. Juvenilne jedinke *Daphnia*, u dobi do 24 sata na početku ispitivanja, izložene su ispitivanoj tvari u određenom rasponu koncentracija u razdoblju od 24 i 48 sati. Bilježi se imobilizacija i uspoređuje se s kontrolnim vrijednostima. Rezultati se analiziraju kako bi se izračunala vrijednost EC₅₀ za 48 sati. U standardnoj postavci smjernice propisuju najmanje pet ispitnih koncentracija od kojih svaka ima 4 ponavljanja koja sadrže 5 jedinki. Ispitivanja treba provoditi u malim čašama ili usporedivim ispitnim spremnicima.

Eksperiment je započeo premještanjem juvenilnih *Daphnia* iz laboratorijskih kultura u čašu koja sadrži sredinu Elenkt M4 (OECD 2004). Ispitivanja akutne toksičnosti provedena su na vrsti *Daphnia magna* upotrebom modelnih otopina As(III), As(V) i kombinirane otopine sa SPIO nanočesticama. Najprije su izvršena preliminarna ispitivanja s širim rasponom koncentracija od 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 mg L⁻¹ As(III); 5, 10, 25, 50, 75, 100 mg L⁻¹ As(V); 10, 50, 100, 150 mg L⁻¹ SPIO, kao i kombinacija koncentracija svih triju komponenti zajedno. Za potvrdnu analizu upotrijebljene su otopine koncentracija 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,5, 3 mg L⁻¹ As(III) i 2,5, 7,5, 10, 12,5, 15 mg L⁻¹ As(V), kao i kombinirane otopine As sa SPIO–om određene koncentracije, zajedno s kontrolom.



Slika 17. Lijevo, Dafnije stare 24 h, pripremljene za pokus; desno, pokus na *Daphnia magna* sp.

Nakon 48 h vizualno su zabilježene nepokretnosti, abnormalnosti i promjene u ponašanju dafnija. Smatralo se da su životinje imobilizirane kada nisu mogle plivati u roku od 15 sekundi nakon blagog miješanja. Sukladno smjernicama OECD-a, kretanje antena nije ocijenjeno kao plivačka aktivnost. Broj nepokretnih dafnija zabilježen je nakon 24 i 48 sati (vizuelno nakon blagog miješanja ispitne posude), a posljednja je bila i ishod pokusa. Jedinke *Daphnia* rabljene u eksperimentima nisu hranjene tijekom eksperimentalnog razdoblja.

3.8. Analiza vitalnosti stanica HepG2

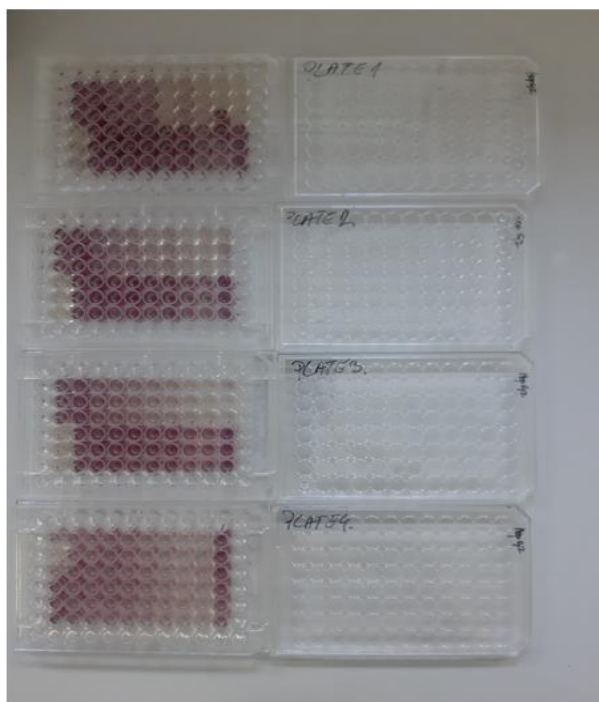
U laboratoriju su stanice karcinoma ljudske jetre (HepG2) bile pohranjene u tekućem dušiku do upotrebe. Odmrznute su laganim miješanjem njihovih spremnika (bočica) dvije minute u kadi na 37 °C. Stanice HepG2 su održavane u DMEM-F12 i nadopunjene s 10 % (v/v) fetalnim goveđim serumom (FBS), 0,4 mg mL⁻¹ G418, 1 % (w/v) penicilinom/streptomycinom i inkubirane u 37 °C u vlažnom 5 % CO₂ inkubatoru. Kemijska razrjeđenja su napravljena na pločicama s 96 jažica, a potom su takve otopine prenesene u jažice sa staničnom kulturom. Na 180 μL alikvota stanične kulture na pločama s 96 jažica, 20 μL alikvota ispitivanih otopina As(III), As(V), te otopina kombiniranih sa SPIO nanočesticama dodani su u svaku jažicu koristeći destiliranu vodu kao otapalo. Negativne kontrole bile su netretirane stanice HepG2 (neobrađene jažice), dok su pozitivne kontrole bile tretirane s 10 % dimetil sulfoksidom (DMSO). Tako obrađene stanice se čuvaju u inkubatoru 24 sata na 37 °C u vlažnom 5 %–tnom CO₂.



Slika 18. Stanična kultura karcinoma ljudske jetre HepG2.

Metabolička aktivnost u tretiranim, u usporedbi s kontrolnim stanicama HepG2 određena je korištenjem MTT testa. Test se temelji na redukciji MTT-a žute tetrazolijeve soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromida) do ljubičaste boje kristala formazana¹⁷⁸. Stabilne stanice s aktivnim metabolizmom sposobne su prevesti MTT u formazan, dok stanice koje umiru gube tu sposobnost¹⁷⁹ (Slika 19.). Stoga je MTT test korišten u ovom istraživanju za kvantificiranje broja vitalnih stanica. Doze As(III), As(V) i SPION-a odabrane su na temelju prethodno objavljenih rezultata¹⁸⁰. Nakon inkubacije, 20 μL otopine MTT (5 mg mL^{-1} u PBS-u) dodano je u svaku jažicu i ponovno inkubirano 4 sata na 37 °C. Potom je 200 μL supernatantne kulture pažljivo aspirirano i 200 μL alikvota dimetilsulfoksida (DMSO) dodano je u svaku jažicu, a ploča je protresena kako bi se otopili kristali formazana i određena je količina MTT formazana spektrofotometrijski pri 572 nm koristeći VictorTM multilabel čitač (Perkin Elmer, Massachusetts, SAD). Intenzitet nastalog obojenja izravno je proporcionalna broju vitalnih stanica. Sva ispitivanja su izvršena u šest replika za svaku koncentraciju. Stupanj vitalnosti ćelija izračunat je kao postotak apsorpcije MTT kako slijedi:

$$\% \text{ preživljavanja} = \frac{\text{prosječna eksperimentalna apsorpcija}}{\text{srednja kontrolna apsorpcija}} \times 100$$



Slika 19. Stanična kultura HepG2 nakon obrade s MTT i DMSO.

3.9. Statistička analiza

Prikupljanje i obrada kromatografskih podataka, kao i svi izračuni, provedeni su pomoću kromatografskog softvera Empower Empower 3, Waters, Milford, MA, USA. Prilikom obrade podataka voltametrijske analize korišten je program za obradu podataka 797 VA Computrace, Metrohm AG, Herisau, Switzerland. Mjerenja su provedena u duplikatima te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost. Statistička obrada provedena je primjenom programa Microsoft Office Excel 2010, nadograđenog statističkim programom XLStat 2018 Addinosoft. Programski sustav obuhvaća i proračune i grafičke prikaze koji su međusobno povezani. Razlike između izmjerenih varijabli kod ekotoksikološkog i citotoksikološkog ispitivanja testirane su jednostavnim i ponovljenim mjerama ANOVA, nakon čega je uslijedio Fisher LSD post hoc test i razina značajnosti postavljena na $P < 0,05$. Sve statističke analize provedene su korištenjem programa STATISTICA v 9.0, StatSoft, Inc., Tulsa, USA.

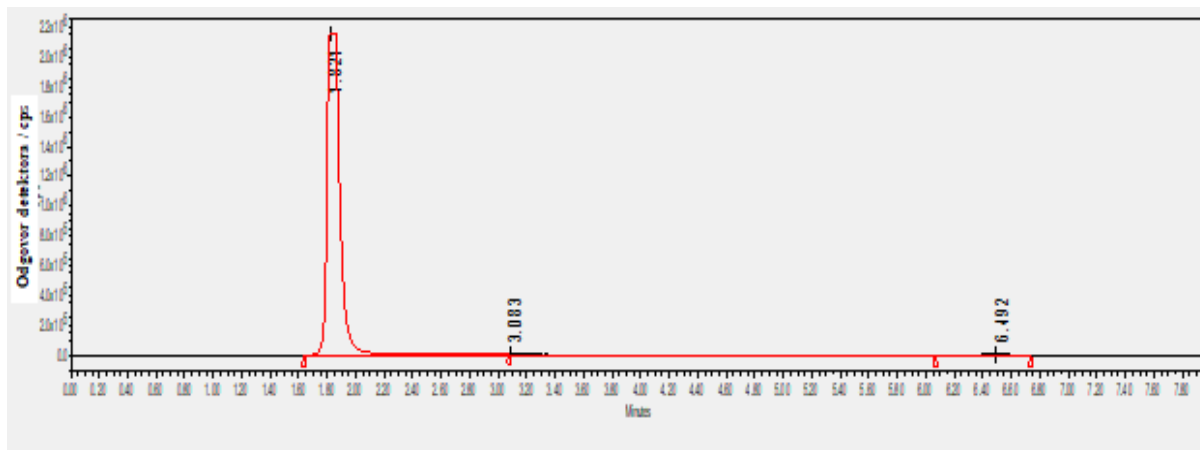
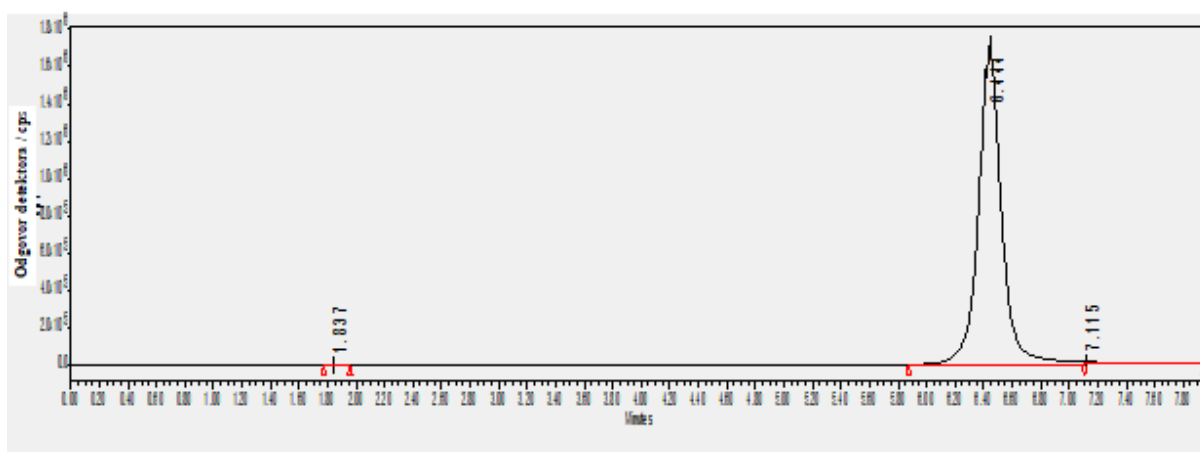
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Stabilnost specija As u modelnim uzorcima vode ispitana metodom UPLC–ICP–MS

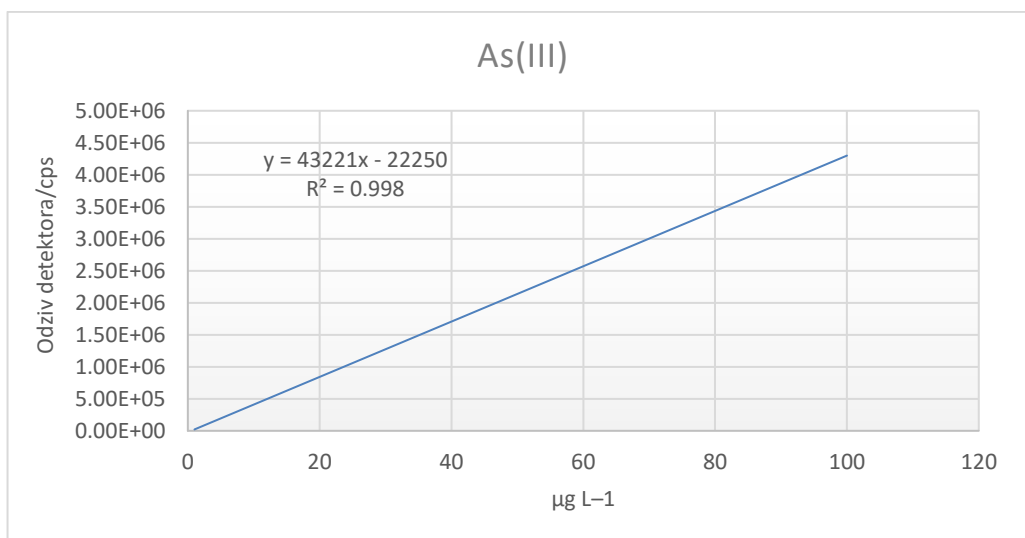
Provedena su preliminarna ispitivanja stabilnosti specija As na modelnim uzorcima vode bez i uz dodatak potencijalnih konzervansa pojedinih specija arsena. Odabrane su tvari koje su komercijalno lako dostupne i mogu se naći gotovo u svakom kemijskom laboratoriju. Ispitani konzervansi također kompleksiraju Feve ione, kataliziraju oksidaciju As(III) do As(V). Za zakiseljavanje uzoraka vode odabran je octena kiselina koja je slabiji oksidans u odnosu na najčešće upotrebljavanu dušičnu kiselinu. Klorovodična kiselina nije razmatrana jer tvori ionske vrste koje imaju iste vrijednosti m/z kao i ciljani analit, te detekcija s ICP–MS–om ne bi bila više pouzdana.

U literaturi je malo podataka o djelovanju same octene kiseline kao konzervansa, već se obično preporuča konzerviranje uzoraka vode s EDTA¹³. Limunska kiselina (CA), natrijev citrat (NaC), natrijev oksalat (OKS) i kalij–natrij tartarat (TAR) odabrani su zbog potencijalno dobrih kompleksirajućih svojstava te njihova standardnog elektrodnog potencijala koji bi spriječio oksidaciju As(III)^{181–183}. Na temelju literaturnih podataka⁷² preliminarno ispitivanje provedeno je i uz upotrebu askorbinske kiseline (AA) kao potencijalnog konzervansa. Međutim, pokazalo se da na modelnim uzorcima AA ne djeluje kao dobar konzervans te je isključena iz daljnjih istraživanja.

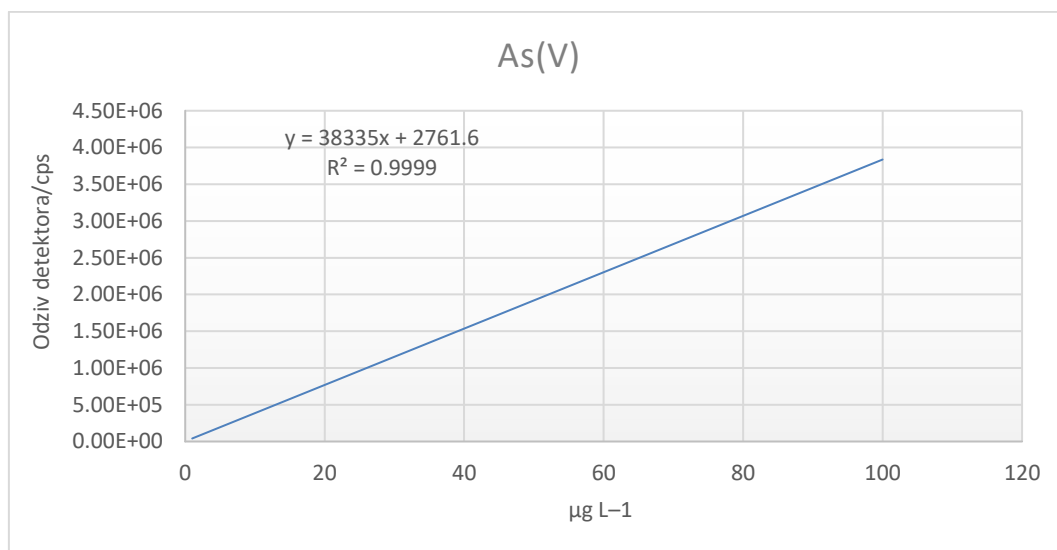
Od standardne otopine As(III) i As(V) koncentracije 1000 mg L⁻¹ razrijeđenjem deioniziranom vodom (DI) pripravljena je osnovna otopina smjese As(III) i As(V) koncentracije 10 mg L⁻¹. Razrijeđenjem osnovnih otopina As(III) i As(V) koncentracija 10 mg L⁻¹ pripravljene su radne otopine As(III) i As(V) koncentracije 100 µg L⁻¹, koje su služile za određivanje vremena zadržavanja, t_R obje komponente pojedinačno. Dobiveni kromatogrami prikazani su na Slikama 20. i 21.

Slika 20. Kromatogram otopine As(III) koncentracije 10 mg L⁻¹.Slika 21. Kromatogram otopine As(V) koncentracije 10 mg L⁻¹.

Iz kromatograma je vidljivo kako se znatno razlikuju vremena zadržavanja; t_R As(III) je 1,82 min, a As(V) 6,44 min. Za izradu kalibracijskih pravaca pripravljene su radne otopine koncentracija 5, 10, 50, 100 i 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Dobiveni kalibracijski pravci (Slike 22. i 23.) korišteni su za kvantitativno određivanje As(III) i As(V) u uzorcima.



Slika 22. Kalibracijski pravac za As(III).



Slika 23. Kalibracijski pravac za As(V).

Stabilnost modelnih otopina bez dodatka konzervansa praćena je tijekom vremena. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti dvaju mjerenja u Tablicama 9. i 10. te na Slikama 24.–26.

Tablica 9. Rezultati ispitivanja stabilnosti As(III) u otopini smjese As(III) i As(V)

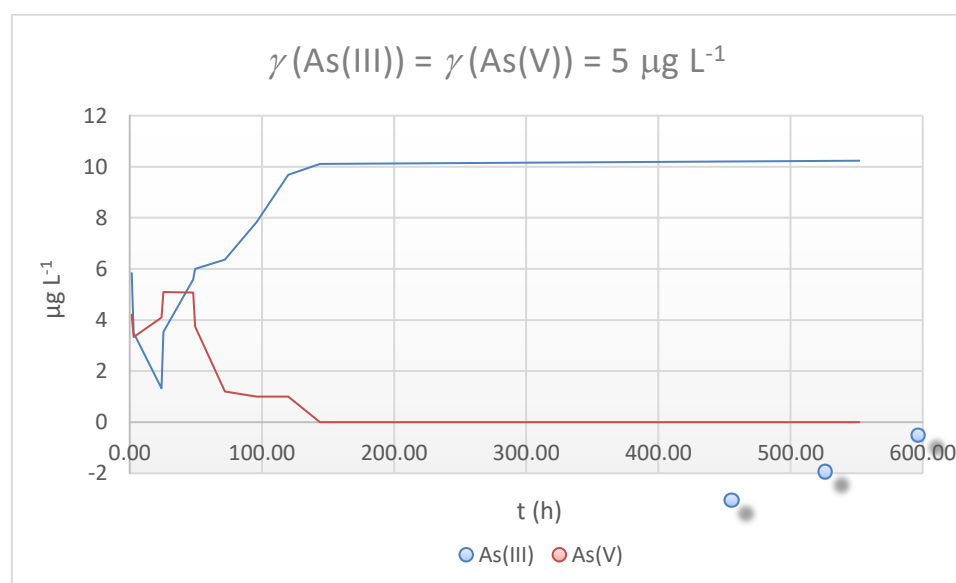
Uzorak As(III)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	5. dan	8. dan	10. dan	25. dan
5	5,98	5,34	5,45	6,17	9,50	9,87	10,36	10,11
10	11,55	10,91	12,11	15,18	14,20	21,45	22,48	22,8
100	93,13	92,78	107,09	128,18	115,17	151,84	174,18	219,78
200	184,63	189,71	210,01	242,70	213,47	235,95	278,76	307,76

Rezultati izraženi kao srednje vrijednosti duplikata (n = 2).

Tablica 10. Rezultati ispitivanja stabilnosti As(V) u otopini smjese As(III) i As(V)

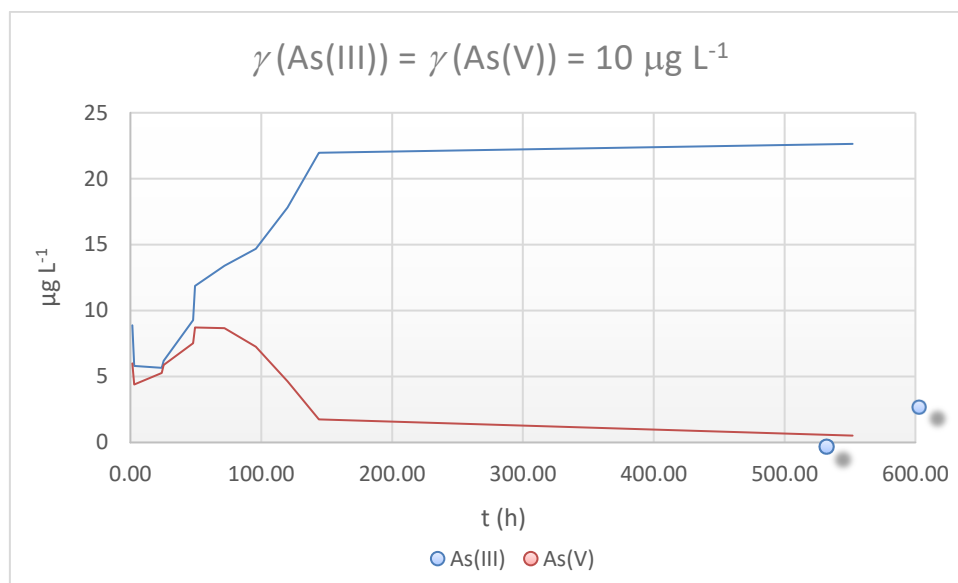
Uzorak As(V)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	5. dan	8. dan	10. dan	25. dan
5	5,69	5,24	5,45	6,17	9,50	9,87	10,36	10,11
10	8,26	5,52	8,81	8,71	5,79	3,51	0,00	1,04
100	90,15	94,73	71,44	79,51	82,36	97,90	77,60	1,37
200	190,28	182,75	137,16	160,41	158,36	205,83	178,64	44,01

Rezultati izraženi kao srednje vrijednosti duplikata (n = 2).

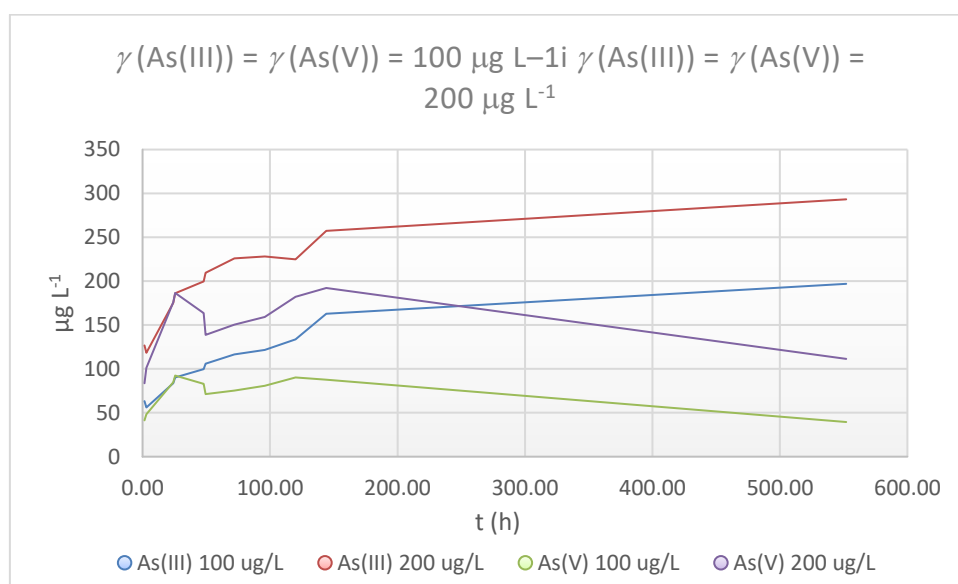


Slika 24. Stabilnost As(III) i As(V) u otopini smjese koncentracije

$$\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 5 \mu\text{g L}^{-1}.$$



Slika 25. Stabilnost As(III) i As(V) u otopini smjese koncentracije $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$.



Slika 26. Stabilnost As(III) i As(V) u otopini smjesa koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 100 \mu\text{g L}^{-1}$ i $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 200 \mu\text{g L}^{-1}$.

Iz grafičkih prikaza praćenja stabilnosti otopine As(III) i As(V) bez dodatka konzervansa vidljivo je da do redukcije As(V) u As(III) dolazi nakon 3 dana. Nakon 8 dana As(V) je potpuno reduciran u As(III), što je u suprotnosti s literaturnim podacima prema kojima se As(III) oksidira u As(V). Možemo zaključiti kako su modelni uzorci relativno stabilni tijekom 3 dana,

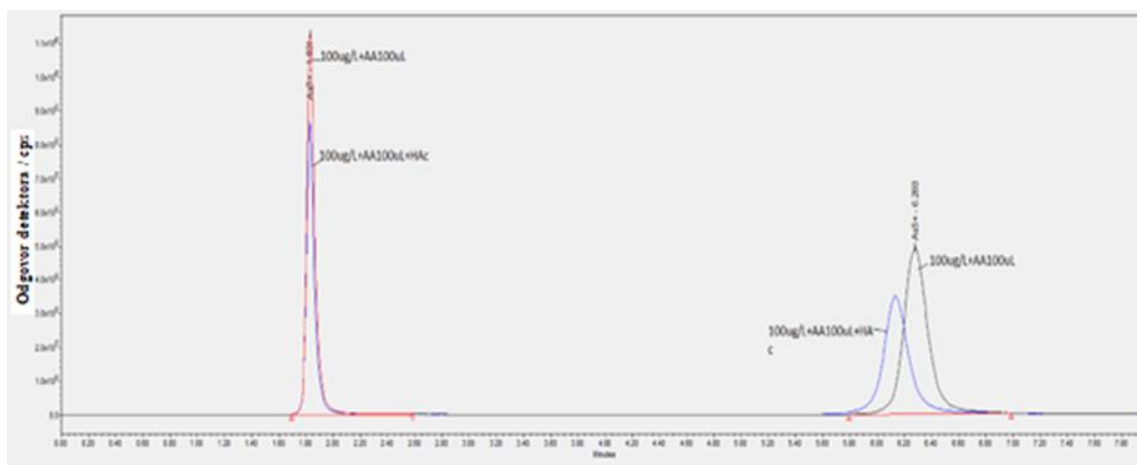
a nakon toga se omjer koncentracija specija arsena znatno mijenja. Efekt je znatnije izražen kod većih koncentracija.

4.2. Stabilnost modelnih otopina As(III)/As(V) s dodatkom različitih konzervansa

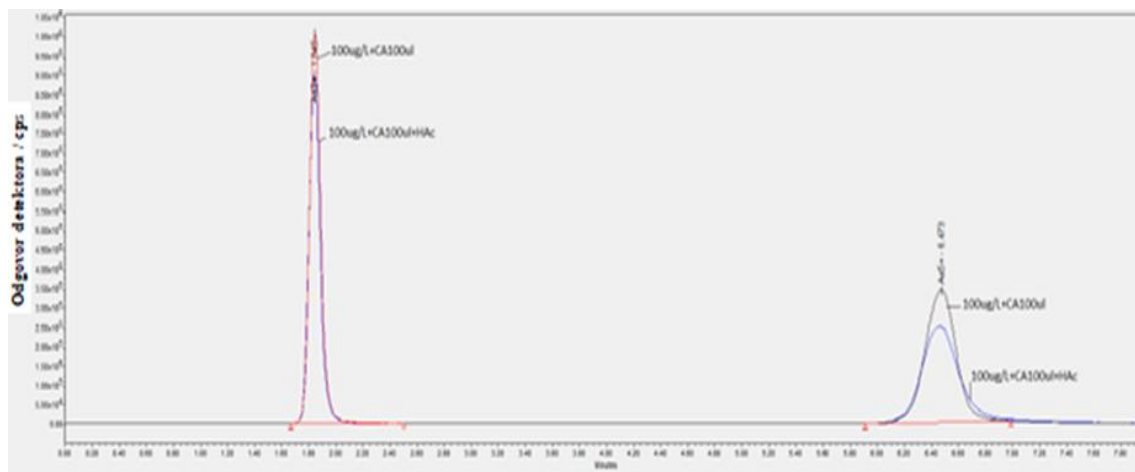
U nastavku rada ispitan je utjecaj različitih konzervansa (askorbinska kiselina, limunska kiselina, natrijev citrat, kalijev natrijev tartarat, natrijev oksalat i octena kiselina) na stabilnost omjera specija arsena u modelnim otopinama tijekom vremena. Ispitavanja su provedena uz tri različite koncentracije konzervansa (1, 2 i 2,5 mmol L⁻¹) te bez i uz dodatak octene kiseline. Rezultati su prikazani u Tablicama 11.–13., a odabrani kromatogrami na Slikama 27.–31. Svi ostali kromatogrami prikazani su u Dodatku (Slike 27.–31.).

Dodatak konzervansa u najvećoj koncentraciji od 2,5 mmol L⁻¹ uvjetovao je začepljenje kromatografske kolone što se manifestiralo u pojavi proširenih kromatografskih pikova nepravilnog oblika, stoga i nepouzdanе rezultate te se istraživanje fokusiralo na dvije preostale koncentracije konzervansa.

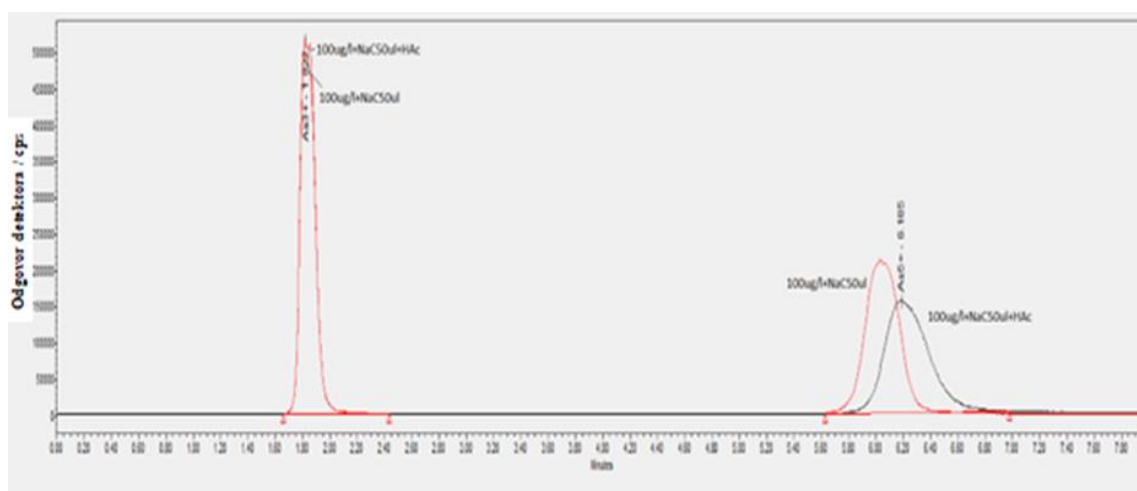
Također su varirane koncentracije specija arsena, od 50 i 100 µg L⁻¹, uz konstantan omjer 1:1. Koncentracije za modelne otopine odabrane su prema vrijednostima koncentracija koje su očekivane u realnim uzorcima, a u kojima postoji problem suviška arsena.



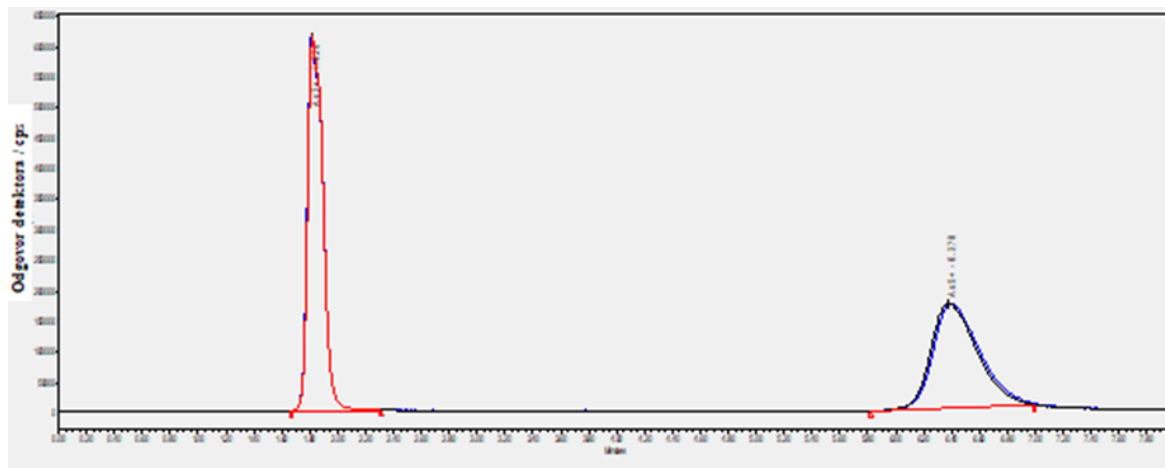
Slika 27. Otopine As(III)/As(V) koncentracija 100 µg L⁻¹ obje specije s dodatkom AA (*c* (AA) = 2,0 mmol L⁻¹ u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu).



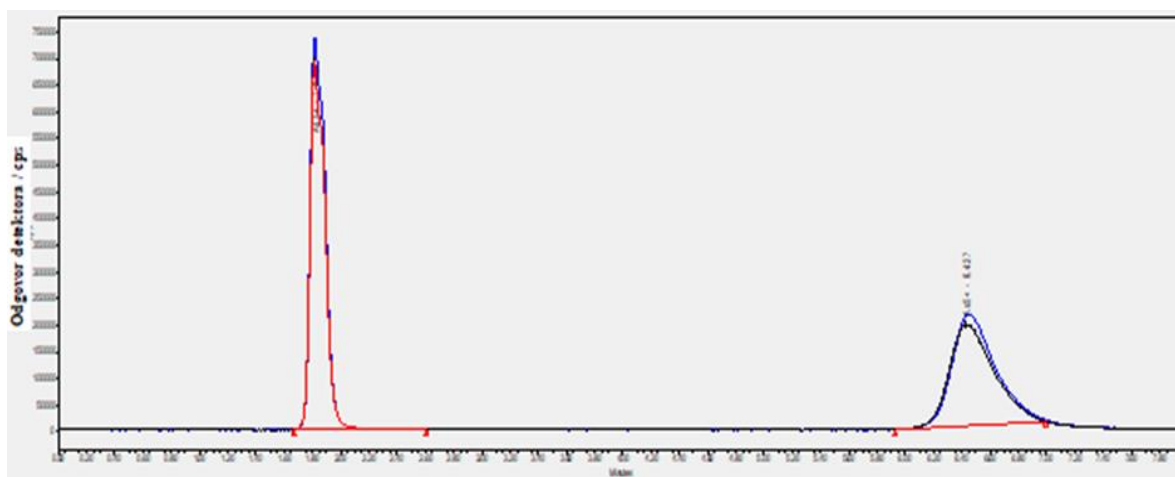
Slika 28. Otopina As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ obje specije s dodatkom CA ($c(\text{CA}) = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu) nakon 3 dana.



Slika 29. Otopina As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom NaC ($c(\text{NaC}) = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ u ukupnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu).



Slika 30. Otopina As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom TAR ($c(\text{TAR}) = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu) nakon 5 dana.



Slika 31. Otopina As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom OKS ($c(\text{OKS}) = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu) 6. dan.

Dodatak limunske kiseline i octene kiseline uzrokuje smanjenje i proširenje pika te pomak vremena zadržavanja As(V). Vrijeme zadržavanja As(III) se nije promijenilo te je dobro razlučivanje pikova koji odgovaraju As(III) i As(V) i dalje zadržano ($R_s > 4,623$).

Tablica 11. Rezultati ispitivanja stabilnosti specija arsena As(III) i As(V) s dodatkom konzervansa koncentracije $c = 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

Vrijeme (h)		0	2	24	48
Konzervans	Koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma$ $(\text{As(III)})/\mu\text{g L}^{-1}$	As(III)	As(V)	As(III)	As(V)
AA	2	2,28	2,21	-	-
	10	11,28	10,10	-	-
	100	99,4	101,72	97,91	101,07
AA/HAc	100	79,00	80,23	76,37	92,90
CA	2	2,12	2,11	-	-
	10	10,17	10,67	-	-
	100	99,29	100,32	101,21	100,80
CA/HAc	100	96,70	104,04	97,74	96,09

Rezultati izraženi kao srednje vrijednosti duplikata ($n = 2$).

Tabela 12. Rezultati ispitivanja stabilnosti specija arsena As(III) i As(V) s dodatkom konzervansa koncentracije $c = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Konzervans	Vrijeme (h)	0		24		48		72		120		144		216	
		As(III)	As(V)	As(III)	As(V)	As(III)	As(V)	As(III)	As(V)	As(III)	As(V)	As(III)	As(V)	As(III)	As(V)
AA	100	101,6	100,03	99,43	97,73	-	-	-	-	101,6	99,54	101,47	102,26	123,07	88,61
AA/HAc	100	86,78	104,75	95,49	79,34	-	-	-	-	94,3	95,63	102,00	101,57	120,86	87,30
CA	100	100,38	100,3	100,77	99,6	100,8	101,08	100,58	101,24	-	-	-	-	103,05	96,16
CA/HAc	100	97,24	98,35	105,1	103,26	-	-	106,34	104,87	-	-	-	-	100,91	103,6
NaC	100	99,45	100,58	102,18	98,85	102,41	100,92	98,97	100,87	-	-	98,33	98,52	-	-
NaC/HAc	100	95,51	96,31	105,24	104,12	109,66	90,70	104,34	102,86	-	-	99,11	102,68	-	-
TAR	100	98,85	100,06	101,65	100,01	100,98	101,31	100,07	100,06	-	-	101,52	100,64	-	-
TAR/HAc	100	98,10	99,51	102,23	101,47	101,09	100,67	101,25	101,27	-	-	99,54	98,61	-	-
OKS	100	99,18	98,75	101,06	100,61	100,57	101,06	100,83	101,27	-	-	100,9	98	-	-
OKS/HAc	100	100,16	100,61	98,94	100,23	101,26	98,738	101,82	100,32	-	-	88,8	109,8	-	-

Rezultati izraženi kao srednje vrijednosti duplikata (n = 2). – Nije mjereno.

Tablica 13. Rezultati ispitivanja stabilnosti specija arsena As(III) i As(V) s dodatkom konzervansa koncentracije $c = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Konzervans	Vrijeme (h)	0		24		48		72		120		144		216	
		Konc. $\mu\text{g L}^{-1}$	As(III)	As(V)	As(III)	As(V)	As(III)	As(V)	As(III)	As(V)	As(III)	As(V)	As(III)	As(V)	As(III)
AA	50	49,32	49,3	51,85	50,25	49,31	50,17	-	-	51,32	50,66	-	-	-	-
	100	99,2	102,9	100,03	102,45	99,53	101,85	-	-	99,41	98,2	-	-	89,79	121,91
AA/HAc	100	80,97	82,02	90,05	92,6	92,34	97,47	-	-	53,5	103,27	-	-	37,94	156,13
CA	50	48,91	49,21	51,23	50,7	48,48	51,16	-	-	49,56	51,15	-	-	53,41	48,94
	100	97,55	99,71	98,16	101,93	101,9	98,16	98,44	101,9	101,23	100,33	-	-	107,57	92,46
CA/HAc	100	88,99	87,8	88,95	87,7	84,23	110,07	-	-	104,4	97,32	-	-	112,92	95,95
NaC	100	99,43	101,46	101,18	98,23	101,34	101,80	99,83	100,66	-	-	101,18	98,23	-	-
NaC/HAc	100	95,04	94,03	101,07	100,62	100,33	99,71	101,26	105,86	-	-	101,26	105,86	-	-
TAR	100	98,30	96,28	101,30	102,03	101,30	102,03	100,39	100,11	-	-	100,39	100,11	-	-
TAR/HAc	100	97,04	98,84	103,49	100,90	103,49	100,90	102,64	100,83	-	-	99,76	99,36	-	-
OKS	100	99,13	101,55	100,81	101,19	100,92	101,76	100,47	100,04	-	-	100,81	101,19	-	-
OKS/HAc	100	98,04	96,15	101,19	101,63	97,58	100,14	99,76	99,36	-	-	100,33	99,71	-	-

Rezultati izraženi kao srednje vrijednosti duplikata ($n = 2$). – Nije mjereno.

Na temelju rezultata prikazanima u Tablicama 12. i 13. može se zaključiti kako ispitani konzervansi stabiliziraju omjer specija arsena As(III)/As(V) dulje od 24 h, sve do 6 dana. Stabilnost je postignuta dodatkom svih ispitanih konzervansa u koncentracijama $c = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ i $c = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Dobra stabilnost omjera specija As(III)/As(V) postignuta je na modelnim otopinama koncentracije $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, što je deset puta veća koncentracija od dozvoljene. Za očekivati je kako će ispitani konzervansi uspješno stabilizirati i niže koncentracije arsena. Rezultati dobiveni u ovom radu mogu se primijeniti u praksi, kako bi se olakšala analize anorganskih specija arsena, obzirom da se standardne otopine arsena bez dodatka konzervansa moraju pripravljati svježe svakoga dana.

Iako su u literaturi navedeni podaci istraživanja utjecaja različitih konzervansa na stabilnost specija As, nema podataka o konzervansima ispitanim u ovom radu. Kao najbolji konzervans predložena je EDTA koja ujedno kompleksira Fe(II) i Fe(III) te tako sprječava adsorpciju specija arsena ali su podaci različitih autora nekonzistentni^{6,11,181,182}.

Treba naglasiti da su svi uzorci držani u tami jer je iz literature poznato kako svjetlost katalizira oksidaciju As(III) u As(V)¹⁸³.

4.3. Stabilnost specija As u uzorcima prirodnih podzemnih voda ispitana metodom UPLC–ICP–MS

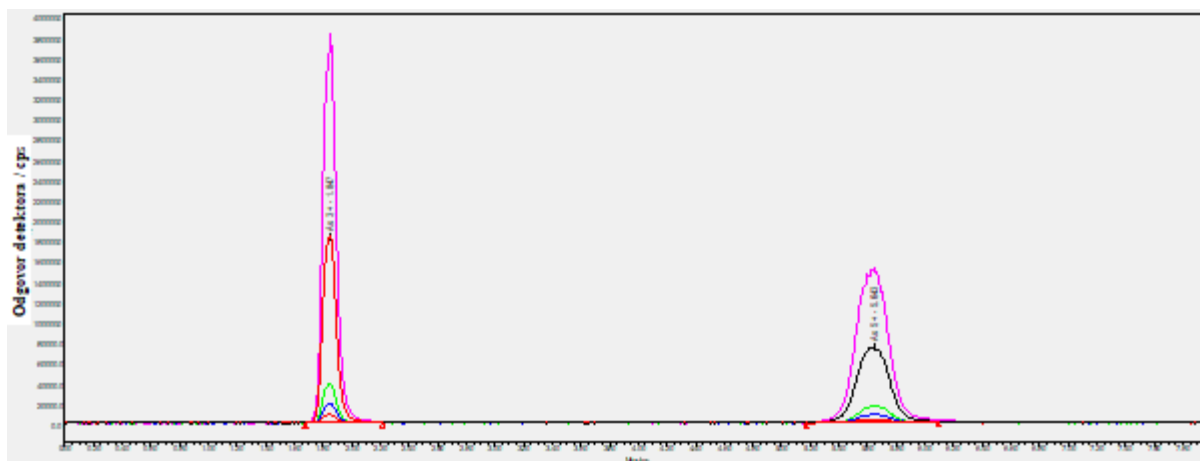
Uzorci prirodnih podzemnih voda prikupljeni su na mjestima kako je navedeno u Tablici 14. i pripremljeni na način opisan u odjeljku materijala i metoda. Svi su uzorci filtrirani, nakon čega su dodani konzervansi u određenim koncentracijama. Uzorci su čuvani u hladnjaku (cca. +4 °C) zaštićeni od dnevne svjetlosti. Jedan uzorak, bez dodatka konzervansa koristio se za usporedbu. Koncentracije specija arsena, kao i ukupni arsen, izmjereni su nekoliko sati nakon prikupljanja uzoraka, a stabilnost specija arsena praćena je tijekom nekoliko narednih dana. Podaci mjerenja provedenih prvi dan za sva 4 uzorka navedeni su u Tablici 14. Ukupni arsen As(tot) i Fe određeni su metodom ICP–MS. Vrijednosti pH uzoraka prirodnih voda određene su u originalnim uzorcima bez dodatka konzervansa. Iz Tablice 14. vidljivo je kako su uzorci iz Osijeka (A i B) imali znatno veću masenu koncentraciju As(tot) i Fe u odnosu na uzorke iz Zagreba (C i D).

Tablica 14. Uzorci prirodnih podzemnih voda

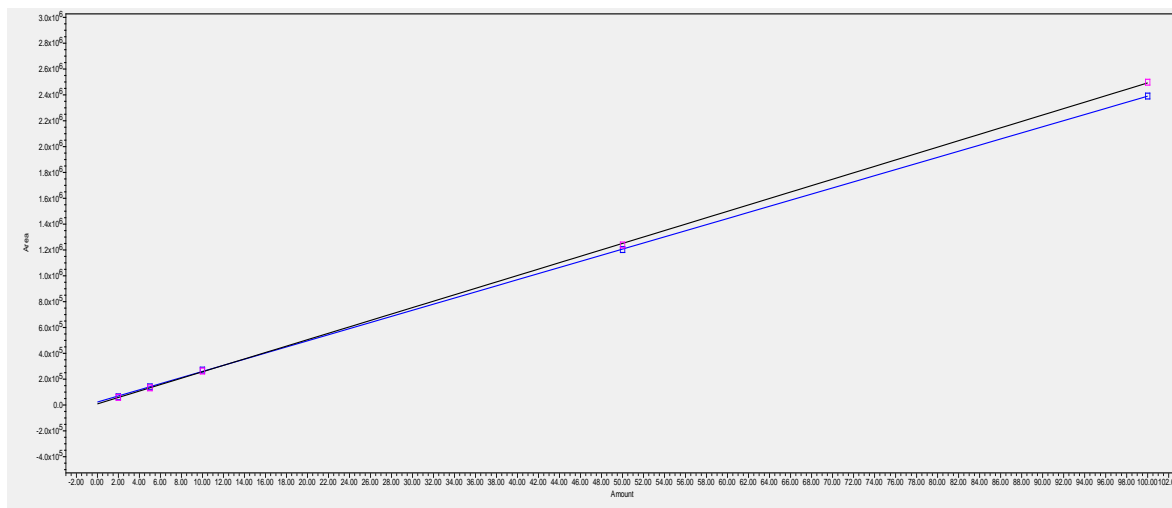
Uzorak	Mjesto uzorkovanja	As (tot)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	As (III)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	As (V)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Fe/ mg L^{-1}	pH
A	Osijek	110,0	48,5	61,5	130,0	8,42
B	Osijek	164,8	118,0	46,8	88,3	8,02
C	Zagreb	9,86	8,5	1,36	10,5	8,32
D	Zagreb	16,62	8,46	8,16	10,15	8,24

Stabilnost prikupljenih uzoraka bez i s dodatkom konzervansa praćena je metodom UPLC–ICP–MS kako je opisano u odjeljku materijal i metode. Kalibracijski pravci za obje specije konstruirani su pomoću standardnih otopina As(III) i As(V) svaki dan prije mjerenja uzoraka. Nakon svakog desetog mjerenja snimala se standardna otopina As(III) i As(V) koncentracije $\gamma = 10 \mu\text{g L}^{-1}$, kako bi se provjerila sljedivost mjerenja i rezultata. Sva mjerenja uzoraka i standarda su izvođena u duplikatu (veliki broj uzoraka i standarda). Srednje vrijednosti određenih koncentracija prikazane su tablicama. Uzorci zakiseljeni s HAc imali su pH vrijednost između 4,83 i 5,61.

Na Slikama 32. i 33. prikazani su originalni kromatogrami standardnih otopina As(III) i As(V) koncentracija 2, 5, 10, 50 i 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, te kalibracijski pravci na osnovu kojih se odredila koncentracija specija arsena.



Slika 32. Kromatogrami standardnih otopina As(III)/As(V) koncentracija 2, 5, 10, 50 i 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

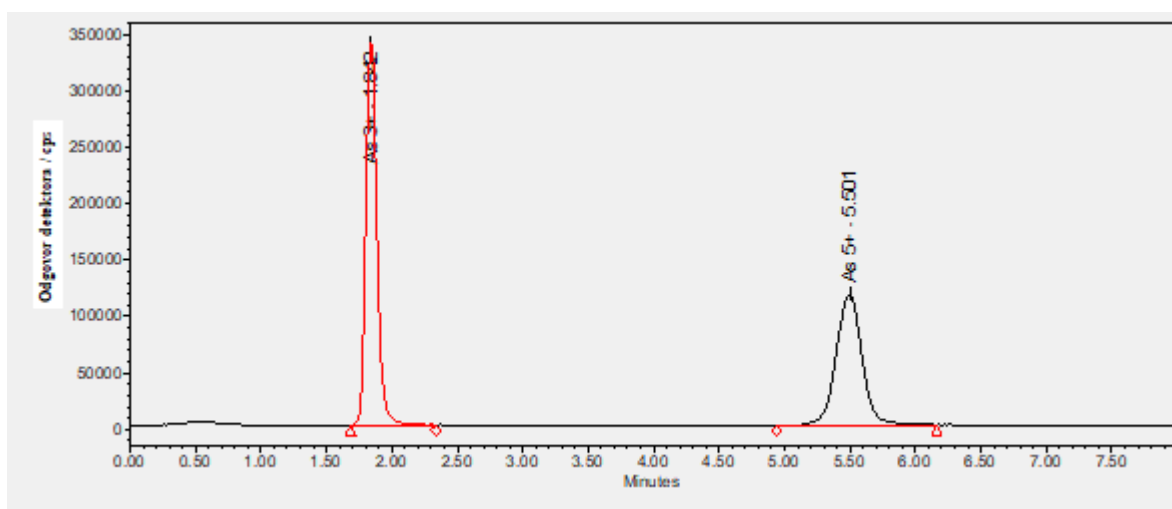


Slika 33. Kalibracijski pravci standardnih otopina As(III) i As(V).

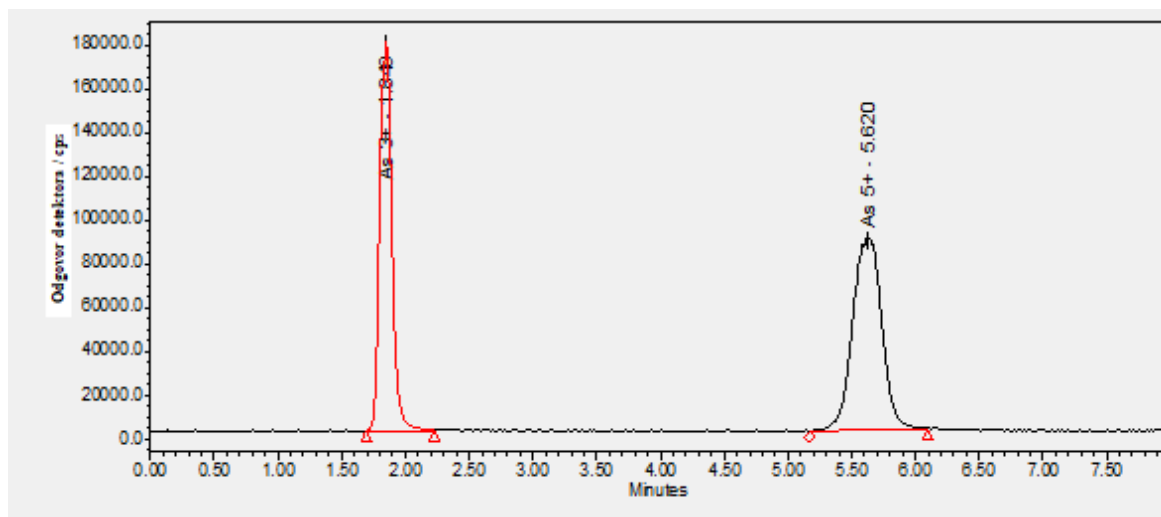
Tablica 15. Jednadžbe pravca za kalibracijske pravce As(III) i As(V).

Naziv	Ion	R	R ²	Jednadžba
As ³⁺	As ⁷⁵	0,999975	0,999951	$Y = 2,48 \times 10^4 X + 8,77 \times 10^3$
As ⁵⁺	As ⁷⁵	0,999978	0,999956	$Y = 2,37 \times 10^4 X + 2,31 \times 10^4$

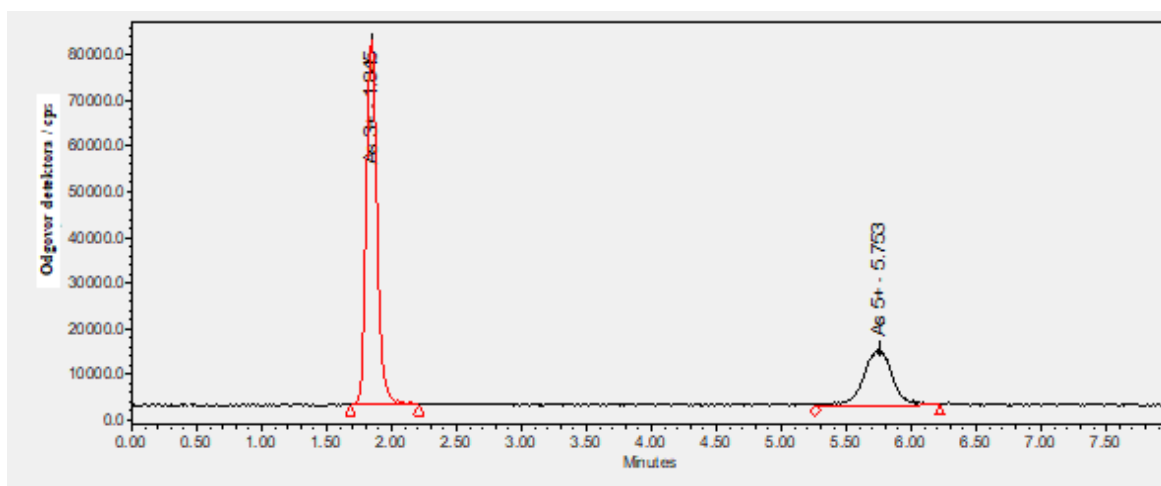
Na Slikama 34.–37. prikazani su originalni kromatogrami uzoraka prirodnih podzemnih voda bez dodatka konzervansa snimljeni prvi dan, nekoliko sati nakon uzorkovanja.



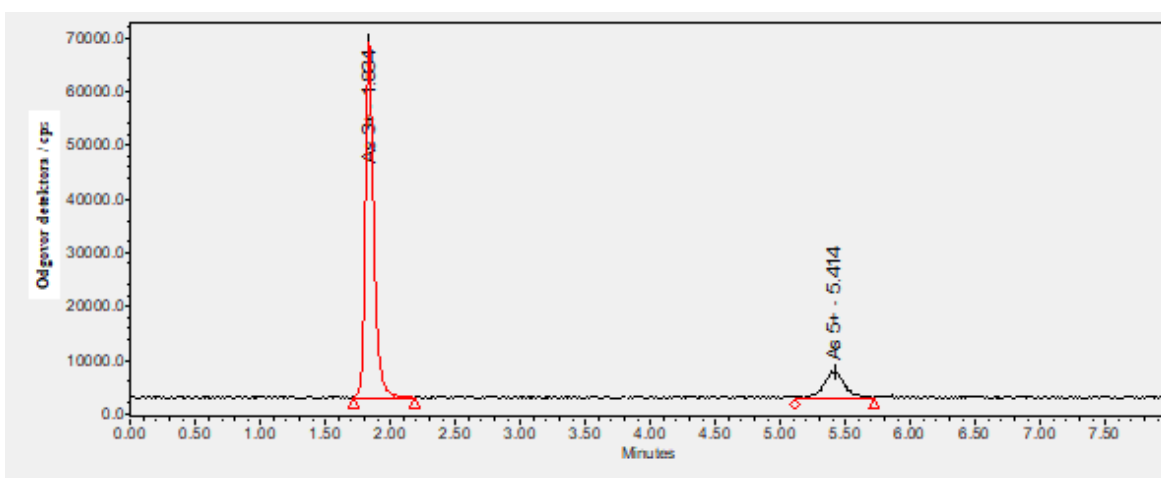
Slika 34. Kromatogram uzorka prirodne podzemne vode 1A.



Slika 35. Kromatogram uzorka prirodne podzemne vode 1B.



Slika 36. Kromatogram uzorka prirodne podzemne vode 1C.



Slika 37. Kromatogram uzorka prirodne podzemne vode 1D.

Koncentracije specija arsena određene iz navedenih kromatograma date su u Tablicama 16–19. Ispitivanje je provedeno tijekom 7 dana. Na Slikama 38 – 41 dana je ovisnost koncentracije specija arsena As(III) i As(V) o vremenu za ispitane konzervanse: limunska kiselina, natrijev citrat, kalij – natrijev tartarat, natrijev oksalat i octena kiselina.

Tablica 16. Rezultati ispitivanja stabilnosti omjera specija As(III)/As(V) u uzorku prirodne vode A s dodatkom različitih konzervirajućih sredstava

Uzorak	Dan	1	2	4	6	7
	Specija	Koncentracija/ $\mu\text{g L}^{-1}$				
1A	As(tot)	109,39				
	As(III)	48,44	49,33	15,61	7,72	14,51
	As(V)	60,95	60,30	95,34	108,70	94,98
1A + CA	As(tot)	108,64				
	As(III)	49,34	50,80	45,14	46,80	4,97
	As(V)	59,30	60,45	66,11	70,83	105,02
1A + CA/HAc	As(tot)	109,05				
	As(III)	50,43	51,45	56,58	50,05	44,79
	As(V)	58,62	59,31	63,61	60,99	65,49
1A + NaC	As(tot)	109,17				
	As(III)	49,13	48,78	47,08	43,14	51,27
	As(V)	60,04	63,28	62,33	61,96	58,69
1A + NaC/HAc	As(tot)	110,41				
	As(III)	50,01	50,78	48,11	44,03	40,9
	As(V)	60,40	60,06	62,03	65,25	70,42
1A + TAR	As(tot)	110,00				
	As(III)	49,60	50,12	47,20	44,01	39,87
	As(V)	60,40	59,75	62,99	68,83	70,95
1A + TAR/HAc	As(tot)	109,23				
	As(III)	51,53	52,80	49,34	38,06	45,99
	As(V)	57,70	57,15	61,87	73,01	62,87
1A + OKS	As(tot)	110,39				
	As(III)	47,05	39,74	38,67	44,87	86,93
	As(V)	63,34	70,04	67,40	55,60	19,58
1A + OKS/HAc	As(tot)	110,34				
	As(III)	47,88	35,78	39,49	38,16	29,70
	As(V)	62,46	75,05	68,90	77,45	80,96
1A + HAc	As(tot)	109,43				
	As(III)	51,38	39,79	43,61	22,60	30,41
	As(V)	58,05	71,46	67,52	87,08	80,56

Rezultati izraženi kao srednje vrijednosti duplikata (n = 2). – Nije mjereno.

Tablica 17. Rezultati ispitivanja stabilnosti omjera specija As(III)/As(V) u uzorku prirodne vode B s dodatkom različitih konzervirajućih sredstava

Uzorak	Dan	1	2	4	6	7
	Specija	Konzentracija/ $\mu\text{g L}^{-1}$				
1B	As(tot)	165,07				
	As(III)	114,26	20,20	9,54	3,81	0,12
	As(V)	50,81	145,72	156,80	160,17	165,75
1B + CA	As(tot)	165,44				
	As(III)	111,74	121,84	116,85	103,87	123,24
	As(V)	53,70	44,54	48,31	60,17	40,25
1B + CA/HAc	As(tot)	164,87				
	As(III)	114,97	120,00	115,01	97,74	94,87
	As(V)	49,90	44,96	50,83	66,77	68,09
1B + NaC	As(tot)	165,63				
	As(III)	108,20	118,88	106,10	104,18	110,10
	As(V)	57,43	47,00	57,99	60,00	55,10
1B + NaC/HAc	As(tot)	164,74				
	As(III)	106,44	98,22	76,56	66,37	54,22
	As(V)	58,30	65,44	89,07	95,79	107,32
1B + TAR	As(tot)	165,70				
	As(III)	130,97	80,36	82,46	76,05	84,03
	As(V)	34,73	83,55	83,12	86,14	80,82
1B + TAR/HAc	As(tot)	165,44				
	As(III)	108,13	114,69	104,15	97,61	87,93
	As(V)	57,31	50,32	62,34	66,56	75,52
1B + OKS	As(tot)	164,70				
	As(III)	105,20	97,90	74,07	26,86	10,49
	As(V)	59,50	68,64	88,96	137,03	156,33
1B + OKS/HAc	As(tot)	164,81				
	As(III)	99,25	86,39	67,76	62,31	51,34
	As(V)	65,56	78,92	96,93	103,08	113,57
1B + HAc	As(tot)	165,14				
	As(III)	17,92	16,01	76,25	61,79	63,05
	As(V)	147,22	148,50	89,06	102,58	99,12

Rezultati izraženi kao srednje vrijednosti duplikata (n = 2). – Nije mjereno.

Tablica 18. Rezultati ispitivanja stabilnosti omjera specija As(III)/As(V) u uzorku prirodne vode C s dodatkom različitih konzervirajućih sredstava

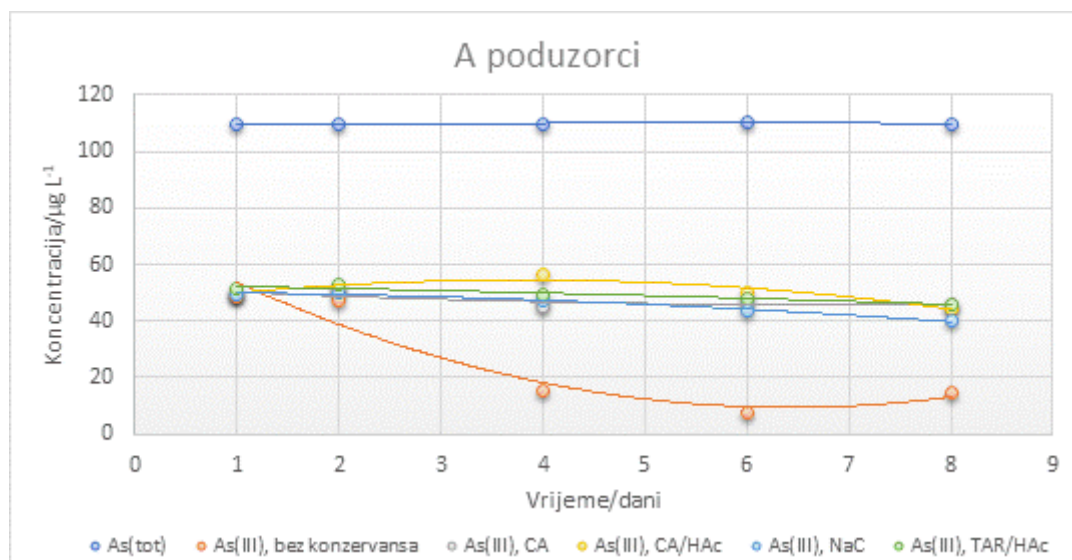
Uzorak	Dan	1	2	3	4	7
	Specija	Koncentracija/ $\mu\text{g L}^{-1}$				
1C	As(tot)	10,19				
	As(III)	7,32	7,00	0,05	0	0,00
	As(V)	2,87	3,30	9,852	10,10	10,10
1C + CA	As(tot)	10,38				
	As(III)	7,48	6,55	5,20	5,62	6,49
	As(V)	2,9	3,82	4,64	5,02	4,55
1C + CA/HAc	As(tot)	9,95				
	As(III)	8,09	8,22	8,49	8,96	8,04
	As(V)	1,86	2,01	1,94	1,26	2,54
1C + NaC	As(tot)	10,21				
	As(III)	8,5	8,61	8,80	7,21	9,18
	As(V)	1,71	1,79	0,99	3,21	1,46
1C + NaC/HAc	As(tot)	10,18				
	As(III)	6,18	6,5	5,81	6,50	4,07
	As(V)	4	3,81	4,44	3,04	6,10
1C + TAR	As(tot)	10,84				
	As(III)	8,59	8,36	6,90	5,23	7,77
	As(V)	2,25	1,90	2,75	3,87	3,14
1C + TAR/HAc	As(tot)	9,79				
	As(III)	9,78	9,02	6,66	7,99	8,29
	As(V)	0,02	1,25	3,23	1,44	2,21
1C + OKS	As(tot)	10,24				
	As(III)	8,82	8,32	8,02	7,14	7,25
	As(V)	1,21	1,95	3,49	2,90	2,19
1C + OKS/HAc	As(tot)	9,80				
	As(III)	8,99	7,95	4,18	6,99	6,25
	As(V)	0,81	3,51	5,64	3,50	3,66
1C + HAc	As(tot)	9,80				
	As(III)	1,14	1,65	2,33	2,79	1,93
	As(V)	8,67	8,32	7,87	6,79	8,49

Rezultati izraženi kao srednje vrijednosti duplikata (n = 2). – Nije mjereno.

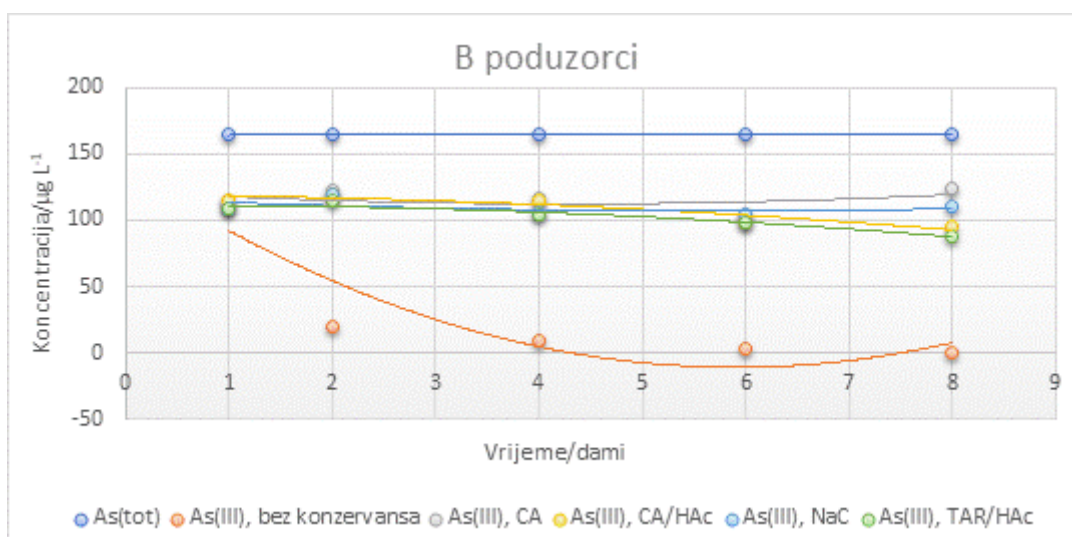
Tablica 19. Rezultati ispitivanja stabilnosti omjera specija As(III)/As(V) u uzorku prirodne vode D s dodatkom različitih konzervirajućih sredstava

	Dan	1	2	3	4	7
Uzorak	Specija	Koncentracija/ $\mu\text{g L}^{-1}$				
1D	As(tot)	16,57				
	As(III)	8,57	10,52	13,45	16,40	16,80
	As(V)	8,00	6,25	2,67	0,24	0,00
1D + CA	As(tot)	16,5				
	As(III)	8,3	8,56	8,31	9,10	11,42
	As(V)	8,2	8,23	8,63	7,76	5,46
1D + CA/HAc	As(tot)	16,70				
	As(III)	8,71	8,66	8,58	8,15	9,53
	As(V)	8,0	8,01	7,96	8,33	7,1
1D + NaC	As(tot)	16,60				
	As(III)	8,60	8,52	8,06	8,73	10,12
	As(V)	7,99	8,20	8,07	7,28	6,29
1D + NaC/HAc	As(tot)	16,47				
	As(III)	6,46	6,5	6,44	5,42	5,25
	As(V)	10,01	9,89	9,15	11,03	11,22
1D + TAR	As(tot)	16,66				
	As(III)	7,65	8,02	8,15	8,85	9,38
	As(V)	9,01	8,81	8,99	7,14	7,55
1D + TAR/HAc	As(tot)	16,59				
	As(III)	8,57	8,46	8,29	8,55	9,15
	As(V)	8,02	8,14	7,55	7,99	7,82
1D + OKS	As(tot)	16,46				
	As(III)	8,56	8,35	7,98	8,86	8,83
	As(V)	7,9	8,29	8,17	6,97	7,80
1D + OKS/HAc	As(tot)	16,05				
	As(III)	8,4	8,34	8,00	8,28	7,68
	As(V)	7,65	8,12	8,60	7,39	8,64
1D + HAc	As(tot)	15,98				
	As(III)	8,94	7,21	6,03	5,34	5,25
	As(V)	7,4	8,96	10,10	10,83	11,27

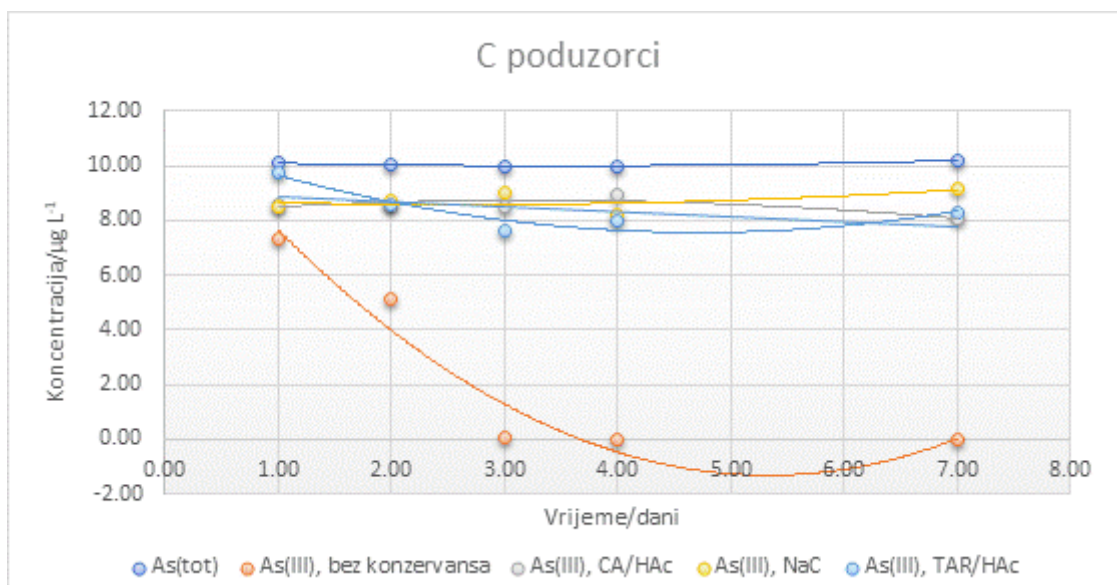
Rezultati izraženi kao srednje vrijednosti duplikata (n = 2). – Nije mjereno.



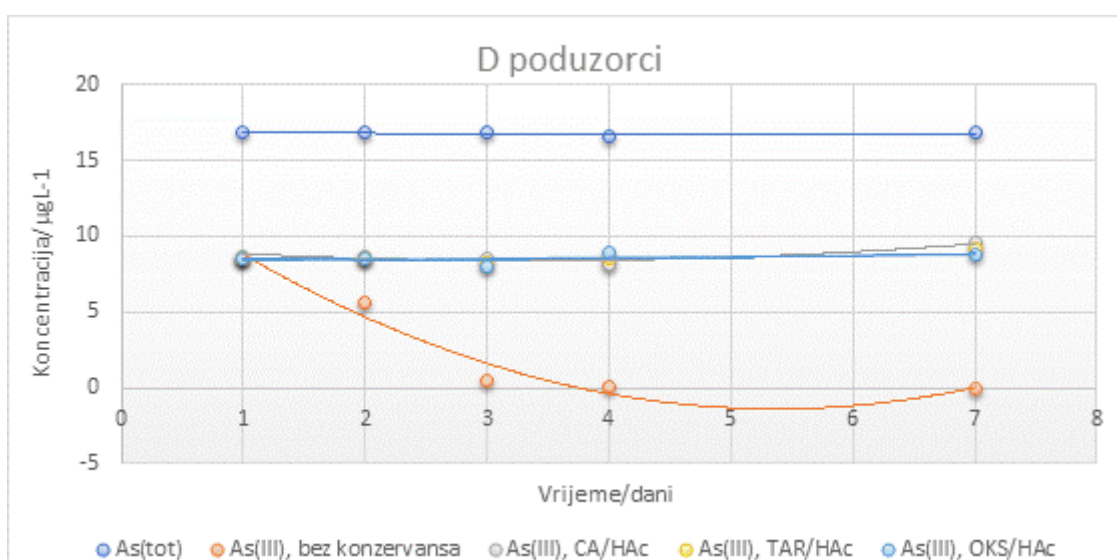
Slika 38. Stabilnost specije As(III) i As(tot) u uzorku prirodne podzemne vode A.



Slika 39. Stabilnost specije As(III) i As(tot) u uzorku prirodne podzemne vode B.



Slika 40. Stabilnost specije As(III) i As(tot) u uzorku prirodne podzemne vode C.

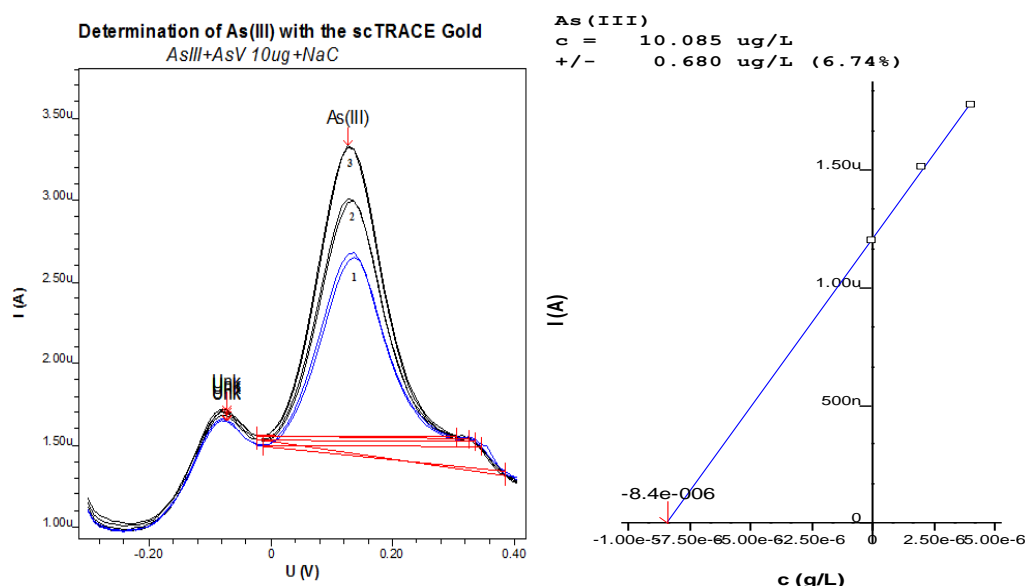


Slika 41. Stabilnost specije As(III) i As(tot) u uzorku prirodne podzemne vode D.

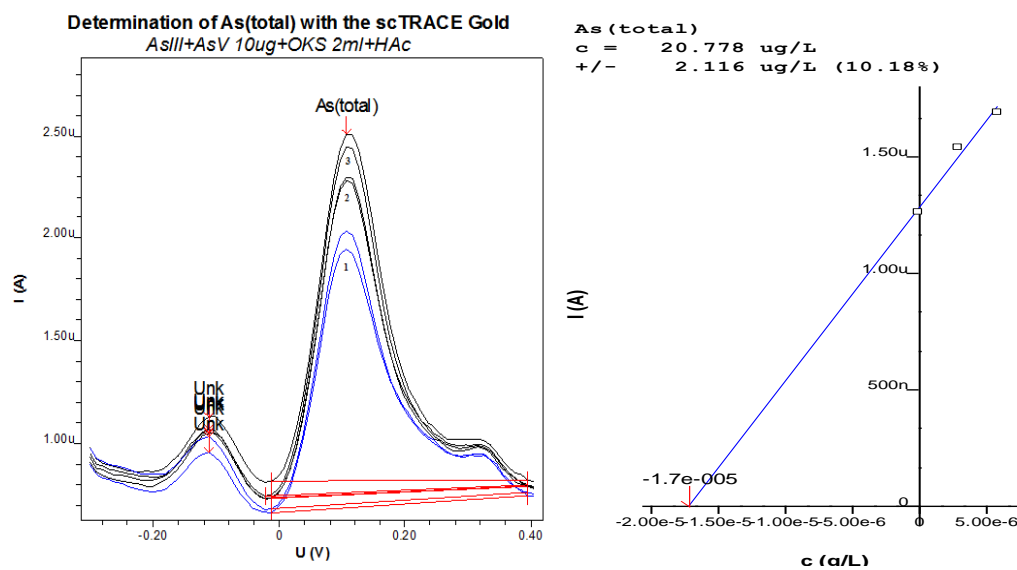
Iz slika je vidljivo kako navedeni konzervansi stabiliziraju specije arsena u realnim uzorcima tijekom sedam dana. Pri analizi specija arsena tehnikom ICP–MS može doći do odstupanja od točnih rezultata zbog prisutnosti drugih vrsta s vrijednostima m/z 75 i varijabilnosti ionizacije u plazmi što rezultira smanjenim ili povećanim intenzitetom signala. Određivanju anorganskih specija arsena smetnju mogu predstavljati i organoarsenovi spojevi koji eluiraju blizu anorganskih. U uzorcima podzemnih voda to nije slučaj, što je i dokazano mjerenjem ukupne koncentracije arsena.

4.4. Stabilnost specija As u modelnim uzorcima vode ispitana metodom voltametrije anodnog otapanja

Obzirom da je ICP–MS skupa i zahtjevna analitička metoda u radu je primijenjena i diferencijalna pulsna voltametrija anodnog otapanja (DPASV) kao opcija izbora te jeftinija i dostupnija tehnika. Otopine za analizu pripravljene su na isti način kao i one analizirane ICP–MS–om pri čemu je bilo potrebno razrijediti uzorke viših koncentracija na konačnu koncentraciju od $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Metoda voltametrije anodnog otapanja pokazala se pogodnom za analizu poznatih i niskih koncentracija arsenovih specija. DPASV voltamogrami određivanja koncentracije As(III) u standardnoj otopini koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom NaC sa scTRACE Gold elektrodom prikazani su na Slici 42. Voltamogrami određivanja ukupne koncentracije As(tot) u standardnoj otopini $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom OKS/HAc prikazani su na Slici 43.



Slika 42. Voltamogrami određivanja As(III) u modelnoj otopini As(III)/As(V) koncentracije $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom natrijeva citrata (NaC), $c(\text{NaC}) = 2 \text{ mmol L}^{-1}$ (1); (2) nakon prvog standardnog dodatka od $30 \mu\text{L}$ standardne otopine As(III) koncentracije $c(\text{As(III)}) = 1 \text{ mmol L}^{-1}$; (3) nakon drugog standardnog dodatka iste standardne otopine As(III), i odgovarajući analitički pravac.



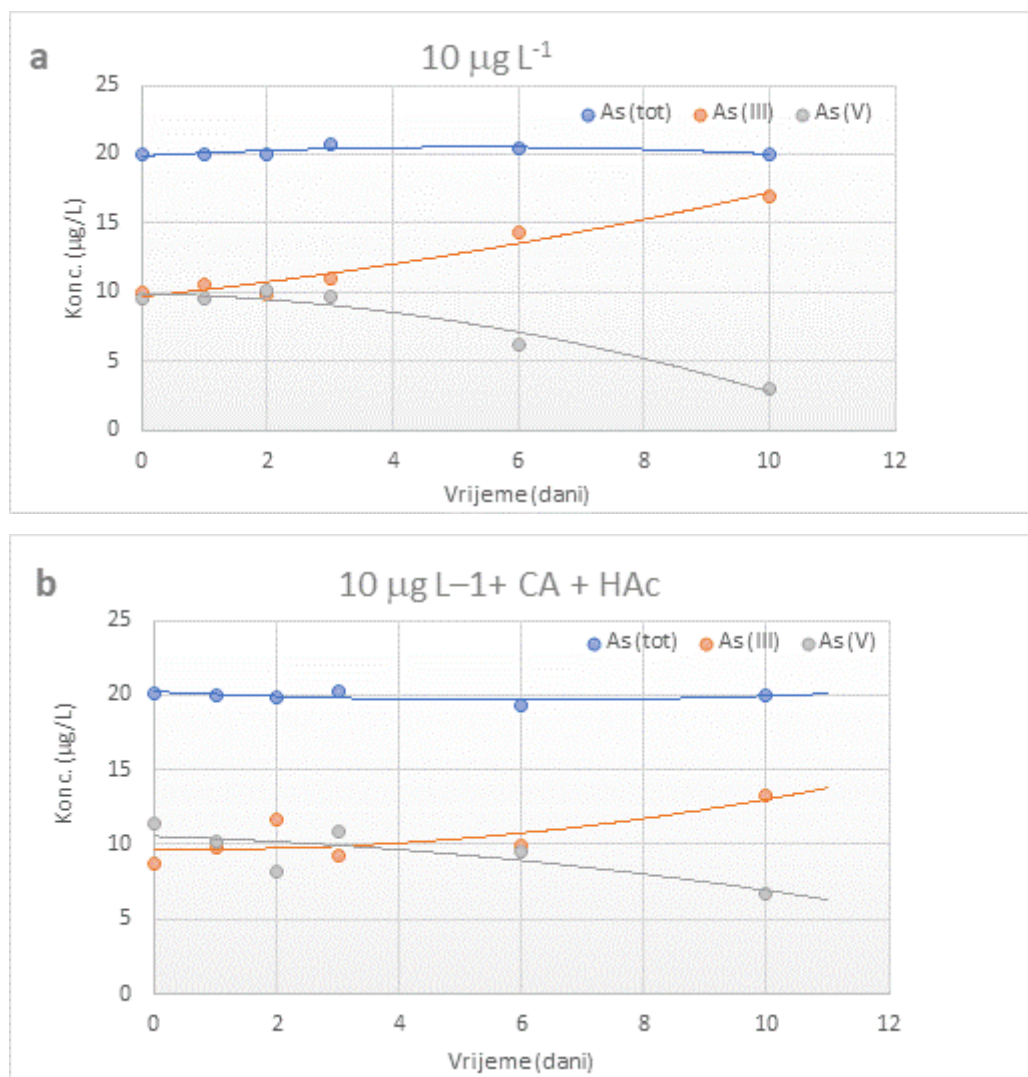
Slika 43. Originalni rezultirajući voltamogram određivanja As(tot) u modelnoj otopini As(III)/As(V) koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom OKS/HAc u konačnoj koncentraciji $c(\text{OKS}) = 2 \text{ mmol L}^{-1}$ (1) ; (2) nakon prvog standardnog dodatka od $50 \mu\text{L}$ standardne otopine As(V) koncentracije $c(\text{As(V)}) = 1 \text{ mmol L}^{-1}$; (3) nakon drugog standardnog dodatka iste standardne otopine As(V), i odgovarajući analitički pravac.

DPASV metodom određene su koncentracije As(tot) i As(III) u svim uzorcima tijekom vremena, a rezultati stabilnosti nekih modelnih uzoraka prikazani su na Slici 44. Ukupni rezultati ispitivanja stabilnosti modelnih uzoraka tijekom vremena prikazani su u Tablici 20.

Tablica 20. Utjecaj dodanih konzervansa na stabilnost specijacije arsena u modelnim uzorcima As(III)/As(V) koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Uzorak	Vrijeme nakon uzorkovanja/h						
	3	24	48	72	168	216	240
1: Bez konzervansa							
As(III)	10,01	10,91	9,85	11,00	14,30	-	17,01
As(V)	9,48	10,52	10,13	9,66	6,20	-	3,00
2: CA, $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$							
As(III)	9,84	9,11	-	9,14	10,14	18,10	16,50
As(V)	10,24	12,89	-	10,86	10,00	1,90	3,50
3: CA, $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} + \text{HAc}$							
As(III)	8,74	9,81	11,70	9,31	9,87	-	13,30
As(V)	11,42	10,19	8,13	10,89	9,50	-	6,70
4: NaC, $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$							
As(III)	10,09	9,46	9,83	3,4	3,79	-	-
As(V)	8,92	10,55	9,67	20,40	23,41	-	-
5: NaC, $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} + \text{HAc}$							
As(III)	9,75	9,46	8,40	9,71	9,57	9,90	5,50
As(V)	9,95	11,57	12,20	10,29	10,22	10,10	14,52
6: TAR, $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$							
As(III)	10,48	10,56	-	14,80	13,77	-	20,01
As(V)	7,62	8,16	-	5,80	6,33	-	0
7: TAR, $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} + \text{HAc}$							
As(III)	11,00	10,55	9,76	10,15	9,91	-	12,90
As(V)	9,54	9,63	10,84	9,47	10,74	-	7,10
8: OKS, $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$							
As(III)	10,30	10,15	10,60	10,10	10,40	-	11,08
As(V)	9,71	9,41	8,30	10,02	10,60	-	8,92
9: OKS, $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} + \text{HAc}$							
As(III)	10,06	9,60	6,75	6,87	7,40	6,05	-
As(V)	11,73	11,07	16,25	16,16	13,04	13,95	-
10: HAc							
As(III)	9,60	9,52	6,20	-	7,60	-	14,30
As(V)	10,55	10,48	14,75	-	12,43	-	6,70

Rezultati izraženi kao srednje vrijednosti duplikata (n = 2). - Nije mjereno.



Slika 44. Grafikoni koji prikazuju stabilnost As(tot) i specija arsena As(III) i As(V) u modelnim laboratorijskim otopinama (a) u DI vodi bez konzervansa i (b) s CA/HAc kao konzervansom. Otopine su sadržavale jednak omjer koncentracija As(III)/As(V) $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$, $\gamma(\text{As(tot)}) = 20 \mu\text{g L}^{-1}$.

Raspodjela redoks specija arsena ostala je nepromijenjena 2 dana u pokusu u DI vodi bez konzervansa. No dodatkom konzervansa, vrijeme stabilnosti specija arsena povećalo se na 5 dana i dulje. Na primjer, uz dodatak CA/HAc (Slika 44. (b)), otopina je bila stabilna 6 dana. Nakon tog razdoblja smanjena je koncentracija As(V) i povećana koncentracija As(III), kao i u nekonzerviranom uzorku. Isti trend uočen je za uzorake s većim koncentracijama As(III) i As(V) od $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 50 \mu\text{g L}^{-1}$. Uzorak konzerviran s NaC/HAc bio je stabilan 8 dana (Tablica 20.), a nakon toga došlo je do oksidacije As(III), dok je uzorak s TAR/HAc bio

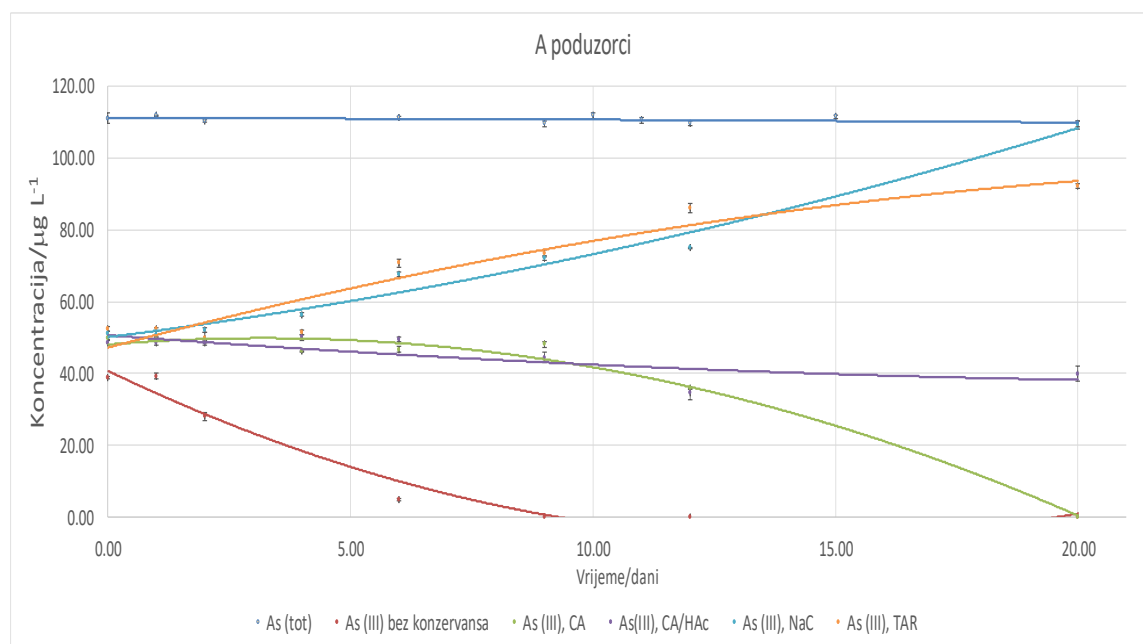
stabilan 7 dana. Ovi rezultati potvrđuju sporo smanjenje koncentracije As(V) u DI vodi¹¹. Usporedivi rezultati navedeni su za modelne uzorke vode u nekim radovima^{8,11}. Međutim, ovi rezultati nisu u skladu s rezultatima drugih autora koji su ustanovili manje od 3 % promjene u redoks raspodjeli As nakon 78 dana u uzorku zakiseljeno s HCl na pH 2^{184,185}. Uzorci bez dodatka HAc nisu bili stabilni dulje od 4 dana. U tim uzorcima uočeno je stvaranje algi nakon nekoliko dana, te se stoga preporuča zakiseljavanje uzoraka.

4.5. Stabilnost anorganskih specija arsena As(III/V) u uzorcima prirodnih podzemnih voda

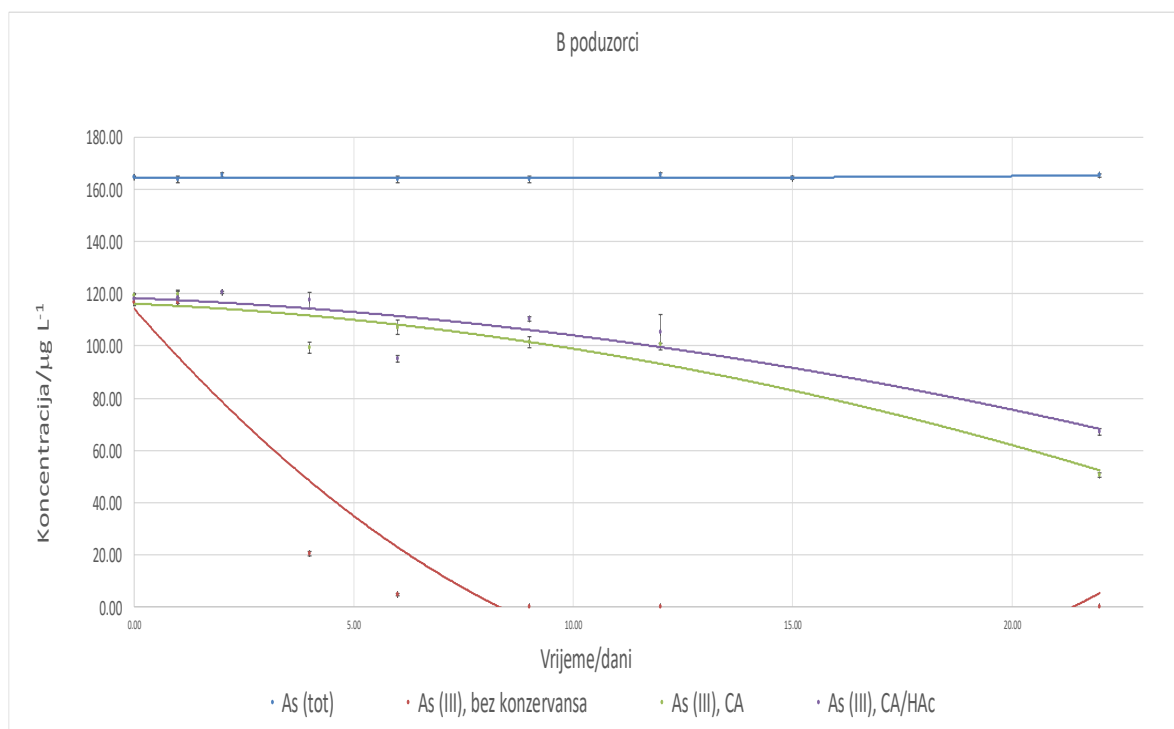
Arsen se u podzemnim vodama uglavnom nalazi u svojim anorganskim oblicima. U oksidacijskim uvjetima povećane koncentracije As(V) u podzemnim vodama javljaju se dominantno oksidacijom sulfidnih minerala, posebice arsenopirita. U redukcijskim uvjetima pri gotovo neutralnom pH As(III) je dominantna vrsta dobivena desorpcijom As vezanog na mineralne okside Fe i Mn¹⁸⁶. Područje Osijeka, u istočnoj Hrvatskoj, nalazi se u južnom dijelu Panonske nizine. U panonskom bazenu (Mađarska, Rumunjska, Hrvatska i sjeverna Srbija) resursi podzemnih voda imaju prirodno visoke razine arsena, što ga čini najvećim područjem u Europi u kojem visoke koncentracije ovog elementa utječu na kvalitetu pitke vode¹⁸⁷. Sveobuhvatan pregled problematike prirodnog onečišćenja arsenom u istočnoj Hrvatskoj dali su Ujević i sur.¹⁸⁸. Autori su analizirali uzorke podzemnih voda uzetih iz 56 bušotina. Arsen je otkriven u 46 od 56 uzoraka, a koncentracije su bile između 1,3 i 491 $\mu\text{g L}^{-1}$. U približno 64 % uzoraka koncentracije arsena prelazile su 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, a u 20 bunara koncentracije su bile iznad 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

U ovom doktorskom radu analizirane su anorganske specije arsena u četiri prirodna uzorka podzemne vode prikupljenima na području Hrvatske (Zagrebačka županija i Osječka županija). Jedan od ciljeva ispitivanja bio je ispitati učinak odabranih konzervansa u prirodnim uzorcima s većim i manjim sadržajem arsena i Fe, zbog čega su prikupljeni prirodni uzorci različitih koncentracija As i Fe s različitih područja (Tablica 14.). Sadržaj As(tot) i As(III) određen je prvog dana nekoliko sati nakon prikupljanja uzoraka i dodavanja konzervansa. Rezultati dobiveni voltametrijskom i UPLC–ICP–MS analizom za specije arsena potvrđeni su i određivanjem ukupnog arsena i Fe metodom ICP–MS. pH vrijednosti određene su u svim uzorcima. Uzorci prirodnih voda konzervirani su na isti način kao i modelni uzorci, a od jednog originalnog uzorka napravljeno je deset poduzoraka. Svi konzervansi dodani su na način kako

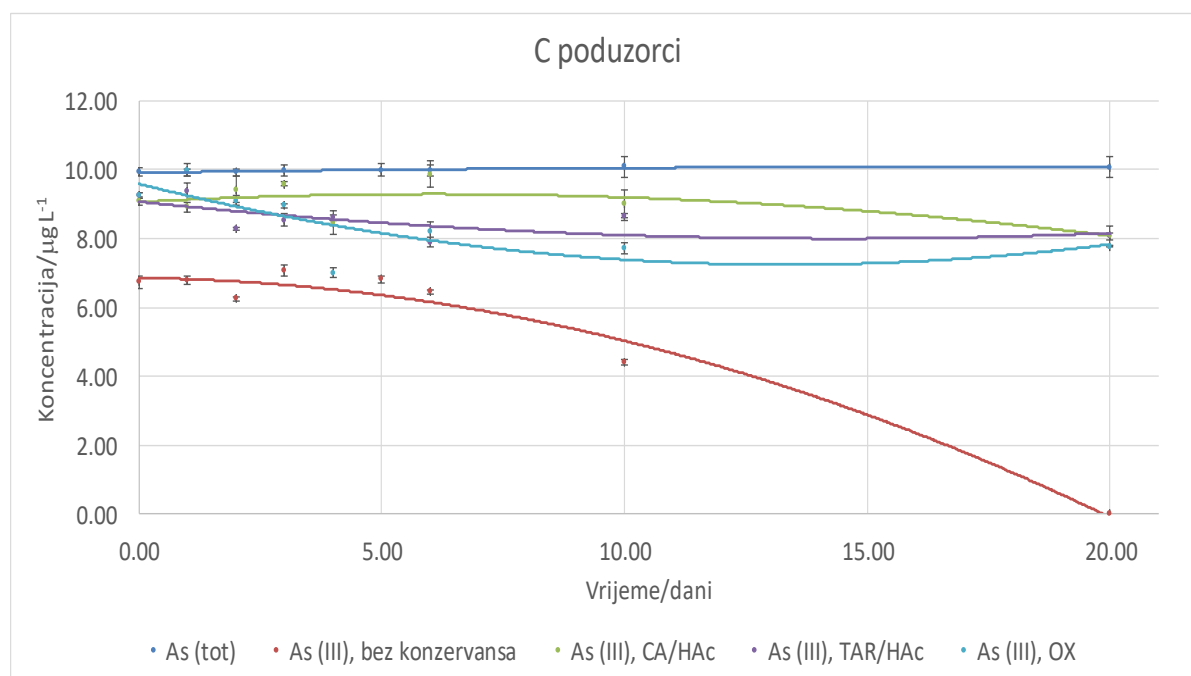
bi njihova konačna koncentracija iznosila $c = 2 \text{ mmol L}^{-1}$, dok je octena kiselina dodana kako bi joj ω (HAc) iznosio 5 %. Za sve poduzorke snimani su voltamogrami DPASV tehnikom dok nije došlo do potpune oksidacije As(III) ili redukcije As(V). Dobiveni rezultati prikazani su na Slikama 45 – 48.



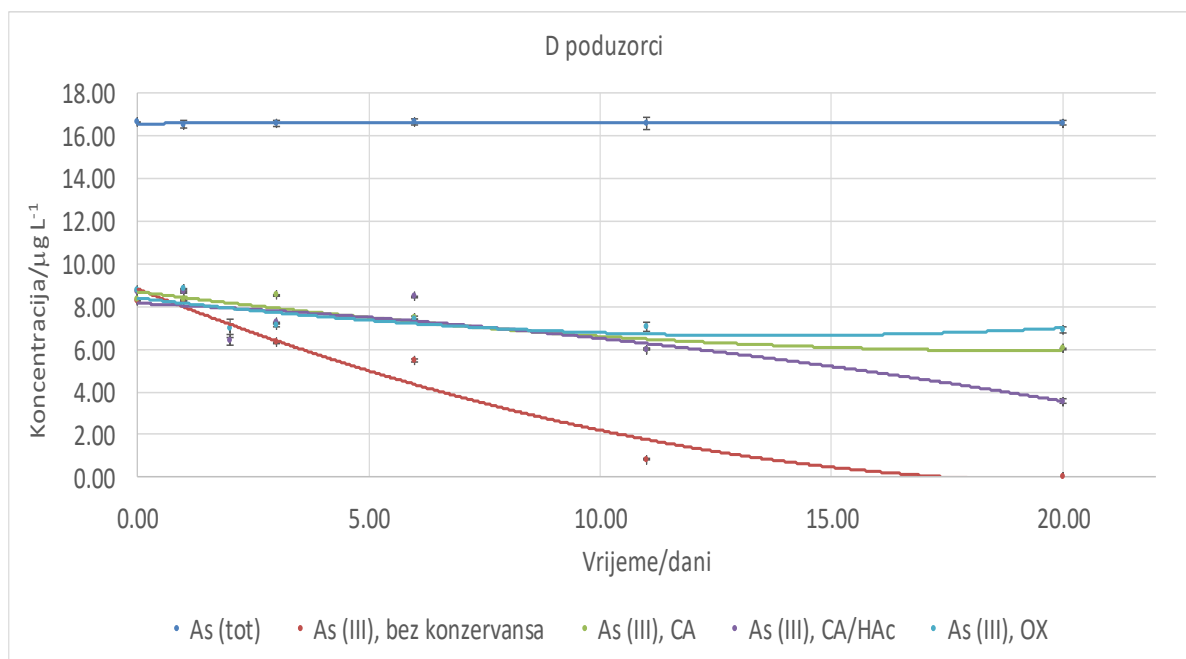
Slika 45. Stabilnost As(III) i As(tot) tijekom vremena, ovisno o primijenjenom konzervansu–prirodni uzorak vode A.



Slika 46. Stabilnost As(III) i As(tot) tijekom vremena, ovisno o primijenjenom konzervansu –prirodni uzorak vode B.



Slika 47. Stabilnost As(III) i As(tot) tijekom vremena, ovisno o primijenjenom konzervansu –prirodni uzorak vode C.



Slika 48. Stabilnost As(III) i As(tot) tijekom vremena, ovisno o primijenjenom konzervansu –prirodni uzorak vode D.

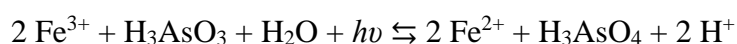
Na Slikama 45 i 46 prikazan je učinak različitih konzervansa na očuvanje omjera As(III/V) u prirodnim uzorcima vode iz Osječko-baranjske županije. Uzorak A imao je nižu koncentraciju anorganskog As(tot) od drugog uzorka (B) iz istog područja, ali veću koncentraciju Fe (Tablica 14.). Uzorak B imao je najveću koncentraciju As(tot) i As(III) od svih ispitanih uzoraka. U ta dva uzorka stabilnost specija As poboljšana je dodatkom CA i zakiseljavanjem s HAc. Ti su poduzorci bili stabilni 8 dana, dok je u neobrađenim uzorcima oksidacija As(III) uočena drugi dan nakon uzorkovanja. Iako je zabilježen dobar učinak očuvanja zakiseljavanjem prirodnih uzoraka⁶, dodavanje same HAc u početku je smanjilo sadržaj As(III) u uzorku B.

U uzorcima prikupljenima u Zagrebačkoj županiji, koja nije u panonskom bazenu, utvrđene su niže koncentracije As. U sva četiri uzorka redoks stabilnost As znatno je poboljšana konzerviranjem s CA i zakiseljavanjem s HAc, kao i dodatkom tartrata i oksalata. U uzorcima C i D uočena je mala razlika između tretiranih i netretiranih poduzoraka tijekom prvih pet dana, što se može vidjeti na Slikama 47 i 48.

Otopljeno Fe i Mn mogu utjecati na specije arsena u uzorcima podzemne vode bez prisutnosti kisika i uzorcima vode drenaža rudnika s visokom koncentracijom Fe. Kada podzemna voda koja se ispumpava na površinu tijekom uzorkovanja stupa u interakciju s atmosferskim kisikom, Fevi i Mnovi oksihidroksidi talože se i osiguravaju sorpcijska mjesta za

otopljene specije arsena¹⁸⁹. Oksidacija As(III) u As(V) fotokemijskim slobodnim radikalima također je moguća velikom brzinom, a ovisi o valnoj duljini i intenzitetu zračenja, pH i sastavu uzorka (matriks); As(III) se unutar njega oksidira nakon nekoliko sati izloženosti sunčevom zračenju u vodi koja sadrži Fe⁸. Oba procesa mogu utjecati na raspodjelu specija arsena ako uvjeti nisu kontrolirani.

Kako bi se specije arsena stabilizirale u njihovu izvornom stanju, redoks aktivnost koegzistirajućih Fe(III) i Fe(II) treba biti minimizirana. Stvaranje metalnih kompleksa može pomoći u smanjenju koncentracije slobodnih metalnih iona, čime se inhibira međupretvorba specija arsena. Pokretljivost arsena u podzemnim vodama uključuje desorpciju arsena iz precipitata željeznih oksida sedimenata vodonosnika i/ili oksidaciju arsenopirita (FeAsS), pa se As i Fe pojavljuju zajedno u većini podzemnih voda¹⁸⁵. Oksidacija As(III), zajedno s fotokemijskom redukcijom Fe(III), odvija se prema sljedećoj neto reakciji:



Hidroksilni radikali nastaju kada je pH > 2 i kada je uzorak vode koji sadrži Fe(III) izložen svjetlosti. Ovi radikali reagiraju s As(III) kako bi nastao međuprodukt As(IV), koji zatim reagira s Fe(III) i proizvodi Fe(II) i As(V). No oksidacija As(III) pomoću Fe(III) usporava se uz prisutnost Fe(II) i aniona koji kompleksiraju Fe i učinkovito se zaustavlja kada je svjetlost isključena⁷⁰.

U Tablicama 21 i 22 prikazani su zbirni rezultati koncentracija As(III) prvog i šestog dana uzorkovanja, kao i postotak odstupanja od početne koncentracije As(III) u prirodnim uzorcima vode. Vidi se da kombinacija CA/HAc kao konzervansa može očuvati specije arsena najmanje 6 dana na sobnoj temperaturi u uzorcima s nižim koncentracijama arsena i Fe (ne više od 10 % odstupanja). Ta je kombinacija bila uspješna za uzorak A, ali ne i za uzorak B, koji je imao najveću koncentraciju arsena i Fe. Moguće je kako količina dodanih konzervansa nije bila dovoljna za kompleksiranje te koncentracije Fe, ali je prikladna za niže koncentracije. S druge strane, NaC je bio uspješan u očuvanju raspodjele specija oko 6 dana u uzorcima C i D, ali ne i u uzorcima A i B.

Tablica 21. Rezultati konzerviranja arsena u prirodnim uzorcima podzemne vode A i B, u prisutnosti Fe upotrebom devet konzervansa.

Uzorak	A			B		
	Početna koncentracija As(III)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Koncentracija As(III) nakon 6 dana/ $\mu\text{g L}^{-1}$	% Odstupanja	Početna koncentracija As(III)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Koncentracija As(III) nakon 6 dana/ $\mu\text{g L}^{-1}$	% Odstupanja
Bez konzervansa	38,68	5,10	86,81	115,88	4,55	96,07
CA	50,00	46,20	7,60	118,73	100,90	15,02
CA/HAc	48,50	49,48	2,02	117,00	94,06	19,61
NaC	51,50	68,00	32,04	107,90	64,11	40,58
NaC/HAc	76,00	64,36	15,32	140,18	68,89	50,86
TAR	52,00	65,10	25,19	138,91	78,69	43,35
TAR/HAc	49,20	66,04	34,23	143,80	99,86	30,56
OKS	62,12	19,02	69,38	106,15	32,80	69,10
OKS/HAc	60,60	20,50	66,17	98,53	60,96	38,13
HAc	60,00	36,11	39,82	18,13	77,45	327,19

Tablica 22. Rezultati konzerviranja arsena, korištenjem devet konzervansa u prirodnim uzorcima podzemne vode C i D, u prisutnosti Fe.

Uzorak	C			D		
	Početna koncentracija As(III)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Koncentracija As(III) nakon 6 dana/ $\mu\text{g L}^{-1}$	% Odstupanja	Početna koncentracija As(III)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Koncentracija As(III) nakon 6 dana/ $\mu\text{g L}^{-1}$	% Odstupanja
Bez konzervansa	6,87	4,50	34,39	8,30	5,50	33,73
CA	9,00	4,80	46,67	8,35	7,43	11,02
CA/HAc	9,02	9,60	6,43	8,70	8,50	2,30
NaC	8,50	5,15	39,41	8,65	6,20	28,32
NaC/HAc	9,30	9,86	6,02	6,40	6,00	6,25
TAR	8,20	5,40	34,15	7,70	5,40	29,87
TAR/HAc	9,25	7,80	15,68	8,05	5,20	35,40
OKS	9,20	8,40	8,70	8,80	7,41	15,80
OKS/HAc	9,21	1,97	78,61	8,15	5,02	38,40
HAc	8,90	4,90	44,94	9,54	1,00	89,52

Ukupne anorganske koncentracije As(III)/As(V) bile su stabilne tijekom 7–dnevnog razdoblja za poduzorke tretirane s CA. Stoga je, bez tretmana, stvaranje koprecipitata Fe uzrokovalo znatan pad koncentracija prirodnog As, dok je tretman s CA inhibirao taj proces i očuvao prirodnu (izvornu) raspodjelu arsena u svim uzorcima vode upotrebljavanima u ovoj studiji. Specije arsena su nestabilne u prirodnoj vodi, a stabilnost ovisi o speciji/jama arsena, pH, precipitirajućim metalima kao što je Fe(II/III), drugim ionima, prisutnosti organskih tvari i

aktivnosti mikroba. Iako zakiseljavanje može biti izuzetno učinkovito u sprječavanju stvaranja HFO-a, zabilježeno je kako dovodi do brze oksidacije As(III) i reagira s arsenom povezanim s koloidnim materijalom¹¹, što su pokazali i naši rezultati za uzorke zakiseljene s dodatkom HAc. Garbarino i sur. upotrebljavali su EDTA za očuvanje uzoraka podzemne vode tijekom 3 mjeseca bez dodavanja octene kiseline¹⁶. No druge su studije pokazale da EDTA sama po sebi ne može očuvati omjer specija arsena te je potrebno podešavanje pH na 3,2 kako bi se inhibirala oksidacija Fe(II)¹⁹⁰. Naši su rezultati pokazali da ispitani konzervansi bez dodatka HAc mogu očuvati raspodjelu specija arsena do 6 dana, čak i u prisutnosti velike koncentracije Fe. Međutim, dodatak HAc se pokazao učinkovitim kod sprječavanja mikrobne aktivnosti u uzorcima. Takvi uzorci su ostali stabilni bez pojave obojenja i замуćenja. Očuvanje uzoraka dodatkom keselina može se upotrebljavati za širok raspon uzoraka površinskih i podzemnih voda koje sadrže otopljeno Fe. Međutim, iako su agensi za stvaranje kompleksa korisni za očuvanje uzoraka bogatih Fe, kombinacija agensa za kompleksiranje i HAc učinkovitija je u očuvanju specija arsena.

Odabir prikladne strategije očuvanja specija arsena ovisi i o analitičkoj metodologiji koju valja slijediti. Promjene u koncentraciji specija arsena tijekom pohrane uzorka ne ovise samo o upotrijebljenoj metodi očuvanja uzoraka, već i o prirodi uzorkovanih voda. Očigledno kontradiktorna izvješća objavljena o oksidaciji ili redukciji i dominantnim reakcijama koje se odvijaju tijekom pohrane, vjerojatno su rezultat varijacija u prirodi i aktivnosti mikrobnih zajednica koje prevladavaju u različitim vrstama vode i njihova odgovora na različite metode čuvanja uzoraka. Dokazano je da je kombinacija filtriranja, zakiseljavanja, hlađenja i čuvanja u mraku dovoljna da očuva specije arsena danima, čak i tjednima za neke vode. Smrzavanje uzoraka može biti nepoželjno jer može dovesti do nepovratne (pri topljenju) precipitacije arsenovih oksida. Dok je dokazano da zakiseljavanje može biti vrlo učinkovita tehnika očuvanja specija, Hall i sur. izrazili su zabrinutost zbog oksidativnih učinaka samih kiselina, stoga se učinkovitost upotrebe tehnika čuvanja mora procijeniti od slučaja do slučaja¹¹. Feldman je pokazao da askorbinska kiselina može očuvati specije As u razdoblju od 18 dana¹⁰. Međutim, Edwards i sur. izvijestili su da ni 0,1 % askorbinske kiseline ni HCl koncentracije $c = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ nisu bili učinkoviti za očuvanje anorganskih specija arsena u prirodnim vodama¹⁹¹. Sličan efekt za očuvanje uzorka dodatkom askorbinske kiseline uočen je i u ovom radu kod modelnih uzoraka, te je izostavljena u daljnjim ispitivanjima na prirodnim uzorcima vode.

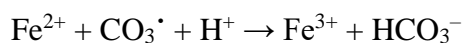
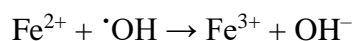
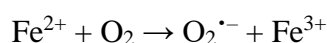
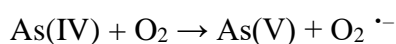
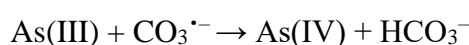
Mnogi su istraživači izvijestili o problemima s očuvanjem specija As u vodama bogatima željezom. Prema Aggettu i Kriegmanu uzorke je potrebno čuvati na pH 2,0 radi sprječavanja taloženja Fe i suprecipitacije arsena¹⁹². Preporučili su i čuvanje uzoraka na nižoj temperaturi (0 °C). Borho i Wilderer zaključili su da se uz dodatak HCl (pH < 2) i veliki višak Fe(II) koncentracija As(III) može održavati konstantnom najmanje 1 tjedan, čak i u kisikom zasićenim uzorcima koji sadrže Fe(III)⁶⁹. U našem ispitivanju potvrđeno je da se ispitanim konzervansima može stabilizirati omjer specija As do 6 dana uz blago zakiseljavanje s octenom kiselinom. Isto opažanje iznijeli su McCleskey i suradnici⁶. No pokazalo se da samo EDTA može očuvati specije As u neprozirnim bocama bez snižavanja pH vrijednosti³. Nasuprot tome, Gallagher i sur. izvijestili su da je pH potrebno sniziti na 3,2 octenom kiselinom pri upotrebi EDTA za očuvanje specija As u prisutnosti Fe(III)¹⁸².

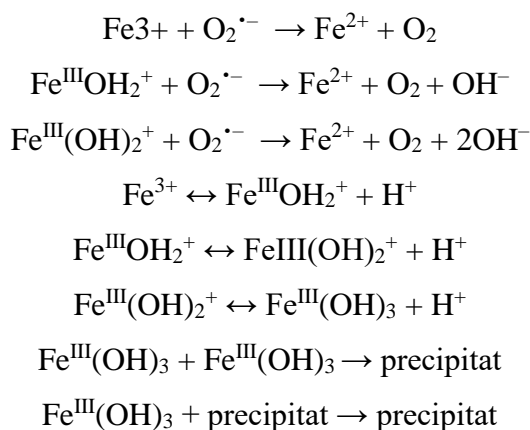
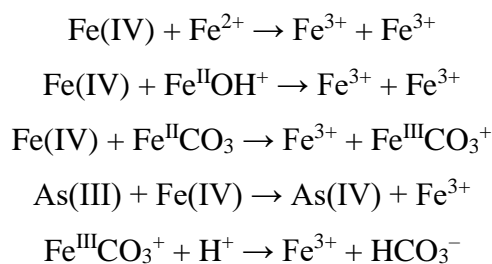
Nadalje, u većini je studija Fe(III) upotrijebljeno za utvrđivanje utjecaja Fe na očuvanje specija As. Razumnije je upotrijebiti Fe(II) jer se ono češće nalazi u As(III)–kontaminiranim podzemnim vodama, dok otopljeno Fe(III) nije prisutno. U početku su As(III)/As(V) u modelnim uzorcima vode (pH 8,4) bez Fe konzervirani s CA, NaC, TAR i OKS, kao i HAc. Eksperimentalni rezultati (Tablice 12 i 13) pokazuju kako su As (III) i As(V) bili stabilni 144 h (6 dana) kada je CA/HAc dodan kao konzervans. CA sama (rezultirajući pH 6,2) nije mogla očuvati specije arsena dulje od 3 dana. Nakon 24 h As(III) postupno je oksidiran do As(V), a oko 55 % oksidacije As(III) uočeno je nakon 168 sati (7 dana). Kada u modelne uzorke vode nije dodan konzervans, As(III) bio je stabilan do 24 h, a unutar 72 h oksidirano je 100 % As(III). Prema Eh–pH dijagramu arsena pri pH 8,4 i redoks potencijalu > +200 mV As(V) postoji kao HAsO_4^{2-} , i to je termodinamički stabilna vrsta. Dakle, pretvorba As(III) u As(V) bila je očekivana u modelnim uzorcima voda bez dodatka konzervansa.

Ovi početni eksperimentalni rezultati potvrdili su da je očuvanje nužno i da sama CA nije dovoljna za očuvanje raspodjele specija arsena u modelnim uzorcima voda, čak i u nedostatku Fe(II). Prema literaturi pri prirodnom pH Fe(II) u podzemnoj vodi može se sporo ili brzo oksidirati izlaganjem zraku. Pri pH 8,4, što je približno bio početni pH naših uzoraka prirodnih voda, Fe(II) oksidacija i stvaranje Fe(III) hidridratiziranih oksida mnogo je brže nego pri pH 6,4⁶. Nakon što se formiraju Fe(III) hidratizirani oksidi, oksidacija As(III) do As(V) u mraku postaje vrlo spora. Iako je pri pH 8,4 adsorpcija As(III) na Fe(III) hidratizirane okside minimalna u usporedbi s adsorpcijom As(V), gubitak male količine As(III) adsorpcijom ne može se zanemariti. Međutim, s konzervansom kao što je CA/HAc, TAR/HAc i OKS/HAc

specije As bile su stabilne dulje vrijeme. Rezultati u Tablicama 12 i 13, primjerice, pokazuju da bi CA/HAc ili NaC/HAc mogli sačuvati specije arsena oko 6 dana bez znatne promjene u njihovoj raspodjeli. Niža pH vrijednost i sposobnost kompleksiranja predloženih konzervanasa s Fe povećavaju stabilnost specija arsena u uzorcima vode. Predloženi konzervansi mogu formirati stabilne Fe komplekse u opsegu kiselog do neutralnog pH¹⁹³⁻¹⁹⁵. Octena kiselina može stvoriti slab kompleks s Fe, međutim Daus i sur. objavili su da bi sama octena kiselina mogla očuvati specije arsena samo nekoliko dana u vodi bogatoj željezom¹⁴. Naši su rezultati potvrdili ova zapažanja. Uzorci prirodne podzemne vode A i B, koji sadrže veliku koncentraciju Fe, bili su stabilni u prisustvu HAc samo 3 dana.

Kada je Fe(II) prisutan u prirodnim vodama mogući su procesi koji značajno utječu na raspodjelu specija arsena. U rasponu pH podzemne vode od 6,5 do 8,0 Fe(II) se oksidira nakon izlaganja zraku i taloži u obliku HFO. Kod većeg pH dolazi do oksidacije mnogo brže nego pri nižem pH. Brza oksidacija Fe(II) olakšava oksidaciju As(III). Međutim, kada nastane HFO, brzina oksidacije As(III) u zraku postaje vrlo spora⁶⁸ jer se As(V), a u manjoj mjeri As(III) adsorbiraju na HFO. Paralelno s nestankom Fe(II) zbog oksidacije otopljenim O₂ As(III) se djelomično oksidira u As(V). Kad oksidacija Fe(II) završi, As(III) ne oksidira se dalje s preostalom frakcijom oksidiranog As(III) u As(V). Veća razina oksidacije u bazičnom pH objašnjava se uvjetnim konstantama brzine oksidacije za Fe(II) ovisnima o pH, koje su navedene u literaturi¹⁹⁵. Do oksidacije As(III) dolazi zbog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (O₂^{•-}, H₂O₂, [•]OH ili drugi oksidirajući intermedijari) koje nastaju kao međuprodukti tijekom redukcije O₂ s Fe(II). Navedeno se može vidjeti iz sljedećih kemijskih reakcija:





Pri jako kiselim uvjetima i As(III) i As(V) vjerojatno grade termodinamički favorizirane As(III), H_3AsO_3 , i As(V), H_2AsO_4^- specije. U prisutnosti otopljenog kisika As(III) postupno oksidira u termodinamički favorizirane specije As(V). Te pretpostavke potvrđuju i naši eksperimentalni podaci koji su pokazali da je konzerviranje kombinacijom odabranih konzervanasa s HAc učinkovito za očuvanje specija arsena, a razlog može biti nastajanje stabilnog kompleksa konzervans–Fe. U većini naših ispitivanja promjene koncentracija As(III) i As(V) bile su unutar 10 % promjene tijekom 6 dana, što je pokazatelj uspješnog očuvanja specija arsen. Pokazano je da čak i pri visokim razinama Fe, CA/HAc mogao je sačuvati raspodjelu specija As više od 6 dana. Dodatno, izolacija od svjetlosti i hlađenje mogu usporiti proces pretvorbe specija arsena, ali ga ne moraju eliminirati.

S druge strane, dodatak H_3PO_4 mogao je samo sačuvati raspodjelu oko 168 h (7 d), a zatim je As(III) polako prešao u As(V)⁷. EDTA je snažno kelatno sredstvo koje stvara stabilne komplekse s Fe(II) ($\log K(\text{FeEDTA}) = 14,33$) i Fe(III) ($\log K(\text{FeEDTA}) = 25,1$) u kiselom do neutralnom pH području. Nadalje, kada se upotrebljava HAc s EDTA–om, pH se smanjuje na približno 3,2, kada je oksidacija Fe(II) s pomoću O_2 vrlo spora. Ovakav zaključak može se primijeniti i u našem istraživanju za kombinirane konzervanse s HAc. Dakle, kombinacija tvari

koje kompleksiraju Fe i HAc učinkovita je kao konzervans jer kompleksira Fe(II), usporava njegovu oksidaciju, a usporava i oksidaciju As(III) kataliziranu Fe(II)/(III).

Oksidacija As(III) u As(V) općenito se događa putem mikrobne oksidacija i fotooksidacije u prisutnosti Fe(III) ili drugih jakih oksidansa⁷⁰. Ovdje se ne sumnja na fotooksidaciju kao mehanizam jer su uzorci bili izloženi svjetlu samo tijekom pripreme za analizu. Suvišak konzervirajućeg sredstva trebao bi kompleksirati Fe (ili druge oksidanse kao što je Mn) i učiniti ga nedostupnim za redoks reakciju. Uzorci vode filtrirani su filtrom od 0,45 µm kako bi se eliminirala većina mikroba. Čak i tako, proces je dovoljno spor pri uvjetima čuvanja i pohrane koji su se upotrebljavali u ovom radu (čuvanje na +4 °C).

4.6. Ekotoksični učinak arsena na *Daphnia magna* sp.

4.6.1. Rezultati testa akutne imobilizacije vodenbuhe (*Daphnia* sp.)

Detekcija i kvantifikacija spojeva koji su prisutni u vodenim ekosustavima prvi je korak u procjeni utjecaja različitih tvari iz okoliša na žive organizme. No pojedinačne vrijednosti koncentracija tvari ne daju informacije o kumulativnom ili antagonističkom efektu. Stoga su zadnjih desetljeća razvijeni različiti pristupi utemeljeni na integraciji vrijednosti pojedinačnih mjerenja u jedinstveni indeks koji predstavlja ukupnu mjeru rizika za organizme. Takav pristup uključuje određivanje koncentracije svih tvari prisutnih u vodenom okolišu, a zatim i detekciju najniže koncentracije pojedinačnih tvari s toksičnim utjecajem na modelni organizam (*Daphnia magna*, *Selenastrum subcapitata*, *Pimephales promelas*, *Danio rerio*, itd.). Najčešće se kao efekt akutnog izlaganja prati najniža koncentracija tvari koja dovodi do 50 % smrtnosti (engl. *lethal concentration 50*, LC₅₀), dok se za analizu kroničnog izlaganja upotrebljava pretpostavljena koncentracija tvari koja ne dovodi do efekta u organizmima (engl. *predicted no-effect concentration*, PNEC).

Određivanje inhibicije pokretljivosti *Daphnia magna* Straus (engl. *Behavioural Swimming Responses*, BSR) jedan je od najosjetljivijih biomarkera toksičnosti¹⁹⁶. Takva metoda ispitivanja akutne imobilizacije istovjetna je smjernici OECD TG 202 (2004)¹⁶⁶, a upotrebljava se za ocjenjivanje učinaka kemikalija na vodenbuhe u testu akutne toksičnosti. Toksičnost As na *D. magna* dobro je dokumentirana u literaturi. Pokazalo se da je anorganski arsen općenito toksičniji od organskih oblika, a As(III) je dokazano toksičniji od As(V)^{197–199}. U vodenom okolišu mnogi čimbenici (kao što su oksidacijsko stanje, tvrdoća, adsorbirajuće površine,

biološko posredovanje, otopljeni organski ugljik i pH) mogu utjecati na bioraspoloživost arsena i toksičnost za izložene organizme^{1,200-202}. Stoga je važno istražiti toksičnost arsena na vodene organizme, koja ovisi o karakteristikama spoja, koncentraciji i vremenu izlaganja.

Provedena su ispitivanja tolerancije arsena na *D. magna* sp. Nakon 24 h i 48 h zabilježen je broj uginulih organizama, izračunata je smrtnost, a rezultati su prikazani u Tablicama 23 i 24. U Tablici 23 navedeni su rezultati preliminarnih ispitivanja tolerancije *D. magna* na As(III), As(V) i SPION nižih koncentracija ($\mu\text{g L}^{-1}$). Navedene koncentracije ne uzrokuju zapaženu smrtnost dafnija. Nijedna koncentracija nije izazvala smrt 50 % jedinki, stoga nije bilo moguće izračunati vrijednosti LC₅₀. Nakon toga se izvršilo potvrdno ispitivanje s višim razinama koncentracija, a rezultati tog pokusa predstavljeni su u Tablici 24.

Tablica 23. Akutna toksičnost As(III), As(V) i SPIO nanočestica nakon 24 i 48 h ispitana na testnom organizmu *D. magna* pri nižim razinama arsena.

Specija	Koncentracija $\mu\text{g L}^{-1}$	Broj živih <i>D. magna</i> nakon 24 h (%)	PIN (24h)	Broj živih <i>D. magna</i> nakon 48 h (%)	PIN (48h)
As(III)	0,05	100	0	100	0
	0,1	100	0	100	0
	0,25	100	0	100	0
	0,5	100	0	100	0
	0,75	100	0	95	5
	1,5	100	0	100	0
	3	100	0	90	10
As(V)	2,5	100	0	100	0
	7,5	25	75	20	80
	10	30	70	15	85
	12,5	10	90	0	100
	15	0	100	0	100
As(III)/SPION	0,5+10	100	0	90	10
	0,25+50	100	0	75	25
	0,5+50	80	20	95	5
As(V)/SPION	10+10	25	75	15	85
	10+50	5	95	5	95
Kombinacija As(III)/As(V)/SPION	0,1+2,5+10	100	0	90	10
	0,1+10+10	5	95	0	100
	0,5+2,5+10	100	0	95	5
	0,75+2,5+10	90	10	85	15
KONTROLA		100		95	

Tablica 24. Akutna toksičnost As(III), As(V) i SPIO nanočestica nakon 24 i 48 h ispitana na testnom organizmu *D. magna* pri višim razinama arsena, uz pripadajuće vrijednosti LC₅₀.

Specija	Koncentracija/ mg L ⁻¹	Broj živih D. magna nakon 24 h (%)	PIN (24h)	Broj živih D. magna nakon 48 h (%)	PIN (48h)
As(III)	0,5	100	0	40	60
	1	90	10	40	60
	2,5	100	0	40	60
	5	60	40	10	90
	7,5	0	0	0	100
	10	0	0	0	100
LC₅₀		5,069		4,899	
As(V)	5	90	10	90	40
	10	60	40	40	60
	25	0	100	0	100
	50	0	100	0	100
	75	0	100	0	100
	100	0	100	0	100
LC₅₀		10,270		10,270	
SPION	10	90	10	80	20
	50	100	0	80	20
	100	100	0	40	60
	150	100	0	20	80
LC₅₀		11,510		7,990	
Kombinacija As(III)/As(V)/SPION	0,5+5+10	90	10	80	20
	5+50+100	0	100	0	100
	10+100+400	0	100	0	100
	30+5+5	0	100	0	100
	10+10+10	0	100	0	100
LC₅₀		0,581		0,580	
KONTROLA		100		95	

Rezultati su smatrani valjanima ukoliko su sve jedinke u kontrolnom uzorku preživjele. Na preživljavanje *D. magna* (Tablica 24) As(III) nije utjecao nakon 24 h do razina od 5,0 mg As L⁻¹; dok je nakon 48 h broj preživjelih bio 40 % već za najnižu ispitanu koncentraciju.

S druge strane, kada je izložena vodi koja sadrži As(V), nijedna jedinka nije preživjela na razinama koncentracija višim od 25 mg As L⁻¹ već nakon 24 h. Znatna inhibicija pokretljivosti *Daphnia magna* nije uočena pri koncentraciji od 5 mg As L⁻¹. Izračunate vrijednosti LC₅₀ za As(III) i As(V) na *D. magna* iznosile 5,069 i 10,27 mg As L⁻¹ nakon 24 h izloženosti, te 4,899 i 10,27 mg As L⁻¹ nakon 48 h. U usporedbi s prethodnim studijama As(V), *D. magna* ima veću

otpornost od *Moina macrocopa*²⁰² i *Neocaridina denticulata*²⁰³, ali manji otpor od *Carassius auratus*²⁰², *Poecilia reticulata*²⁰⁴ i *Oryzias latipes*²⁰⁴.

Kada se radi o utjecaju SPIO nanočestica na preživljavanje *D. magna*, određene vrijednosti LC₅₀ su iznosile 11,51 mg SPION L⁻¹ nakon 24 h, te 97,99 mg SPION L⁻¹ nakon 48 h. Za ispitivanje utjecaja smjesa As(III), As(V) i SPION priređene su smjese različitih koncentracija pojedinih komponenti. Povećanjem koncentracije As(III) iznad 5 mg L⁻¹, te povećanjem koncentracije SPIO nanočestica na 100 mg L⁻¹ *D. magna* u vodenoj sredini je potpuno inhibirana.

Prosječna koncentracija arsena u zemljinoj kori procijenjena je na 1,5–2 mg kg⁻¹. Kontaminacija podzemnih voda najvažniji je problem vezan uz izloženost spojevima arsena. Riječ je o anorganskim specijama As, dok su organski spojevi znatno manje toksični ili potpuno netoksični. Toksičnost anorganskog As uključuje promjene na koži (hiperkeratoze, pa i rak kože), neurotoksičnost i karcinogenost, a postoje indicije da bi mogao djelovati i kao reproduktivni i razvojni toksin te izazvati dijabetes. Kardiovaskularna toksičnost arsena povezuje se s hipertenzijom i tzv. bolešću crnih stopala. Za As(III), neutralna specija arsenita H₃AsO₃ je dominantna specija u području pH vrijednosti 5–9, u skladu s nalazima Sharpe i Sohna²⁰¹. Kako pH raste od 5,0 na 9,0 postotak H₃AsO₃ opada dok postotak H₂AsO₄ raste. Za As(V) postoje 2 glavne specije u rasponu pH od 5,0 do 9,0 (H₂AsO₃ i H₂AsO₄). Mnoge prethodne studije izvijestile su da 48–h LC₅₀ vrijednosti su se kretale od 1,51 mg L⁻¹ do 9,10 mg L⁻¹ anorganskog As za dafnide^{205–207}. Za usporedbu, vrijednosti akutne toksičnosti dobivene ovom studijom su unutar raspona takvih rezultata za anorganske specije arsena u *D. magna*.

Na toksičnost arsena mogu utjecati mnogi čimbenici okoliša. Među njima, nanomaterijali mogu adsorbirati arsen i promijeniti njegovu bioraspodjeljivost u organizmima. Nanomaterijali (NM) imaju karakteristične fizikalne i kemijske značajke, npr. brzu difuziju, velike površine, reaktivnost u tekućoj ili plinovitoj fazi i male veličine²⁰⁸. Nanomaterijali se koriste u komercijalne svrhe u građevinarstvu, poljoprivredi, elektronici i farmaceutskoj industriji^{209–211}. Globalna proizvodnja NM–a, procijenjena na 58 000 tona godišnje od 2020., rezultirat će značajnim oslobađanjem nanočestica (engl. *nanoparticles*, NP) u okoliš^{211,212}. Budući da proizvodnja dizelskih automobila, motocikala i metalurgija ispušta NP u zrak, njihova pojava u okolišu utječe na kvalitetu života^{214,215}. Tijekom posljednjeg desetljeća provedena su mnoga istraživanja o toksičnosti NP–a^{216,217}. U većini proučavanih NP–a njihova je toksičnost bila povezana s oksidativnim stresom uzrokovanim reaktivnim kisikovim specijama (ROS)^{218,219}.

NP-ovi također mogu pokazati toksičnost reakcijom s biološkim makromolekulama ili otpuštanjem toksičnih sastojaka, kao što su metalni ioni^{219,220}. Nanomaterijali mogu zajednički djelovati s već postojećim onečišćivačima, što rezultira bioakumulacijom i/ili toksičnošću. Stoga su ishodi interakcija između NP-a i koegzistirajućih onečišćivača postali sve učestalije pitanje znanstvenog istraživanja²²¹. Na primjer, onečišćenje vode i tla teškim metalima, kao što su kadmij (Cd), arsen (As), olovo (Pb), nikal (Ni) i bakar (Cu), postalo je ozbiljan globalni ekološki problem zbog pojačanih antropogenih i industrijskih aktivnosti^{222–224}.

Međutim, studije o dugoročnim učincima arsena u prisutnosti nanočestica su ograničene. Tako je 21-d učinak nanočestica titanovog dioksida (nano TiO₂) na kroničnu toksičnost arsena (arsenat i arsenit) istražen u dvije generacije *Daphnia magna*. Koncentracija nano TiO₂ bila je 1 mg L⁻¹, a koncentracija As(III) ili As(V) bila je 0,2 mg L⁻¹. Utvrđeno je da nano TiO₂ značajno ublažava smrtnost i inhibiciju reprodukcije As na *D. magna*²²⁵. Vjerojatno je da nano TiO₂ mijenja metabolizam i stanje adsorpcije arsena u gastrointestinalnom traktu *D. magna*. Općenito, ovi rezultati pokazuju da bi povećanje adsorpcije arsena na nano TiO₂ u crijevima *D. magna* moglo ublažiti toksičnost arsena. Unatoč tome, potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se proučio utjecaj arsena na više generacija vodenih organizama, posebno kada je kombiniran s drugim tvarima²²⁵.

Metabolizam arsena igra ključnu ulogu u njegovom toksičnosti i uključuje redukciju arsena u trovalentni oblik, nakon čega slijedi metilacija. Yin i sur. su procijenili metabolizam arsena u *Tetrahymeni thermophila*, i opaženo je nakon 48 sati izlaganja, da je otopljeni arsenat As(V) preveden u arsenit As(III) i metilirane oblike²²⁶. Arsen ima veliki potencijal za bioakumulaciju u životinjama i povrću, a čovjek je izložen putem uzimanja onečišćene hrane^{222,223}. Time se procjenjuje da je ispitivanje toksičnosti arsena na osjetljivim vodenim organizama ključno za očuvanje ekosustava i kako bi se spriječila onečišćenje i bioakumulacija kod ljudi. Takve ocjene, koristeći ekotoksikološki pristup, dopuštaju procjenu izravnih učinaka samog arsena, odnosno njegovog djelovanja povezanog s drugim tvarima^{227,228}.

Cladocerani se nalaze u prijelaznoj zoni u vodenim prehrambenim lancima, između proizvođača i sekundarnih potrošača i mogu se smatrati bitnim za prijenos tvari kroz trofički lanac, koji se koristi u ekotoksikološkim studijama o toksičnosti arsena²²⁹. U vrstama zooplanktona poput cladocerana, maksimalna podnošljiva koncentracija arsena je 3,9 mg L⁻¹. Nasuprot tome, neke mikroalge toleriraju do 29,91 mg L⁻¹²³⁰. Literaturne vrijednosti toksičnosti As(III) kod cladocerana su sljedeći: *Daphnia carinata* LC₅₀ = 0,55 mg L⁻¹; *D. pulex*,

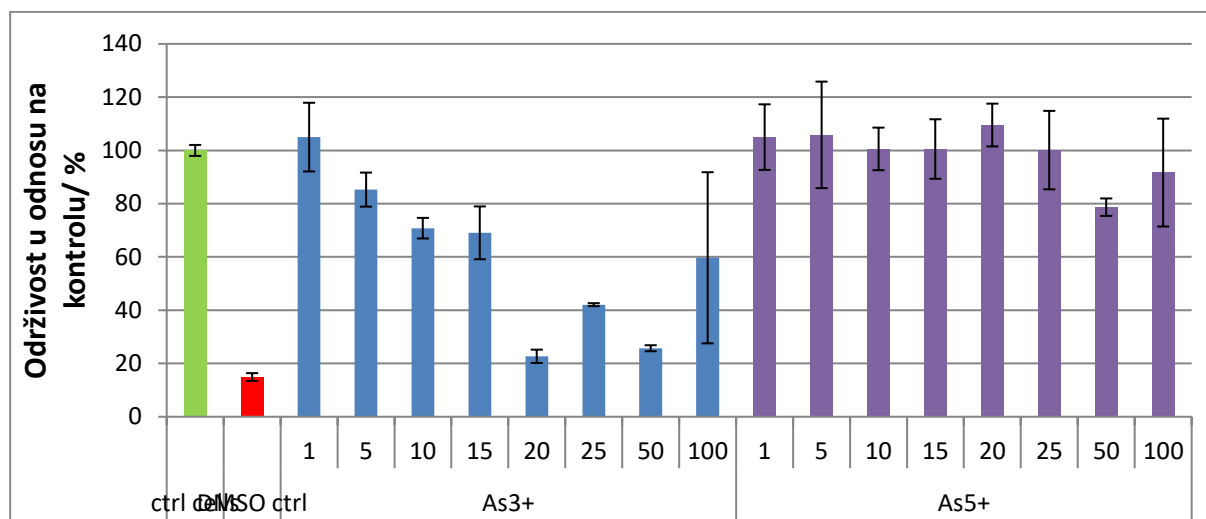
1758, $LC_{50} = 2,5 \text{ mg L}^{-1}$, *Ceriodafnija usp. dubia* $LC_{50} = 1,58 \text{ mg L}^{-1}$. Za As(V) vrijednosti su *Daphnia carinata* $LC_{50} = 2,44 \text{ mg L}^{-1}$, *D. pulex* $IC_{50} = 3,9 \text{ mg L}^{-1}$ i *Ceriodaphnia usp. dubia* $LC_{50} = 1,72 \text{ mg L}^{-1}$. Toksičnost As(III) i As(V) oscilira između 0,15 i 29,91 mg L^{-1} u mikroalgama kao što je *Chlorella sp.* i Makrofiti *Elodea canadensis*, *Lemna minor* i *Monoraphidium arcuatum*²³¹.

Povećana toksičnost arsena u prisutnosti Fe, pokazuje rizik od kontaminacije u vodenom okolišu prirodno bogatom ovim metalom²²⁰. Iako je Fe važan nutrijent, u suvišku može biti izrazito otrovan, posebno promicanjem reakcije i otpuštanja fenton hidroksilnih iona²³¹. Alternativa korištenju soli Fe mogla bi biti adsorpciju na organske spojeve kako je predloženo od Fagundes i sur., koji je koristio kompleks Fe–hitozana(III) za uklanjanje arsenata iz površinskih voda, uz mnoge druge adsorbense niske cijene kao što su suhe biljke, crveni mulj, lebdeći pepeo i zeoliti²³². Nadalje, povoljno okruženje, bogato hranjivim tvarima, može potaknuti stvaranje sredstva za detoksikaciju, kao što je metalotionin, vežući se na ione arsena, što čini ovaj ametal nedostupnim²²². Za mnoge autore, metalotionin se proizvodi u situacijama stresa, kao što je kontaminacija metalima te igra ključnu ulogu u smanjenju toksičnosti selena, kadmija, cinka, bakra, srebra i arsena između ostalih^{222,226,227}.

4.7. Citotoksični učinak arsena na staničnu liniju HepG2

4.7.1. Rezultati in vitro testa viabilnosti HepG2 stanica u prisustvu arsena

Jetra je ciljani organ karcinogeneze arsena, stoga je odabrana stanična linija HepG2 ljudskog hepatoma za procjenu toksičnosti specija As. U ovom smo radu odredili citotoksičnost As(III) i As(V), kao i kombiniranu citotoksičnost anorganskih specija As i Fe na staničnoj liniji HepG2. Utjecaji As na smanjenje vitalnosti HepG2 stanica izazvano anorganskim As, kao i utjecaj smjese As i Fe praćeni su tijekom 24 h, nakon čega je određeno njihovo preživljenje u odnosu na netretirane stanice (negativnu kontrolu). Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost održivosti stanica (relativna viabilnost stanica izračunata iz vrijednosti apsorbancije kao postotak u odnosu na kontrole) o koncentracijama As(III), As(V) i SPIO nanočestica. Rezultatai su iskazani kao srednja vrijednost s pripadajućim standardnim devijacijama. Rezultati viabilnosti HepG2 stanica izloženih različitim koncentracijama As(III) i As(V) prikazani su na Slici 49.



Slika 49. Vijabilnost stanica HepG2 izloženih As(III) koncentracija 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 i 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ i As(V) koncentracija 10, 25, 50, 75, 250, 500 i 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ u odnosu na kontrolu. Ispitivanja citotoksičnosti izvedena su u tri neovisna pokusa s 96 jažica, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost uz pripadajuću standardnu devijaciju (STDEV).

Iz grafičkog prikaza (Slike 49) vidljivo je kako se povećanjem koncentracije As smanjuje proliferacija HepG2 stanica. Također, vidljivo je kako tijekom 24 h tretmana HepG2 stanica nijedna od ispitivanih koncentracija As(V), izuzev najvećih koncentracija (500 i 1000 μM), ne djeluje citotoksično na HepG2 stanice. Za razliku od As(III) nakon 24 h tretmana HepG2 stanica s As(V) nema indukcije proliferacije čak ni u koncentraciji od 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tako da nije bilo moguće izračunati vrijednost LC₅₀.

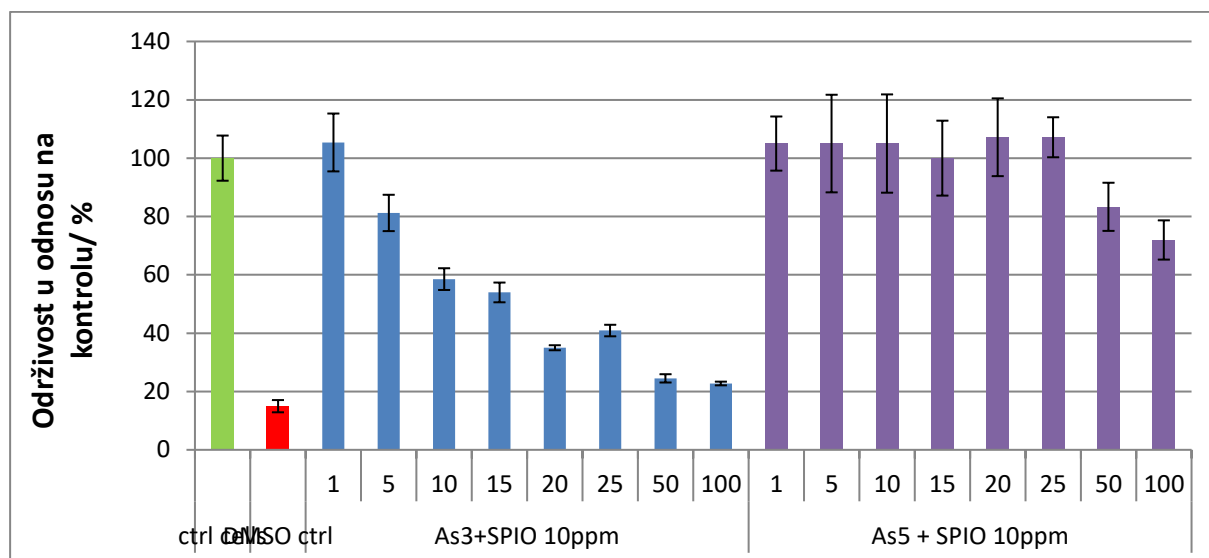
Vijabilnost stanica HepG2 izloženih As(III) značajno se smanjuje povećanjem koncentracije As(III). Smanjenje viabilnosti stanica izloženih As(III) koncentracije 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ As iznosilo je oko 80 %, što upućuje na to da As(III) inducira znatnu citotoksičnost u HepG2 stanicama. Izračunata vrijednost LC₅₀ za As(III) iznosi 5,437 ppm. Tijekom 24 sata tretmana HepG2 stanica vidljivo je statistički značajno smanjenje preživljenja. Taj je rezultat dosljedan prethodnom izvješću o ispitivanju citotoksičnosti As na ljudskim stanicama pluća²³³. Dobiveni rezultati upućuju na to da su stanice jetre u ispitanim eksperimentalnim uvjetima bile relativno slabo osjetljive na toksični učinak As(V). Povećan toksični učinak mogao bi se postići nakon produžene izloženosti (48 h). Ta se zapažanja mogu dovesti u vezu s metaboličkim statusom stanica, koje su zadržale brojne enzimske sustave odgovorne za biotransformaciju kemikalija. Epidemiološke studije i klinička opažanja pokazuju da je izloženost arsenu povezana s povećanom incidencijom obolijevanja ljudi, uključujući rak kože, jetre, bubrega, pluća, prostate

Amra Alispahić *Doktorska disertacija*

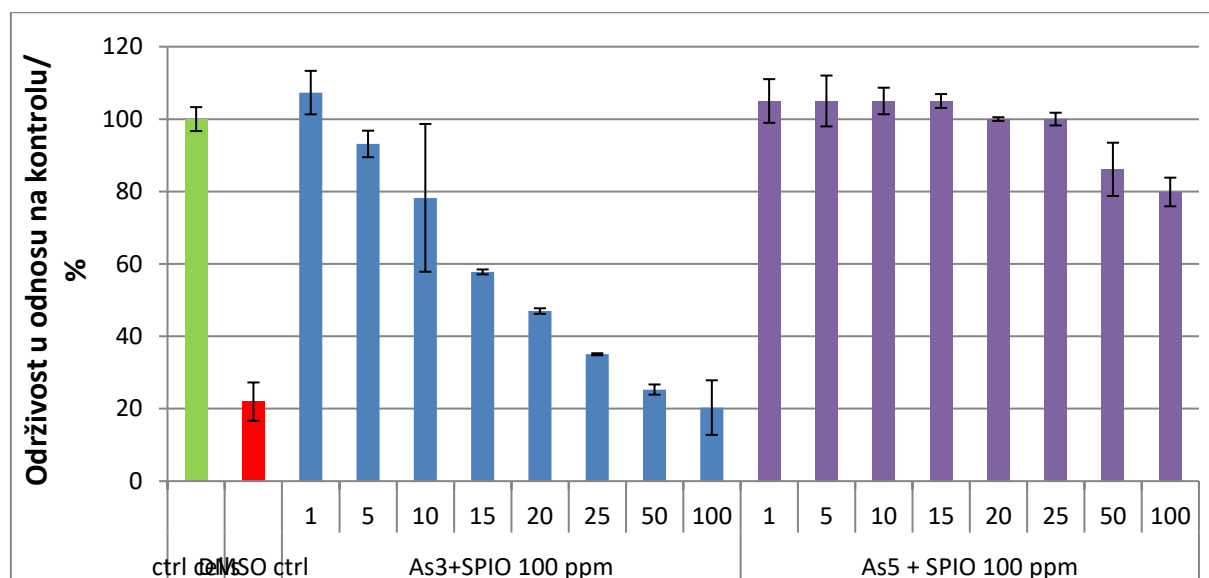
i mokraćnog mjehura^{238–241}. Osim kancerogenog djelovanja, epidemiološke studije na visokoizloženim populacijama otkrile su i snažne veze između izloženosti arsenu i lezija kože, hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i respiratornih bolesti^{242–245}.

U zadnje vrijeme sve se više pažnje posvećuje utjecaju drugih elemenata na toksičnost arsena, što može promijeniti stvarni rizik od izloženosti arsenu u okolišu. Na primjer, vitamini, voće, čaj, glutacion, N–acetilcistein i cink mogli bi smanjiti toksičnost izazvanu As povećanjem antioksidativnosti enzima koji antagoniziraju oksidativni stres uzrokovan As i/ili povećanjem metilacije As^{246–250}. Fe (Fe) uobičajen je element u okolišu i biološkim sustavima te se općenito smatra da nema toksičnih učinaka na ljude. No neki su istraživači otkrili da bi Fe mogao biti uključen u oksidativna oštećenja i toksičnost izazvanu As^{251,252}. Oksidativni stres predložen je kao glavni mehanizam toksičnosti As^{253,254}. Specije As u ljudskom organizmu mogu uzrokovati oslobađanje Fe iz feritina, koji igra važnu ulogu u pohrani slobodnog Fe²⁵⁵. Slobodno Fe sudjeluje u stvaranju štetnih vrsta kisika Fentonovom reakcijom, što može izazvati oksidativni stres i oštećenja stanica. U studiji s miševima koji su istovremeno bili izloženi egzogenom djelovanju Fe i As putem pitke vode dokazano je kako željezni sulfat smanjuje klastogeni učinak As u miševa²⁵⁶, dok je nedavna studija otkrila različite nalaze, tj. da postoji sinergistička interakcija između As₂O₃ i Fe u odnosu na jetru štakora²⁵⁷. Prethodne studije otkrile su i da Fe u vodi za piće smanjuje toksičnost As u miševa koflokulacijom As i Fe u gastrointestinalnom traktu²⁵⁸. No otkriveno je i kako zajedničko izlaganje As i Fe inducira sinergističke učinke u kulturi nekih staničnih linija. Ti rezultati impliciraju da bi endogeno Fe u tijelu (tkivu) i egzogeno Fe u pitkoj vodi (i hrani) moglo izazvati različite učinke na toksičnost As. Mehanizmi sinergističkog učinka As i Fe nisu u potpunosti istraženi, te bi daljnje istraživanje moglo objasniti njihov interaktivni učinak i rizik po ljudsko zdravlje²⁵⁹.

U našem ispitivanju upotrijebljeno je Fe u obliku SPIO nanočestica koje su sintetizirane i identificirane na „Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada“ u Zagrebu. SPIO nanočestice vrlo prikladno oponašaju koloidna svojstva otopina Fe u prirodnoj vodi za piće, stoga su prikladne za ovakvu vrstu ispitivanja. Ispitan je utjecaj As(III) i As(V) u kombinaciji sa SPIO nanočesticama koncentracije 10, 30 i 100 ppm, a na Slikama 50 i 51 prikazani su rezultati ispitivanja viabilnosti stanica HepG2 izloženih djelovanju različitih koncentracija As(III) i As(V) u kombinaciji sa SPIO nanočesticama koncentracija 10 i 100 ppm.



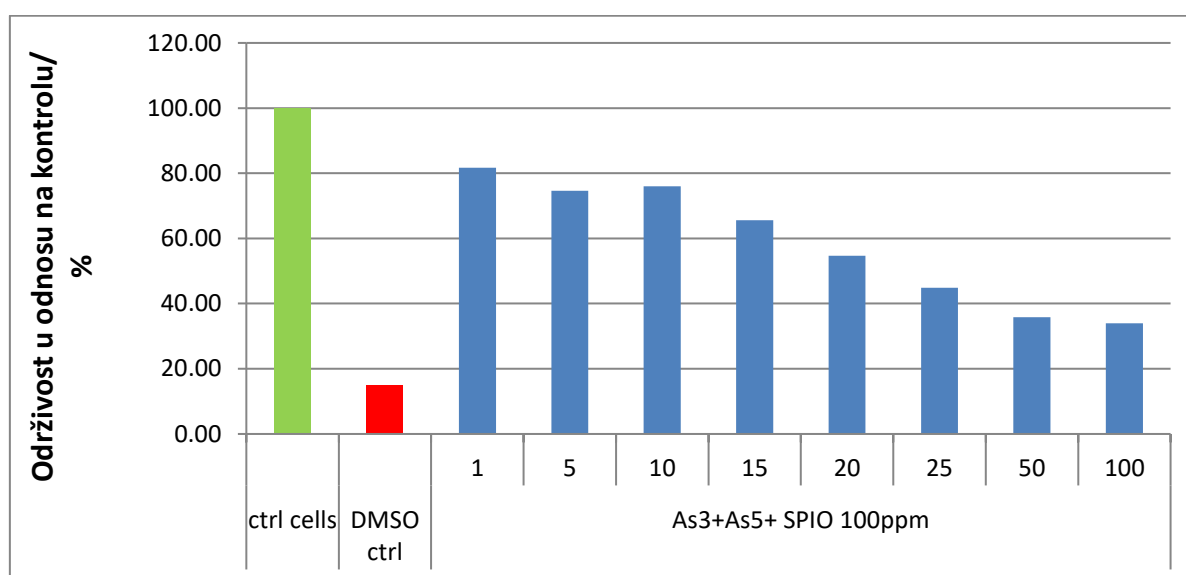
Slika 50. Vijabilnost stanica HepG2 izloženih As(III) koncentracija 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 i 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ u kombinaciji sa SPION–om 10 ppm i As(V) koncentracija 10, 25, 50, 75, 250, 500 i 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ u kombinaciji sa SPION–om 10 ppm.



Slika 51. Vijabilnost stanica HepG2 izloženih As(III) koncentracija 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 i 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ u kombinaciji sa SPION–om 100 ppm i As(V) koncentracija 10, 25, 50, 75, 250, 500 i 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ u kombinaciji sa SPION–om 100 ppm.

Podaci prikazani na Slici 49 jasno pokazuju kako As(III) ima znatan citotoksični učinak na HepG2 stanice. Kada su HepG2 stanice bile zajedno izložene As(III) i Fe, vitalnost stanica dodatno je smanjena. Vrijednost LC_{50} iznosila je 1,831 ppm, što je niže od vrijednosti LC_{50} od

5,437 ppm, pri izlaganju samom As(III). Rezultati su pokazali da Fe u netoksičnoj koncentraciji može povećati toksičnost arsena, što upućuje na sinergistički efekt As i Fe u *in vitro* ispitivanjima citotoksičnosti na staničnim linijama. Pri niskim dozama izloženosti As(III) i Fe produciraju postupan pad te linearno postupno smanjenje vitalnosti stanica pri višim dozama. Kod ispitivanja utjecaja As(V) i Fe na vitalnost HepG2 stanica ne dolazi do znatnog smanjenja vitalnosti stanica, zbog čega nije bilo moguće izračunati vrijednost LC₅₀. Rezultati pokazuju da Fe u ispitanim koncentraciji ne utječe bitno na toksičnost arsena As(V) jer ni sam As(V) ne pokazuje (u ispitivanoj razini koncentracija) statistički značajno smanjenje vitalnosti stanica HepG2.



Slika 52. Vijabilnost stanica HepG2 izloženih As(III) koncentracija 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 i 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ u kombinaciji sa SPION–om koncentracije 30 ppm i As(V) koncentracije 30 ppm.

Nalazi našeg ispitivanja pokazali su da je As(III) citotoksičan za ovu staničnu liniju nakon 24 sata izlaganja. Prethodne studije pokazale su da, kada se upotrebljava od 0,5 do 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ As(III), inducirana je apoptoza u monocitnim stanicama linije NB4²⁶⁰. Studije citotoksičnosti dviju staničnih linija multiplog mijeloma (MM) RPMI 8226 i U266 otkrile su da 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ As(III) inhibira proliferaciju stanica, što rezultira slabim stupnjem indukcije apoptoze. Ti su rezultati pokazali da As(III) ima učinke koji induciraju apoptozu i inhibiraju rast stanica MM²⁶¹. Također je dokazano da je As(III) citotoksičan za stanice humanog hepatocelularnog karcinoma (HepG2), pokazujući LD₅₀ od $8,55 \pm 0,58 \mu\text{g mL}^{-1}$ nakon 48 sati izlaganja^{262,263}. Nalazi iz

drugih studija upućuju na to da su niske doze arsena učinkovite u liječenju akutne promijelocitne leukemije²⁶⁴.

Vijabilnost stanica HepG2 izloženih 20 i 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ As bila je 68,5 % odnosno 58,6 %, što upućuje na to da je As inducirao citotoksičnost HepG2. Kada su HepG2 stanice bile istovremeno izložene As i Fe, u usporedbi s izlaganjem samo As, vitalnost se stanica smanjuje, što sugerira da Fe može povećati citotoksičnost As. Štoviše, sinergijski učinci prethodno su dokazani i u oštećenju DNK-a HepG2²⁶⁵. Dakle, možemo zaključiti da Fe može povećati toksičnost As u sinergijskim toksičnim učincima As i koekspozicije Fe. No *in vitro* pokusi ne mogu uzeti u obzir adsorpciju, metabolizam i transport različitih kemikalija u organizmu te ne mogu učinkovito odražavati stvarne štetne učinke koekspozicije kemikalijama. Stoga su u nekim *in vivo* pokusima upotrebljavani miševi kao modelne životinje za daljnju analizu kombiniranih učinaka As i Fe²⁶⁶. Različiti kombinirani učinci pronađeni su u *in vitro* i *in vivo* pokusima pri koekspoziciji As i Fe. *In vitro* pokus temeljen na HepG2 pokazao je da Fe može povećati toksičnost As. No *in vivo* pokusi na miševima otkrili su da Fe smanjuje toksičnost As²⁶⁶.

Dokazano je da As može osloboditi redoks-aktivni Fe iz feritina, koji uzrokuje stvaranje ROS-a i oksidativnog oštećenja. Kada su HepG2 stanice koizložene As i Fe, povećanje slobodnog Fe poboljšava stvaranje ROS-a, što može biti glavni razlog sinergijskih učinaka As i Fe na vitalnost stanica i oštećenje DNK-a²⁶⁵. Rezultati pružaju neizravni dokaz da zajedničko izlaganje As i Fe stvara više reaktivnih vrsta, koje mogu povećati citotoksičnost i genotoksičnost. Kada su miševi izloženi As i Fe zajedno u *in vivo* pokusu, As i Fe najprije će biti adsorbirani u crijevima. Povećanje razine As u izmetu i smanjenje jetre daju dokaz da Fe remeti adsorpciju As. Zaključno, nakon zajedničkog izlaganja As i Fe na staničnoj liniji postoje sinergijski toksični učinci. Međutim, pokus na životinjama pokazuje da bi precipitat Fe mogao smanjiti toksičnost As, mijenjajući adsorpciju As i bioraspoloživost²⁶⁶.

Naši rezultati podržavaju stajalište da, kada se procjenjuje sigurnost As u pitkoj vodi nakon procesa obrade na bazi Fe, potrebno je u potpunosti razmotriti njihove kombinirane toksične učinke. Čak i ako je razina As u pitkoj vodi niska, postojanje Fe može bitno promijeniti toksičnost As. Iako je naše ispitivanje odabralo samo dvije koncentracije SPION ovo ispitivanje pruža uvid u utjecaj Fe precipitata na toksičnost As i bazu za buduća istraživanja s ciljem razumijevanja kombinirane toksičnosti As i Fe u vodi za piće, koje je vrlo korisno u praksi uklanjanja As i mehanizma djelovanja.

Prijašnja istraživanja dokazala su da na staničnoj razini izlaganje stanice oksidacijskom stresu može rezultirati metaboličkom disfunkcijom, uključujući lipidnu peroksidaciju, oksidaciju proteina, disrupciju membrane i oštećenja na molekuli DNK²⁶⁷. Akumulacija ROS-a može rezultirati oksidacijskim stresom i igrati ključnu ulogu u kontroli ponašanja tumorskih stanica. Dok tumorske stanice potencijalno mogu imati koristi od oksidacijskog stresa zbog povećane brzine mutacija, također imaju višu bazalnu razinu oksidacijskog stresa usporedno s nemalignim stanicama, što ih čini osjetljivima na akutnu indukciju oksidacijskog stresa. Visoke razine ROS-a mogu izazvati niz proapoptotičkih signalnih putova, uključujući stres endoplazmatskog retikuluma (ER stres) i mitohondrijsku disfunkciju, što u konačnici dovodi do oštećenja stanične funkcije i nekroze ili apoptoze^{267, 268}. Prethodne studije pokazale su da kronična izloženost arsenu može znatno smanjiti razinu progesterona u serumu u ženki miševa²⁶⁷. Arsen može postati ozbiljna prijetnja reproduktivnom zdravlju žena djelujući kao endokrini disruptor i ograničavajući strukturu i funkciju maternice kroz promjene u razinama gonadotropina i steroida u niskim i visokim koncentracijama²⁶⁶. Slično tomu, arsen može utjecati na razvoj i reprodukciju muškaraca mijenjajući spermatogenezu, snižavajući testosteron i gonadotropine te ometajući steroidogenezu²⁶⁷. Povrh toga, izloženost arsenu može znatno promijeniti putove diferencijacije matičnih stanica, što rezultira povećanim razvojnim abnormalnostima i većom stopom smrtnosti embrija²⁶⁸. Pentozofosfatni put jest put metabolizma glukoze, koji stanicama daje sposobnost da se nose s oksidativnim stresom, te može igrati ulogu u dijabetesu izazvanom oksidativnim stresom²⁶⁹.

Prijavljeni su brojni slučajevi smrti u ljudi zbog uzimanja visokih doza arsena. Smrtonosna doza arsenikova trioksida u rasponu je od 200 do 300 mg, ali doza od 10 do 20 mg opasna je po život²⁷⁰. Simptomi akutne intoksikacije obično se javljaju unutar 30 minuta nakon gutanja, ali mogu biti odgođeni ako se arsen uzima s hranom. U gotovo svim slučajevima najneposredniji su učinci jaka mučnina i povraćanje, bol u trbuhu s grčevima, obilni proljev s rižinom stolicom i gastrointestinalno krvarenje; smrt može nastupiti zbog gubitka tekućine i cirkulacijskog kolapsa. Pospanost i zbunjenost također se vide uz razvoj psihoze, koja je povezana s paranoidnim deluzijama, halucinacijama i delirijem. Konačno, mogu uslijediti napadi, koma i smrt, obično od šoka. Ako smrt ne nastupi u prva 24 sata od ireverzibilne cirkulatorne insuficijencije, onda tijekom sljedećih nekoliko dana smrt može biti posljedica zatajenja jetre ili bubrega²⁷¹.

Prijašnja istraživanja istaknula su da je mehanizam kojim arsen ispoljava svoj toksični učinak kroz oštećenje staničnog disanja inhibicijom različitih mitohondrijskih enzima i odvajanjem oksidativne fosforilacije. Smatra se da toksičnost arsena proizlazi iz njegove sposobnosti interakcije sa sulfhidrilnim skupinama proteina i enzima te zamjene fosfora u raznim biokemijskim reakcijama²⁷². Zbog velikog potencijala da izazove štetne učinke u izloženih osoba međunarodne, savezne i državne agencije donijele su brojne propise i smjernice za različite anorganske i organske oblike arsena. Ovdje je potrebno napomenuti da ni najviša koncentracija nanočestica Fe upotrijebljena u ovom ispitivanju (100 ppm) ne ometa MTT test.

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu primijenjene su dvije metode za određivanje anorganskih specija As(III) i As(V) u modelnim otopinama i prirodnim uzorcima vode. Metode su se pokazale kao učinkovite i precizne, bez potrebe za predhodnom obradom uzoraka. Primijenjene metode su UPLC–ICP–MS i elektrokemijska metoda voltometrije anodnog otapanja za određivanje arsena sa scTRACE Gold elektrodom.

Ispitana je stabilnost anorganskih specija As(III) i As(V) u modelnim otopinama i prirodnim uzorcima voda primjenom odabranih konzervansa: askorbinska kiselina, limunska kiselina, natrijev citrat, kalij–natrijev tartarat, natrijev oksalat i octena kiselina koje također djeluju i kao kompleksirajuće sredstvo za Fe, a radi spriječavanja njegovog utjecaja na proces oksidacije As(III) u uzorcima prirodnih podzemnih voda.

Ispitivanjem stabilnosti specija As na modelnim vodenim otopinama, zaključeno je kako je većina predloženih tvari pogodna za očuvanje omjera specija As(III)/As(V) dulje od 24 h. Konzervansi (CA, CA/HAc, NaC/Hac, TAR/Hac i OKS) su očuvali stabilnost specija arsena u modelnim otopinama tijekom 7 dana.

Stabilnost specija nije ovisila o koncentraciji dodanog konzervansa.

Askorbinska kiselina nije se pokazala kao dobar konzervans, te nije uključena u ispitivanja prirodnih podzemnih voda.

Predloženi konzervansi uspješno su primijenjeni pri ispitivanju stabilnosti specija arsena u prirodnim podzemnim vodama s različitim sadržajem As i Fe s područja Republike Hrvatske. Dodatak konzervansa u uzorke podzemnih voda (CA/HAc, NaC/HAc i TAR/HAc) stabilizirao je omjer specija arsena do 6 dana. Limunska kiselina u kombinaciji s HAc pokazala se kao prikladno sredstvo za stabilizaciju tijekom pohrane uzoraka koji sadrže visoke koncentracije (do 100 mg L⁻¹) Fe, te za očuvanje specija arsena do 7 dana.

Ispitana je toksičnost modelnih otopina As(III) i As(V), akutnim testom na *Daphnia magna* sp. Određivanje inhibicije pokretljivosti *Daphnia magna* Straus -Test akutne toksičnosti provedeno je akreditiranom i normiranom metodom (HRN EN ISO 6341:2013). Određene LC₅₀ vrijednosti iznosile su 5,07 ppm nakon 24 h, odnosno 4,90 ppm nakon 48 h izlaganja specijama

arsena(III). Inhibicija pokretljivosti *D. magna* bila je mnogo manje izražena u slučaju As(V), a izračunata vrijednost LC₅₀ iznosila je 10,27 ppm.

Ispitana je toksičnost modelnih otopina As(III) i As(V) u prisustvu SPIO nanočestica Fe akutnim testom na *Daphnia magna* sp. Utvrđeno je kako SPIO nanočestice značajno povećavaju toksičnost As(III) i As(V) te povećavaju inhibiciju pokretljivosti *Daphnia magna*, pri čemu je LC₅₀ vrijednosti iznosila 0,5807 ppm. Ovakav učinak može se pripisati nanočesticama Fe koje mijenjaju metabolizam i adsorpciju arsena u crijevima *D. magna*.

Određena je citotoksičnost As(III) i As(V) bez i u prisutnosti Fe u formi SPIO nanočestica na staničnoj liniji HepG2. *In vitro* testom dokazan je utjecaj Fe na toksičnost As. Fe smanjuje vitalnost stanica izloženih arsenu i povećava arsenom induciranu smrtnost stanica. Povećanjem koncentracije As(III) povećava se i toksičnost istoga na HepG2. Pri koncentraciji od 20 μmol L⁻¹ LC₅₀ iznosi 5,437 ppm. Nije uočena citotoksičnost As(V) niti u prisutnosti nanočestica Fe. Najveća ispitana koncentracija As(V) bila je 1000 μmol L⁻¹. Smanjenje viabilnosti stanica izloženih As(III) koncentracije 20 μmol L⁻¹ As je iznosilo je oko 80 %, što ukazuje da As(III) inducira znatnu citotoksičnost u HepG2 stanicama. Ova ispitivanja su pokazala kako As(III) i As(III) sa SPION, mogu biti akutno toksični za transformirane ljudske hepatocite.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

AA: Askorbinska kiselina

AAS: Atomska apsorpcijska spektrometrija

AB: Arsenobetain

ADME: Adsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija

AES: Atomska emisijska spektrometrija

As(III): Arsenit

As(V): Arsenat

As: Arsen

AsC: Arsenokolin

ASV: Voltometrija anodnog otapanja (engl. *Anodic Stripping Voltametry*)

AT: Arsenov trioksid

BMD01: Referentna doza temeljena na riziku (engl. *Benchmark dose*)

CA: Limunska (citratna) kiselina

CPS: Broj u sekundi (engl. *Counts per second*)

CSV: Voltometrija katodnog otapanja (engl. *Catodic Stripping Voltametry*)

DI: Deionizirana voda

DMAIII: Dimetilarsinska kiselina

DMAV: Dimetilarsonska kiselina

DME: Kapajuća živina elektroda (engl. *Dropping Mercury Electrode*)

DMSO: Dimetil sulfoksidom

DPASV: Diferencijalna pulsna anodna stripping voltometrija

EDTA: Etilendiamintetraoctena kiselina

EFSA: Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*)

ESCA: Elektronska spektrometrija za kemijsku analizu

ESR: Elektronska spin rezonancija

GC: Plinska kromatografija

GF–AAS: Grafitna tehnika–atomska apsorpcijska spektrometrija

HAc: Octena kiselina

- HepG2: Stanična linija ljudskog hepato karcinoma
- HFO: Hidratizirani željezni oksid
- HG–AAS: Hidridna tehnika–atomska apsorpcijska spektrometrija
- HG–AFS: Hidridna tehnika–atomska fluorescentna spektrometrija
- HM: Teški metali
- HPLC: Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
- HPLC–ICP–MS: Spregnuti sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i induktivno spregnute plazme– spektrometrije masa
- IARC: Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*)
- IC: Ionska kromatografija
- ICP–MS: Induktivno spregnuta plazma– spektrometrija masa
- LD₁₀: vrijednost koja predstavlja smrt 90 % ispitivane populacije stanica pri određenoj koncentraciji ksenobiotika
- LD₅₀: vrijednost koja predstavlja smrt 50 % ispitivane populacije stanica pri određenoj koncentraciji ksenobiotika (engl. *Lethal dose*)
- m/z*: Omjer mase i naboja iona
- MDK: Maksimalna dozvoljena koncentracija
- MMAIII: Monometilarsinska kiselina
- MMAV: Monometilarsonska kiselina
- MRI: Magnetska rezonancija (engl. *Magnetic resonance imaging*)
- MTT: 3–(4,5–dimetiltiazol–2–il)–2,5–difenil–2H–tetrazolijev bromid test
- NaC: Na citrat
- NM: Nanomaterijal
- NMR: Nuklearna magnetska rezonancija
- NP: Nanočestice (engl. *Nanoparticles*)
- OECD: Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (engl. *Organisation for Economic Co–operation and Development*)
- OKS: Na oksalat
- oxoAsS: Okso–arsenošećer
- PNEC: Predviđena koncentracija bez učinka (engl. *Predicted no–effect concentration*)
- PTFE: Politetrafluoroetilen

ROS: Reaktivne kisikove specije

RPLC: Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s reverznom fazom

SPE: Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid phase extraction*)

SPION: Superparamagnetske nanočestice Fevog oksida

SWV: Pravokutnovalna voltometrija (engl. *Squarewave Voltammetry*)

TAR: K–Na tartarat

tioAsS: tioarsenošećer

TMA: Tetrametilarsonijev ion

TMAO: Trimetilarsin oksid

TMS: Tandemna spektrometrija masa

t_R: Vrijeme zadržavanja (Retencijsko vrijeme)

UHPLC: Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*)

USEPA: Američka agencija za zaštitu životne sredine (engl. *United States Environmental Protection Agency*)

UV/VIS: ultraljubičasto/vidljivo elektromagnetsko zračenje

WHO: Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

XAFS: Spektrometrija fine strukture s rentgenskom apsorpcijom

XPS: Rendgenska fotoelektronska spektrometrija

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. P. L. Smedley i D.G. Kinniburgh, *Appl. Geochem.* **17** (2001) 517–568.
2. Guidelines for Drinking–water Quality, Third Edition Incorporating The First And Second Addenda, Volume 1, Recommendations World Health Organization. WHO Press, World Health Organization, Geneva, Switzerland. (2008) 306–308.
3. A. Bednar, J. Garbarino, M. Burkhardat, J. Ranville i T. Wildeman, *Water Res.* **38** (2004) 355–364.
4. N. Issa, V. Rajaković–Ognjanović, B. Jovanović i Lj. Rajaković, *Anal. Chim. Acta.* **673** (2010) 185–193.
5. D. A. Polya, P. R. Lythgoe, F. Abou–Shakra, A. G. Gault, J. R. Brydie, J. G. Webster, K. L. Brown, M. K. Nimfopoulos i K. M. Michailidis, *Mineral. Mag.* **67** (2003) 247–261.
6. R. B. McCleskey, D. K. Nordstrom i A. S. Maest, *Appl. Geochem.* **19** (2004) 995–1009.
7. B. Daus, H. Weiss, J. Mattusch i R. Wennrich, *Talanta.* **69** (2006) 430–434.
8. A. J. Bednar, J. R. Garbarino, J. F. Ranville i T. R. Wildemann, *Environ. Sci. Technol.* **36** (2002) 2213–2218.
9. A. A. Al–Sibaai i A. G. Fogg, *Analyst.* **98** (1973) 732–738.
10. C. Feldman, *Anal. Chem.* **51** (1979) 664–669.
11. G. E. M. Hall, J. C. Pelchat i G. Gauthier, *J. Anal. At. Spectrom.* **14** (1999) 205–213.
12. M. O. Andreae, *Deep–Sea Res.* **25** (1978) 391–402.
13. J. A. Cherry, A. U. Shaikh, D. E. Tallman i R. V. Nicholson, *J. Hydrol.* **43** (1979) 373–392.
14. B. Daus, J. Mattusch, A. Paschke, R. Wennrich i H. Weiss, *Talanta.* **51** (2000) 1087–1095.
15. J. Schüring, *Redox: Fundamentals, Processes and Applications*, Springer, (2000) 42–54.
16. J. R. Garbarino, A. J. Bednar i M. R. Burkhardt, *Methods of analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory–arsenic speciation in naturalwater samples using laboratory and field methods. US Geol Surv. Water–Resour. Investig. Report* (2002) 02–4144.
17. D. E. Tallman i A. U. Shaikh, *Anal. Chem.* **52** (1980) 196–199.
18. V. L. Vukašinović–Pešić, M. Ćikanović, N. Z. Blagojević i Lj. V. Rajaković, *Chem. Ind. & Chem. Eng. Q.* **11** (2005) 44–48.
19. D. Adema, *Hydrobiologia.* **59** (1978) 125–134.

20. A. Villegas–Navarro, M. C. Romero Gonzalez i E. Rosas Lopez, *Environ. Int.* **25** (1999) 619–624.
21. J. Holme, *NIPH Ann.* **8** (1985) 49–63.
22. P. F. Dehn, C. M. White, D. E. Conners, G. Shipkey i T. A. Cumbo, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **40** (2004) 172–182.
23. B. Jovanović i D. Ljubisavljević, *Vodoprivreda.* **43** (2011) 127–150.
24. E. E. Codling, *Commun. Soil Sci. Plan.* **40** (2009) 2800–2815.
25. P. R. Buchireddy, R. M. Bricka i D. B. Gent, *J. Hazard. Mater.* **162** (2009) 490–497.
26. Y. G. Zhu, G. X. Sun, M. Lei, M. Teng, Y. X. Liu, N. C. Chen, L. H. Wang, A. M. Carey, C. Deacon, A. Raab, A. A. Meharg i P. N. Williams, *Environ. Sci. Technol.* **42** (2008) 5008–5013.
27. J. Ruiz–Chanco, J. F. Lopez–Sanchez, E. Schmeisser, W. Goessler, K. A. Francesconi i R. Rubio, *Chemosphere.* **71** (2008) 1522–1530.
28. C. P. Liu, C. L. Luo, Y. Gao, F. B. Li, L. W. Lin, C. A. Wu i X. D. Li, *Environ. Pollut.* **158** (2010) 820–826.
29. K. Baba, T. Arao, Y. Maejima, E. Watanabe, H. Eun i M. Ishizaka, *Anal. Chem.* **80** (2008) 1739–1751.
30. L. X. Yao, G. L. Li, Z. Dang, Z. H. He, C. M. Zhou i B. M. Yang, *J. Hazard. Mater.* **164** (2009) 904–910.
31. A. A. MacKay, P. Gan, R. Yu i B. F. Smets, *Environ. Sci. Technol.* **48** (2014) 920–929.
32. Y. S. Hong, K. H. Song i J. Y. Chung, *J. Prev. Med. Public Health.* **47** (2014) 245–252.
33. C. R. Tyler i A. M. Allan, *Curr. Environ. Health Rep.* **1** (2014) 132–147.
34. D. Latowski i A. Kowalczyk, *Mol. Biophys. Biochem.* **1** (2016) 9–16.
35. T. Roychowdhury, *Food Chem. Toxicol.* **46** (2008) 2856–2864.
36. H. A. L. Rowland, R. L. Pederick, D. A. Polya, R. D. Pancost, B. E. Van Dongen, A. G. Gault, D. J. Vaughan, C. Bryant, B. Anderson i J. R. Lloyd, *Geobiology.* **5** (2007) 281–292.
37. J. E. McLean, R. R. Dupont i D. L. Sorensen, *J. Environ. Qual.* **35** (2006) 1193–1203.
38. J. Bai, X. Lin, R. Yin, H. Zhang, W. Junhua, C. Xueming i L. Yongming, *Appl. Soil Ecol.* **38** (2008) 137–145.
39. I. J. Pickering, R. C. Prince, M. J. George, R. D. Smith, G. N. George i D. E. Salt, *Plant Physiol.* **122** (2000) 1171–1177.
40. O. P. Dhankher, Y. J. Li i B. P. Rosen, *Nat. Biotechnol.* **20** (2002) 1140–1145.

41. M. A. Davis, A. J. Signes–Pastor, M. Argos, F. Slaughter, C. Pendergrast, T. Punshon, A. Gossai, H. Ahsan i M. R. Karagas, *Sci. Total Environ.* **586** (2017) 1237–1244.
42. B. M. Dahal, M. Fuerhacker, A. Mentler, K. B. Karki, R. R. Shrestha i W. E. H. Blum, *Environ. Pollut.* **155** (2008) 157–163.
43. J. Dittmar, A. Voegelin, L. C. Roberts, S. J. Hug, G. C. Saha, M. A. Ali, A. Borhan, M. Badruzzaman i R. Kretzschmar, *Environ. Sci. Technol.* **44** (2010) 2925–2931.
44. Y. C. Chen, C. J. Amarasiriwardena, Y. M. Hsueh i D. C. Christiani, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **11** (2002) 1427–1433.
45. V. Bencko i F. Y. L. Foong, *Ann. Agric. Environ. Med.* **24** (2017) 312–316.
46. A. Gomez–Caminero, P. Howe, M. Hughes, E. Kenyon, D. R. Lewis, M. Moore, J. Ng, A. Aitio i G. Becking, *IPCS Arsenic and arsenic compounds*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 224). World Health Organization, Geneva, Switzerland (2001). ISBN 92 4 157224 8
47. IARC Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs volumes 1–42. Lyon, International Agency for Research on Cancer, (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7). (1987) 100–106.
48. USEPA Controlling Disinfection by–products and microbial contaminants in drinking water, Office of Research and development, EPA/600/R–01/110, Washington, DC, USA (2001).
49. WHO, *Guidelines for Drinking–water Quality*, 4 ed., World Health Organization, 2017.
50. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA Journal* 2009. **7**(10):1351. Accessed online January 8, 2019.: www.efsa.europa.eu
51. K. H. Al–Assif, “Determination of arsenic species in environmental samples,” Ph.D., Chemistry Department, University of Massachusetts, Amherst, 2007, UMI 3254933.
52. A. Shraim, B. Chiswell i H. Olszowy, *Talanta* **50** (1999) 1109–1127.
53. X. C. Le, X. Lu i X. F. Li, *Anal. Chem.* **76** (2004) 26A–33A.
54. B. M. Jovanović, V. L. Vukašinović–Pešić i Lj. V. Rajaković, *Water Envir. Res.* **83** (2011) 498–506.
55. A. Duarte, S. Cardoso i A. Alçada, *Sustainability.* **1** (2009) 1288–1304.
56. K. Akter i R. Naidu, *Chapter 3: Arsenic speciation in the environment*, In: *Managing Arsenic in the Environment*, Eds. R. Naidu, E. Smith, G. Owens, P. Bhattacharya, P. Nadebaum, CSIRO Publishing, Australia, Collingwood (2006) 61–75.

57. M. Kim, J. Nriagu i S. Haack, *Environ. Pollut.* **120** (2002) 379–390.
58. A. Zouboulis i I. Katsoyiannis, *Sep. Sci. Technol.* **37** (2002) 2859–2873.
59. R. Ning, *Desalination.* **143** (2002) 237–241.
60. K. Akter, G. Owens, D. Davey i R. Naidu, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **184** (2005) 97–149.
61. A. A. Ammann, *Am. J. Analyt. Chem.* **2** (2011) 27–46.
62. X. C. Le, W. R. Cullen i K. J. Reimer, *Talanta.* **41** (1994) 495–502.
63. X. C. Le, S. Yalcin i M. A. Mingsheng, *Environ. Sci. Technol.* **34** (2000) 2342–2347.
64. D. Kuehnelt, W. Goessler i K. J. Irgolic, *The oxidation of arsenite in aqueous solutions*. In: C.O. Abernathy, R.L. Calderson, W.R. Chappell, (Eds.), *Arsenic Exposure and Health Effects*. Chapman & Hall, London, (1997) 45–54.
65. V. Cheam i H. Agemian, *Analyst.* **105** (1980) 737–743.
66. M. Segura, J. Munoz, Y. Madrid i C. Camara. *Anal. Bioanal. Chem.* **374** (2002) 513–519.
67. K. A. Francesconi i D. Kuehnelt, *Analyst.* **129** (2004) 373–395.
68. S. J. Hug, L. Canonica, M. Wegelin, D. Gechter i U. V. Gunten, *Environ. Sci. Technol.* **35** (2001) 2114–2121.
69. M. Borho i P. A. Wilderer, *Aqua.* **46** (1997) 138–143.
70. M. T. Emmett i G. H. Khoe, *Water Res.* **35** (2001) 649–656.
71. J. H. Huang i G. Ilgen, *Anal. Chim. Acta.* **512** (2004) 1–10.
72. B. Daus, J. Mattusch, R. Wennrich i H. Weiss, *Talanta.* **58** (2002) 57–65.
73. J. L. Gómez Ariza, E. Morales, D. Sánchez–Rodas i I. Giráldez. *Trends Analyt. Chem.* **19** (2000) 200–209.
74. M. K. Nimfopoulos i K. M. Michailidis, *Mineral. Mag.* **67** (2003) 247–261.
75. K. Sathrugnan i S. Hirata, *Talanta.* **64** (2004) 237–243.
76. F. A. Duarte, J. S. Fagundes Pereira, M. F. Mesco, F. Goldschmidt, E. M. de Moraes Flores i V. L. Dressler, *Spectrochim. Acta B.* **62** (2007) 978–984.
77. K. Jitmanee, M. Oshima i S. Motomizu, *Talanta.* **66** (2005) 529–533.
78. V. L. Vukašinović, N. Z. Blagojević i Lj. V. Rajaković, *Instrum. Sci. Technol.* **37** (2009) 482–498.
79. R. K. Dhara, Y. Zhenga, J. Rubenstonec i A. van Geenc, *Anal. Chim. Acta.* **526** (2004) 203–209.
80. A. M. Farnet, L. Qasemian, D. Guiral i E. Ferre, *Pedobiologia.* **53** (2010) 159–160.

81. D. Hung, O. Nekrassova i R. Compton, *Talanta*. **64** (2004) 269–277.
82. M. M. Nearing, I. Koch i K. J. Reimer, *Spectrochim. Acta B: At. Spectrosc.* **99** (2014) 150–162.
83. M. Cindrić, A. Marković i A. Horvatić, *Med. Flum.* **45** (2009) 218–232.
84. W. D. James, T. Raghvan, T. J. Gentry, G. Shan i R. H. Loeppert, *J. Radioanal. Nucl. Ch.* **278** (2008) 267–270.
85. B. P. Jackson i P. M. Bertsch, *Environ. Sci. Technol.* **35** (2001) 4868–4873.
86. H. Peng, B. Hu, Q. Liu, Z. Yang, X. Lu, R. Huang, X. F. Li, M. J. Zuidhof i X. C. Le, *J. Chromatogr. A*. **1370** (2014) 40–49.
87. F. Gerber, M. Krummen, H. Potgeter, A. Roth, C. Siffrin i C. Spoendlin. *J. Chromatogr. A*. **1036** (2004) 127–133.
88. N. Wu, J. A. Lippert i M. L. Lee. *J. Chromatogr. A*. **911** (2001) 1–12.
89. N. A. Pratima, B. Shraddha i S. Zibrán, *Int. J. Res. Pharm. Pharm. Sci.* **3** (2013) 19–40
90. T. Greibrokk i T. Andersen, *J. Chromatogr. A*. **1000** (2003) 743–755.
91. D. T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz i J. L. Veuthey. *J. Sep. Sci.* **29** (2006) 1836–1848.
92. J. H. Gross, *Introduction. In Mass spectrometry – A Textbook*. Springer–Verlag Berlin Heidelberg, Germany (2004) ISBN–10 3–540–40739–1 S.
93. Preuzeto i adaptirano: <https://www.corvelva.it/en/speciale-corvelva/vaccinegate-en/metal-analysis-by-icp-ms.html>
94. D. A. Skoog, F. J. Holler i S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*. Thomson Higher Education, Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole (2007).
95. M. A. Baldwin i F. W. McLafferty, *Org. Mass. Spectrom.* **7** (1973) 1353–1356.
96. J. V. Iribarne i B. A. Thomson, *J. Chem. Phys.* **64** (1974) 2287–2294.
97. C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita i J. B. Fenn, *Anal. Chem.* **57** (1985) 675–679.
98. R. P. W. Scott, C. G. Scott, M. Munroe i J. Hess, *J. Chrom. A*. **99** (1974) 395–405.
99. Preuzeto i adaptirano:
https://www.chemicool.com/definition/quadrupole_mass_spectrometry.html
100. E. C. Horning, D. I. Carroll, I. Dzidic, K. D. Haegele, M. G. Horning i R. N. Stillwell, *J. Chrom. Sci.* **12** (1974) 725–729.
101. C. Yuan, G. Jiang i B. He, *J. Anal. At. Spectrom.* **20** (2005) 103–110.
102. I. I. Stewart i J. W. Olesik, *J. Anal. At. Spectrom.* **13** (1998) 1313–1320.

103. C. A. Ponce de Leon, M. Montes–Bayon i J. A. Caruso, *J. Chromatogr. A.* **974** (2002) 1–21.
104. J. Y. Kim, W. I. Kim, A. Kunhikrishnan, D. W. Kang, D. H. Kim, Y. J. Lee, Y. J. Kim i C. T. Kim, *Food Sci. Biotechnol.* **22** (2013) 1509–1513.
105. N. Campillo, R. Penalver, P. Vinas, I. Lopez–Garcia i M. Hernandez–Cordoba, *Talanta.* **77** (2008) 793–799.
106. C. Kahakachchi, P. C. Uden i J. F. Tyson, *Analyst.* **129** (2004) 714–718.
107. E. Schmeisser, W. Goessler, N. Kienzl i K. A. Francesconi, *Analyst.* **130** (2005) 948–945.
108. F. Pan, J. F. Tyson i P. C. Uden, *J. Anal. At. Spectrom.* **22** (2007) 931–937.
109. J. K. Suh, N. Kang i J. B. Lee, *Talanta.* **78** (2009) 321–325.
110. I. B. Rodriguez, K. A. Francesconi i W. Goessler, *J. Anal. At. Spectrom.* **23** (2008) 235–239.
111. R. Willoughby, E. Sheehan i S. Mitrovich, *A Global View of LC–MS*. Pittsburg Pennsylvania, USA: Global View Publishing. (1997).
112. D. T. Heitkemper, N. P. Vela, K. R. Stewart i C. S. Westphal, *J. Anal. Atom. Spectrom.* **16** (2001) 299–306.
113. J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Wiley–VCH, New York, (2000).
114. S. Mathison i E. Bakker, *Anal. Chem.* **70** (1998) 303–309.
115. T. Sokalski, A. Ceresa, T. Zwickl i E. Pretsch, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 11347–11348.
116. P. Protti, *Introduction to Modern Voltammetric and Polarographic Analysis Techniques*, fourth ed., Amel Electrochemistry, New York (2001).
117. Preuzeto i adaptirano:
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/11_Electrochemical_Methods/11.4_%3A_Voltammetric_Methods](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/11_Electrochemical_Methods/11.4_%3A_Voltammetric_Methods)
118. D. A. Skoog, D. M. West i F. J. Holler, *Foundamentals of Analytical Chemistry*, sixth ed., Saunders College Publishing, New York (1992).
119. B. Nigović i S. Behetić, *Farm. Glas.* **63** (2007) 163–175.
120. V. Mirceski, R. Gulaboski, M. Lovric, I. Bogeski, R. Kappl i M. Hoth, *Electroanalysis.* **25** (2013) 2411–2422.

121. M. A. Brooks i E. W. Tsai, *Electrochemistry in Pharmaceutical Analysis in Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, P. T. Kissinger i W. R. Heineman (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York–Basel (1996) 769–812.
122. J. C. Vire i J. M. Kauffmann, *Curr. Top. Electrochem.* **3** (1994) 493–515.
123. H. Li i R. B. Smart, *Anal. Chim. Acta.* **325** (1996) 25–32.
124. G. Henze, W. Wagner i S. Sander, *Fresenius J. Anal. Chem.* **358** (1997) 741–744.
125. I. Eguiarte, R. M. Alonso i R. M. Jimenez, *Analyst.* **121** (1996) 1835–1838.
126. F. Garlaschelli, G. Alberti, N. Fiol i I. Villaescusa, *Arab. J. Chem.* **10** (2017) 1014–1021.
127. J. Mocak, A. Bond, S. Mitchell i G. Scollary, *Pure Appl. Chem.* **69** (1997) 297–328.
128. P. Salaün, B. Planer–Friedrich i C. M. van den Berg, *Anal. Chim. Acta.* **585** (2007) 312–322.
129. https://www.metrohm.com/content/metrohm/en_gb/applications/tp-technical-posters/80006093.html Metrohm, Application Bulletin 416/1 e, Determination of arsenic in water with the sc TRACE Gold.
130. A. S. Teja i P. Y. Koh, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **55** (2009) 22–45.
131. R. A. Crane i T. B. Scott, *J. Hazard Mater.* **211–212** (2012) 112–125.
132. C. Noubactep, S. Care i R. Crane, *Water Air Soil Pollut.* **223** (2012) 1363–1382.
133. A. Nel, T. Xia, L. Madler i N. Li, *Science.* **311** (2006) 622–627.
134. B. I. Kharisov, H. V. R. Dias, O. V. Kharissova, V. M. Jimenez–Perez, B.O. Perez i B. M. Flores, *Rsc. Adv.* **2** (2012) 9325–9358.
135. K. D. Grieger, A. Fjordboge, N. B. Hartmann, E. Eriksson, P. L. Bjerg i A. Baun, *J. Contam. Hydrol.* **118** (2010) 165–83.
136. W. Wu, Q. G. He i C. Z. Jiang, *Nanoscale Res. Lett.* **3** (2008) 397–415.
137. A. K. Gupta i M. Gupta, *Biomater.* **26** (2005) 3995–4021.
138. R. Gilchrist, R. Medal, W. D. Shorey, R. C. Hanselman, J. C. Parrott i C. B. Taylor, *Ann. Surg.* **146** (1957) 596–606.
139. L. Yang, Z. Cao, H. K. Sajja, H. Mao, L. Wang, H. Geng, H. Xu, T. Jiang, W. C. Wood, S. Nie, i Y. A. Wang, *J. Biomed. Nanotechnol.* **4** (2008) 439–449.
140. N. Lee i T. Hyeon, *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012) 2575–2589.
141. S. Laurent, S. Dutz, U. O. Häfeli i M. Mahmoudi, *Adv. Colloid Interface Sci.* **166** (2011) 8–23.

142. M. Cao, Z. Li, J. Wang, W. Ge, T. Yue, R. Li, V. L. Colvin i W. W. Yu, *Trends Food Sci. Technol.* **27** (2012) 47–56.
143. A. H. Lu, E. L. Salabas i F. Schuth, *Angew. Chem. Int. Edn.* **46** (2007) 1222–1244.
144. C. J. Rivet, Y. Yuan, D. A. Borca–Tasciuc i R. J. Gilbert, *Chem. Res. Toxicol.* **25** (2012) 153–161.
145. M. Mahmoudi, H. Hofmann, B. Rothen–Rutishauser i A. Petri–Fink, *Chem. Rev.* **112** (2012) 2323–2338.
146. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Arsenic TP–92/09. Center for Disease Control, Atlanta, GA, (1993).
147. M. M. Wu, T. L. Kuo i Y. H. Hwang, *Am. J. Epidemiol.* **130** (1989) 1123–1132.
148. W. P. Tseng, H. M. Chu, S. W. How, J. M. Fong, C. S. Lin i S. Yeh, *J. Natl. Cancer Inst.* **40** (1968) 453–463.
149. C. J. Chen, C. W. Chen, M. M. Wu i T. L. Kuo, *Br. J. Cancer.* **66** (1992) 888–892.
150. U.S.EPA. Ambient Water Quality Criteria for Arsenic. EPA 400/5–80–021. Environmental Protection Agency. Washington DC, (1980).
151. P. K. Gupta, P. Joshi, Jahangeer, *Emerg. Contam.* **3** (2017) 138–143.
152. R. A. Goyer, *Toxic effects of metals*. In: Klaassen C.D. ed. Cassarett & Doull’s *Toxicology–The Basic Science of Poisons*. McGraw Hill. New York, NY, (1996) 691–736.
153. P. B. Tchounwou, B. Wilson i A. Ishaque, *Rev. Environ. Health.* **14** (1999) 1–19.
154. P. B. Tchounwou, J. A. Centeno i A. K. Patlolla, *Mol. Cell Biochem.* **255** (2004) 47–55.
155. V. K. Tyagi, A. K. Chopra, N. C. Durgapal i A. Kumar, *J. Appl. Sci. Environ. Mgt.* **11** (2007) 61–67.
156. A. Altındağ, M. B. Ergonul, S. Yiğit i O. Baykan, *Afr. J. of Biothechnol.* **7** (2008) 4298–4300.
157. K. Cooman, P. Debels, M. Gajardo, R. Urrutia i R. Barra, *Arch. Environ. Con. and Tox.* **48** (2005) 191–200.
158. S. M. Harmon, W. L. Specht i G. T. Chandler, *Arch. Environ. Con. Tox.* **45** (2003) 79–85.
159. APHA, AWWA, WEF. *Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edition, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environmental Federation, Washington, DC 20005– 2605 (1998).

160. GSM (1989) *Examination of Water, Wastewater and Sludge, Bio-assays (Group L) Determining Tolerance of Daphnia to Toxicity of Wastewater by way of a Dilution Series*, GSM (German Standard Methods)(L-30), DIH-38412, Part 30, March 1989.
161. P. D. N. Hebert, *Biol. Rev.* **53** (1978) 387–426.
162. C. Vollmer, *Wasserflöhe*. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt (1960).
163. K. Fent, *Toxicol. Lett.* **140–141** (2003) 353–365.
164. C. Barata i D. J. Baird, *Aquat. Toxicol.* **48** (2000) 195–209.
165. M. Breitholtz, C. Rudén, S. Ove Hansson i B. E. Bengtsson, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **63** (2006) 324–335.
166. OECD, 2004. Guideline for testing of chemicals–Daphnia sp. acute immobilisation test
202. OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development. <http://www.oecd.org/home>. 2011–01–20.
167. M. J. Garle, J. H. Fentern i J. R. Fry, *Toxicol. In Vitro.* **8** (1994) 1303–1312.
168. M. R. Boyd i K. D. Paul. *Drug Develop. Res.* **34** (1995) 91–109.
169. D. L. Jensen i T. H. Christensen, *Water Res.* **33** (1999) 2139–2145.
170. A. Sanchez–Chardi, C. Penarroja–Matutano, C. A. O. Ribeiro i J. Nadal, *Chemosphere.* **70** (2007) 101–109.
171. R. J. Slack, J. R. Gronow, D. H. Hall i N. Voulvoulis, *Environ. Pollut.* **146** (2007) 501–509.
172. P. L. Bjerg, H. J. Albrechtsen, P. Kjeldsen, T. H. Christensen, I. M. Cozzarelli i D. H. Heinrich, *The Groundwater Geochemistry of Waste Disposal Facilities. U: Treatise on Geochemistry*, (K. K. Turekian, H. D. Holland ured.), Elsevier Science, Pergamon, Oxford, (2003) str. 579–612.
173. H. H. Gerets, K. Tilmant, B. Gerin, H. Chanteux, B. O. Deplechin, S. Dhalluin i F. A. Atienzar, *Cell Biol. Toxicol.* **28** (2012) 69–87.
174. P. Batra i A. K. Sharma, *3 Biotech.* **3** (2013) 439–459.
175. N. L. Sussman, G. T. Gislason, C. A. Conlin i J. H. Kelly, *Artif. Organs.* **18** (1994) 390–396.
176. A. Kermanizadeh, B. K. Gaiser, H. Johnston, D. M. Brown i V. Stone, *J. Pharmacol.* **171** (2014) 3980–3987.
177. A. Kermanizadeh, I. Gosens, L. MacCalman, H. Johnston, P. H. Danielsen, N. R. Jacobsen, A. G. Lenz, T. Fernandes, R. P. F. Schins, R. C. Flemming, H. Wallin, W. Kreyling,

- T. Stoeger, S. Loft, P. Møller, L. Tran i V. Stone, *J. Toxicol. Environ. Health B.* **19** (2016) 1–28.
178. T. L. Riss, R. A. Moravec, M. A. O'Brien, E. M. Hawkins i A. Niles, *Homogeneous Multiwell Assays for Measuring Cell Viability, Cytotoxicity and Apoptosis. In: Handbook of Assay Development in Drug Discovery*, ed. L. K. Minor. CRC Press, (2006) 385–406.
179. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods.* **65** (1983) 55–63.
180. I. Vinković Vrček, I. Pavičić, T. Crnković, D. Jurašin, M. Babič, D. Horák, M. Lovrić, L. Ferhatović, M. Čurline i S. Gajoviće, *RSC Adv.* **5** (2015) 70787–70807.
181. L. Pillay i A. Kindness, *S. Afr. J. Chem.* **69** (2016) 9–14.
182. P. A. Gallagher, C. A. Schwegel, X. Wei i J. T. Creed, *J. Environ. Monit.* **3** (2001) 371–376.
183. G. Samanta i D. A. Clifford, *Water Qual. Res. J. Canada.* **41** (2006) 107–116.
184. X. Yu, W. Cui, Q. Wang, Y. Guo i T. Deng, *Anal. Bioanal. Chem.* **411** (2019) 72517260.
185. I. Herath, M. Vithanage, J. Bundschuh, J. P. Maity i P. Bhattacharya, *Curr. Pollut. Rep.* **2** (2016) 68–89.
186. H. M. Anawar, J. Akai, K. Komaki, H. Terao, T. Yoshioka, T. Ishizuka, S. Safiullah i K. Kato, *J. Geochem. Explor.* **77** (2003) 109–131.
187. Ž. Romić, M. Habuda–Stanić, B. Kalajdžić i M. Kuleš, *Appl. Geochem.* **26** (2011) 37–44.
188. M. Ujević, Ž. Duić, C. Casiot, L. Sipos, V. Santo, Ž. Dadić i J. Halamić, *Appl. Geochem.* **25** (2010) 1017–1029.
189. A. Ahmad, A. van der Wal, P. Bhattacharya i C. M. van Genuchten, *Water Res.* **161** (2019), 505–516.
190. G. Samanta i D. A. Clifford, *Environ. Sci. Technol.* **39** (2005) 8877–8882.
191. M. Edwards S. Patel, L. Mcneill, H. W. Chen, M. Frey, A. D. Eaton, R. C. Antweiler i H. E. Tallor, *J. Am. Water Works Assoc.* **90** (1998) 103–113.
192. J. Aggett i M. R. Kriegman, *Water Res.* **22** (1988) 407–411.
193. A. Apelblat, *Citric acid*. Springer. (2014). ISBN 9783319112329.
194. A. Saritha, B. Raju, M. Ramachary, P. Raghavaiah i K. A. Hussain, *Physica B. Condens.* **407** (2012) 4208–4213.
195. M. Bohnet, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Weinheim, Germany: Wiley–VCH, (2003). ISBN: 9783527306732

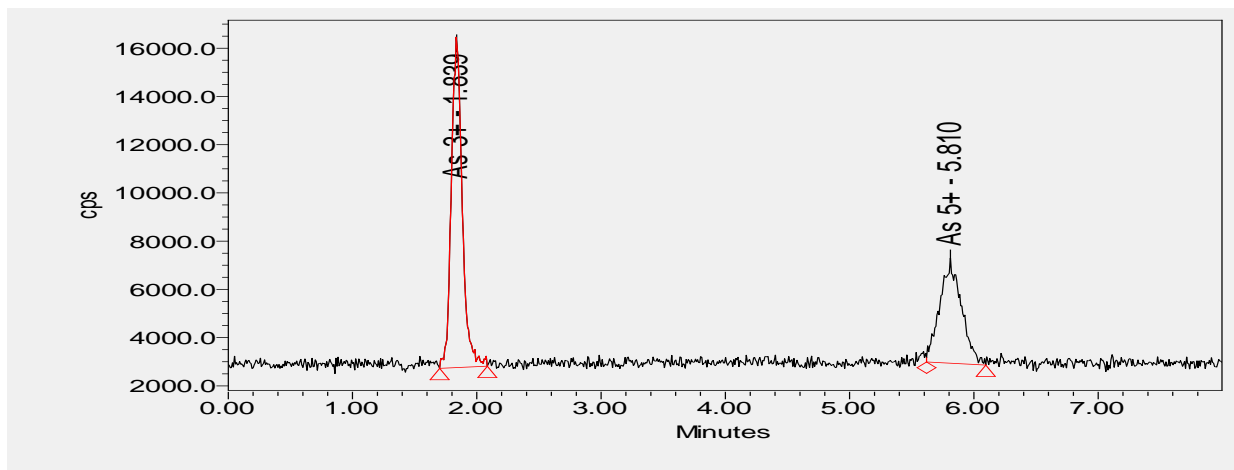
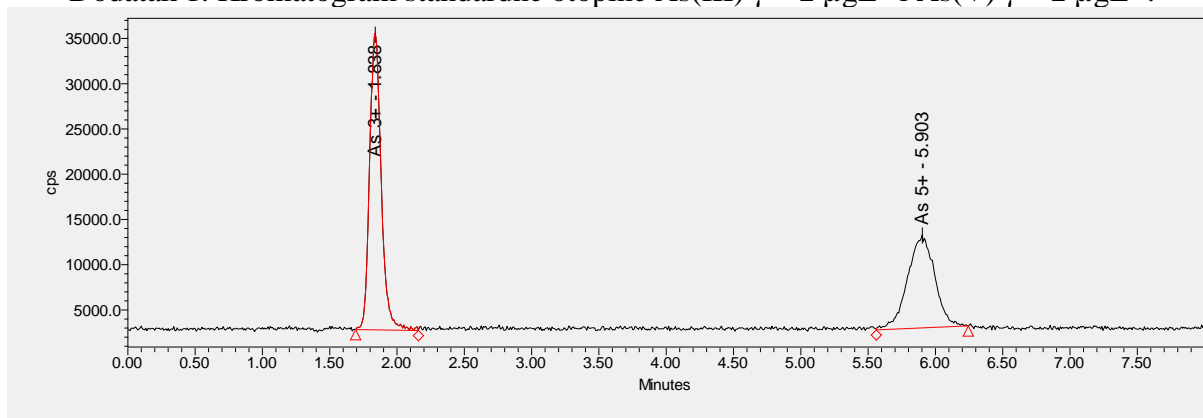
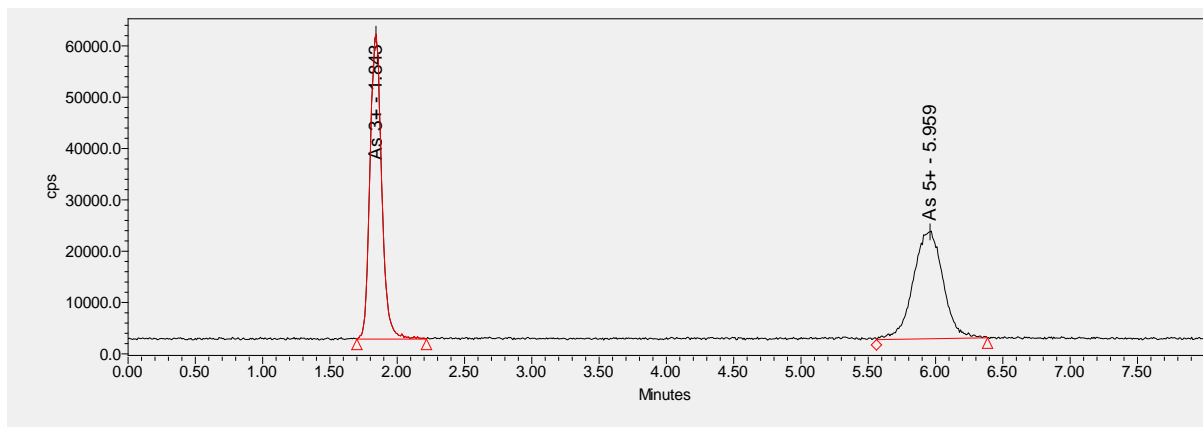
196. S. Duquesne i E. Kuster, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **73** (2010) 353–359.
197. W. He, M. Megharaj i R. Naidu, *Environ. Geochem. Health.* **31** (2009) 133–141.
198. M. T. Elnabarawy, A. N. Welter i R. R. Robideau, *Environ. Toxicol. Chem.* **5** (1986) 393–398.
199. J. R. Shaw, S. P. Glaholt, N. S. Greenberg, R. Sierra–Alvarez i C. L. Folt, *Environ. Toxicol. Chem.* **26** (2007) 1532–1537.
200. C. K. Jain i I. Ali, *Water Res.* **34** (2000) 4304–4312.
201. V. K. Sharma i M. Sohn, *Environ. Int.* **35** (2009) 743–759.
202. W. Zhang, A.J. Miao, N.X. Wang, C. Li, J. Sha, J. Jia, D. S. Alessi, B. Yan, Y. S. Ok, *Environ. Int.* **163** (2022) 107221.
203. T. Kuroiwa, A. Ohki, K. Naka i S. Maeda, *Appl. Organomet. Chem.* **8** (1994) 325–333.
204. Suhendrayatna, A. Ohki, T. Nakajima i S. Maeda, *Chemosphere.* **46** (2002) 325–331.
205. S. M. Bartell, R. H. Gardner i R. V. O’Neill, *Ecological Risk Estimation*. Lewis, Boca Raton, FL, USA (1992).
206. T. Tišler i J. Zagorc–Končan, *Bull Environ. Contam. Toxicol.* **69** (2002) 421–429.
207. K. E. Biesinger i G. M. Christensen, *J. Fish Res. Board. Can.* **29** (1972) 1691–1700.
208. O. Długosz, M. Sochocka, M. Ochnik i M. Banach, *J. Colloid Interface Sci.* **586** (2021) 807–818.
209. F. Ghorbani, P. Kokhaei, M. Ghorbani i M. Eslami, *Gene Rep.* **21** (2020) 100896.
210. A. Saravanan, P. S. Kumar, S. Karishma, D. V. N. Vo, S. Jeevanantham, P. R. Yaashikaa i C. S. George, *Chemosphere.* **264** (2021) 128580.
211. A. El–Hakim, M. Yasmina, A. Abdel–Rahman Mohamed, S. I. Khater, A. Hamed Arisha, M. M. Metwally, M. A. Nassan i M. E. Hassan, *Antioxidants.* **10** (2021) 17.
212. C. F. Jones i D. W. Grainger, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61** (2009) 438–456.
213. A. Kunhikrishnan, H. K. Shon, N. S. Bolan, I. El Saliby, S. Vigneswaran, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **45** (2015) 277–318.
214. V. Chernyshev, A. Zakharenko, S. Ugay, T. Hien, L. Hai, A. Kholodov, T. Burykina, A. Stratidakis, Y. O. Mezhuev i A. Tsatsakis, *Toxicol. Rep.* **5** (2018) 224–230.
215. K. Kettler, K. Veltman, D. van de Meent, A. van Wezel i A. J. Hendriks, *Environ. Toxicol. Chem.* **33** (2014) 481–492.
216. Y. Bai, Y. Zhang, J. Zhang, Q. Mu, W. Zhang, E. R. Butch, S. E. Snyder i B. Yan, *Nat. Nanotechnol.* **5** (2010) 683–689.

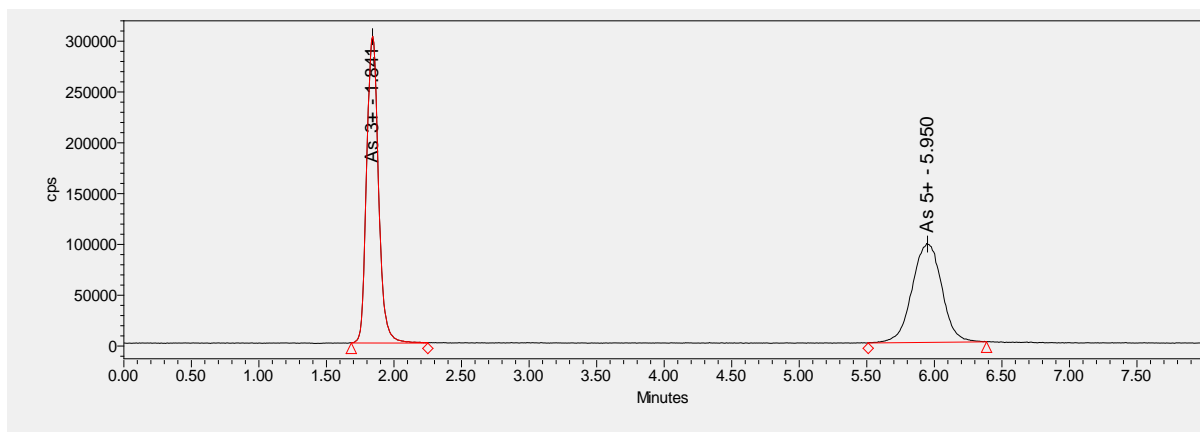
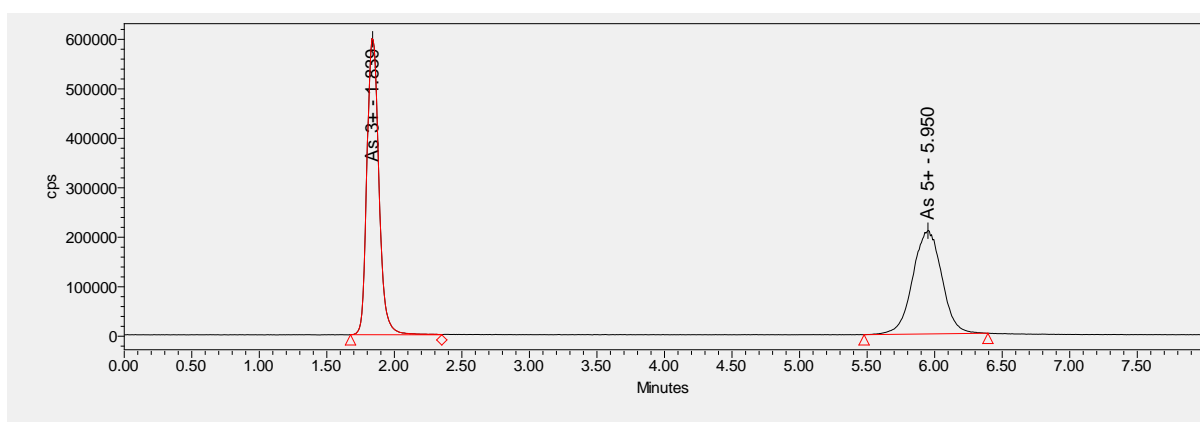
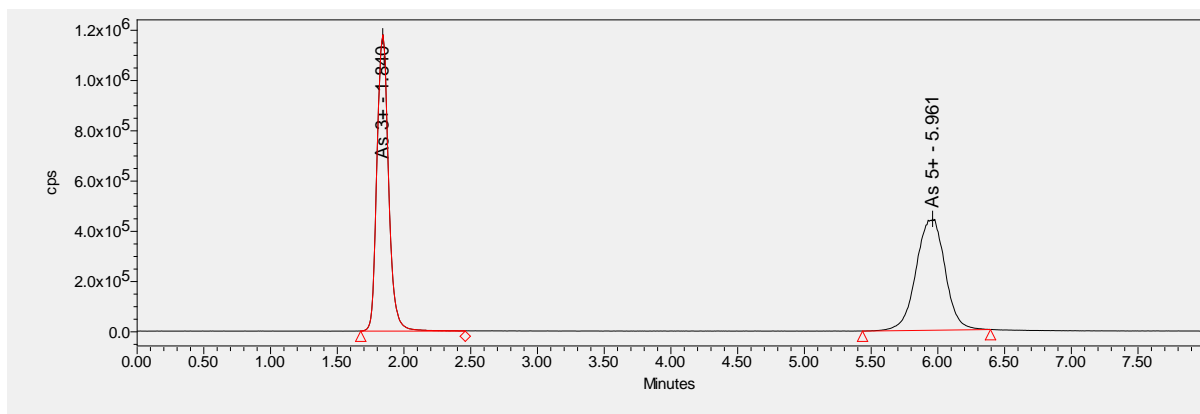
217. Y. Zhang, Y. Bai, J. Jia, N. Gao, Y. Li, R. Zhang, G. Jiang i B. Yan, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014) 3762–3809.
218. D. Armstrong, D. J. Bharali, D. Armstrong i D. Bharali, *Oxidative Biomarkers to Assess the Nanoparticle–Induced Oxidative Stress. In Oxidative Stress and Nanotechnology. Methods and Protocols*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, (2013) 205–219.
219. G. Bystrzejewska–Piotrowska, J. Golimowski i P. L. Urban, *Waste Manag.* **29** (2009) 2587–2595.
220. H. Ma, L. K. Wallis, S. Diamond, S. Li, J. Canas–Carrell i A. Parra, *Environ. Pollut.* **193** (2014) 165–172.
221. D. Lin, J. Ji, X. Tian, N. Liu, K. Yang, F. Wu, Z. Wang i B. Xing, *Chin. Sci. Bull.* **54** (2009) 3590–3604.
222. J. Wang, Y. Nie, H. Dai, M. Wang, L. Cheng, Z. Yang, S. Chen, G. Zhao, L. Wu i S. Guang, *Environ. Sci. Nano.* **6** (2019) 1332–1342.
223. A. N. Abdel Rahman, M. El Hady, M. E. Hassanin i A. A. R. Mohamed, *Aquaculture.* **509** (2019) 198–208.
224. A. A. R. Mohamed, W. El–Houseiny, E. M. Abd Elhakeem, L. L. Ebraheim, A. I. Ahmed i Y. M. Abd El–Hakim, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **188** (2020) 109890.
225. Y. M. Abd–Elhakim, M. M. Hashem, K. Abo–EL–Sooud, B.A. Hassan, K. M. Elbohi i A. A. Al–Sagheer, *Toxics.* **9** (2021) 284–301.
226. X. Yin, L. Wang, G. Duan i G. Sun, *J. Environ. Sci.* **23** (2011) 1186–1193.
227. M. Nordberg i G. F. Nordberg, *Met. Ions Life Sci.* **5** (2009) 1–29.
228. W. P. Norwood, U. Borgmann i D. G. Dixon, *Environ. Pollut.* **147** (2007) 262–272.
229. M. K. T. Tsui i W. X. Wang, *Environ. Toxicol. Chem.* **26** (2007) 1023–1032.
230. M. A. Rahman i C. Hassler, *Aquat. Toxicol.* **146** (2014) 212–219.
231. N. Bury i M. Grosell, *Comp. Biochem. Physiol. Part – C: Toxicol. Pharmacol.* **135** (2003) 97–105.
232. T. Fagundes, A. W. Ledra Bachmann, H. S. Overrath Tomaz i C. A. Rodrigues, *Quim. Nova.* **31** (2008) 1305–1309.
233. C. Chen, X. Jiang, Y. Ren i Z. Zhang, *Biol. Trace Elem. Res.* **156** (2013) 338–349.
234. M. F. Naujokas, B. Anderson, H. Ahsan, H. V. Aposhian, J. H. Graziano, C. Thompson i W. A. Suk, *Environ. Health Perspect.* **121** (2013) 295–302.
235. A. H. Smith i C. M. Steinmaus, *Annu. Rev. Public Health.* **30** (2009) 107–122.

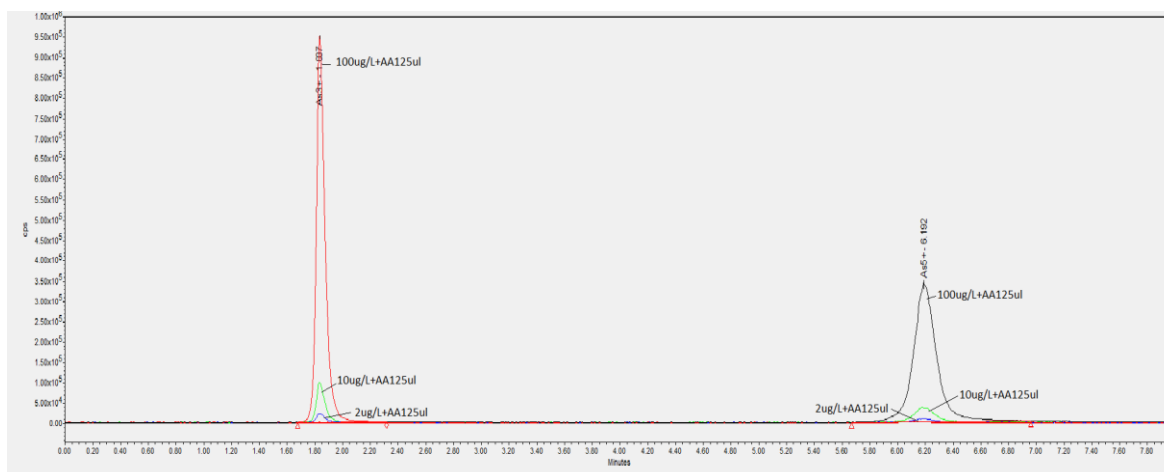
236. L. Benbrahim–Tallaa i M. P. Waalkes, *Environ. Health Perspect.* **116** (2008) 158–164.
237. T. Yoshida, H. Yamauchi i G. F. Sun, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **198** (2004), 243–252.
238. J. S. Tsuji, V. Perez, M. R. Garry i D. D. Alexander, *Toxicology.* **323** (2014) 78–94.
239. E. A. Maull, H. Ahsan, J. Edwards, M. P. Longnecker, A. Navas–Acien, J. Pi, E. K. Silbergeld, M. Styblo, C. H. Tseng, K. A. Thayer i D. Loomis, *Environ. Health Perspect.* **120** (2012) 1658–1670.
240. X. Li, B. Li, S. Xi, Q. Zheng, X. Lv i G. Sun, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **20** (2013) 8151–8161.
241. Y. Chen, F. Parvez, M. Gamble, T. Islam, A. Ahmed, M. Argos, J. H. Graziano i H. Ahsan, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **239** (2009) 184–192.
242. A. Herrera, J. Pineda i M. Teresa Antonio, *Environ. Toxicol. Phar.* **36** (2013) 73–79.
243. K. M. McCarty, E. A. Houseman, Q. Quamruzzaman, M. Rahman, G. Mahiuddin, T. Smith, L. Ryan i D. C. Christiani, *Environ. Health Perspect.* **114** (2006) 334–340.
244. D. Sinha, M. Roy, M. Siddiqi i R. K. Bhattacharya, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **24** (2005) 45–56.
245. Y. Wang i F. Zhao, *J. Environ. Health.* **26** (2009) 1046–1048.
246. L. Li, P. Qiu, B. Chen, Y. Lu, K. Wu, C. Thakur, Q. Chang, J. Sun i F. Chen, *Toxicol. Appl. Pharm.* **276** (2014) 165–170.
247. F. Tortora, R. Notariale, V. Maresca, K. V. Good, S. Sorbo, A. Basile, M. Piscopo i C. Manna, *Antioxidants.* **8** (2019) 220–234.
248. P. C. Paul, M. Misbahuddin, A. N. N. Ahmed, Z. F. Dewan i M. A. Mannan, *Toxicol. Lett.* **135** (2002) 193–197.
249. M. M. Rahman, F. Rahman, L. Sansom, R. Naidu i O. Schmidt, *Environ. Geochem. Health.* **31** (2009) 201–206.
250. K. Jomova, Z. Jenisova, M. Feszterova, S. Baros, J. Liska, D. Hudecova, C. J. Rhodes i M. Valko, *J. Appl. Toxicol.* **31** (2011) 95–107.
251. S. Ahmad, K. T. Kitchin i W. R. Cullen, *Arch. Biochem. Biophys.* **382** (2000) 195–202.
252. S. Poddar, P. Mukherjee, G. Talukder i A. Sharma, *Food Chem. Toxicol.* **38** (2000) 735–737.
253. V. R. M. Chandrasekaran, I. Muthaiyan, P. C. Huang i M. Y. Liu, *Water Res.* **44** (2010) 5823–5827.

254. S. Liu, X. Guo, X. Zhang, Y. Cui, Y. Zhang i B. Wu, *Environ. Sci. Technol.* **47** (2013) 3432–3438.
255. J. Liu i M. P. Waalkes, *Toxicol. Sci.* **105** (2008) 24–32.
256. C. S. J. Chen i D. M. Siegel, *eMedicine J.* **2** (2001).
257. P. Jai, G. Chen, X. Huang, X. Cai, J. Yang, L. Wang, Y. Zhou, Y. Shen, L. Zhou, Y. Yu, S. Chen, X. Zhang i Z. Wang, *Chin. Med. J.* **114** (1999) 19–24.
258. P. B. Tchounwou, B. A. Wilson, A. A. Abdelgnani, A. B. Ishaque i A. K. Patlolla, *Int. J. Mol. Sci.* **3** (2002) 1117–1132.
259. P. B. Tchounwou, C. G. Yedjou i W. C. Dorsey, *Cell. Mol. Biol.* **49** (2003) 1071–1079.
260. S. L. Soignet, S. R. Frankel, D. Douer, M. S. Tallman, H. Kantarjian, E. Calleja, R. M. Stone, M. Kalaycio, D. A. Scheinberg, P. Steinherz, E. L. Sievers, S. Coutré, S. Dahlberg, R. Ellison i R. P. Warrell Jr., *J. Clin. Oncol.* **19** (2001) 3852–3860
261. Y. Abiko, Y. Shinkai, D. Sumi i Y. Kumagai, *J. Toxicol. Sci.* **35** (2010) 419–423.
262. O. Alp, Y. F. Zhang, E. J. Merino i J. A. Caruso, *Metallomics.* **3** (2011) 482–490.
263. S. Aisling Aherne, J. P. Kerry i N. M. O'Brien, *Brit. J. Nutr.* **97** (2007) 321–328.
264. C. Huang, L. Y. Liu, T. S. Song, L. Ni, L. Yang, X. Y. Hu, J. S. Hu, L. P. Song, Y. Luo i L. S. Si, *World J. Gastroenterol.* **11** (2005) 4519–4523.
265. L. Nonn, M. Berggren i G. Powis, *Mol. Cancer Res.* **1** (2003) 682–689.
266. R. A. Cairns, I. S., Harris i T. W. Mak, *Nat. Rev. Cancer.* **11** (2011) 85–95.
267. M. L. Circu i T. Y. Aw, *Free Radic. Biol. Med.* **48** (2010) 749–62.
268. Y. J. Kim i Y. J. M. Kim, *Dev. Reprod.* **19** (2015) 167–180.
269. T. Kabir, S. Anwar, J. Taslem Mourosi, J. Hossain, M. G. Rabbane, M. M. Rahman, T. Tahsin, M. N. Hasan, M. C. Shill i M. J. Hosen, *Toxicol. Rep.* **7** (2020) 155–161.
270. A. Kulshrestha, U. Jarouliya, G. Prasad, S. Flora i P. S. Bisen, *World J. Transl. Med.* **3** (2014) 96–111.
271. J. C. Saha, A. K. Dikshit, M. Bandyopadhyay i K. C. Saha, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **29** (1999) 281–313.
272. Y. Wang, Y. Liu, S. Liu i B. Wu, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **16** (2019) 4484.

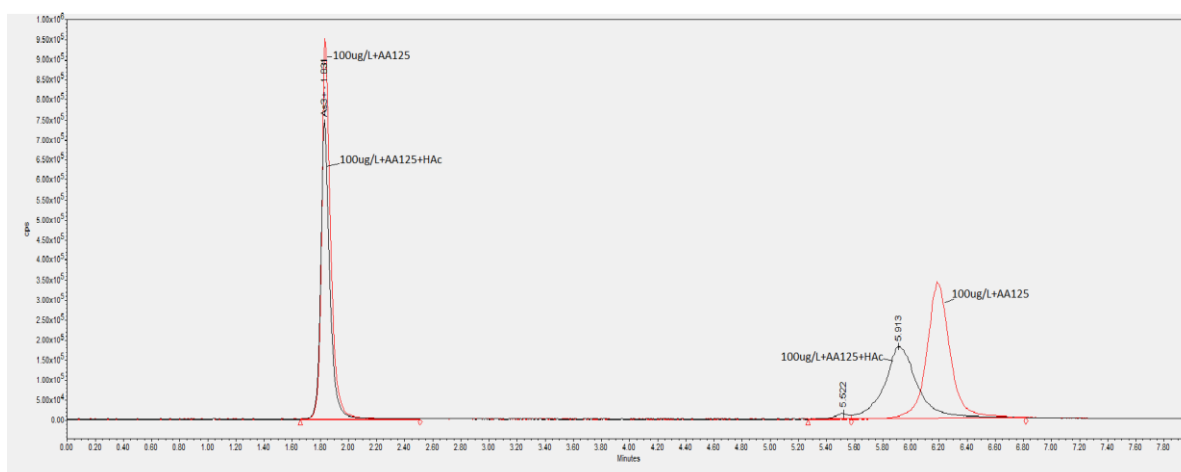
§ 8. DODATAK

Dodatak 1. Kromatogram standardne otopine As(III) $\gamma = 2 \mu\text{gL}^{-1}$ i As(V) $\gamma = 2 \mu\text{gL}^{-1}$.Dodatak 2. Kromatogram standardne otopine As(III) $\gamma = 5 \mu\text{gL}^{-1}$ i As(V) $\gamma = 5 \mu\text{gL}^{-1}$.Dodatak 3. Kromatogram standardne otopine As(III) $\gamma = 10 \mu\text{gL}^{-1}$ i As(V) $\gamma = 10 \mu\text{gL}^{-1}$.

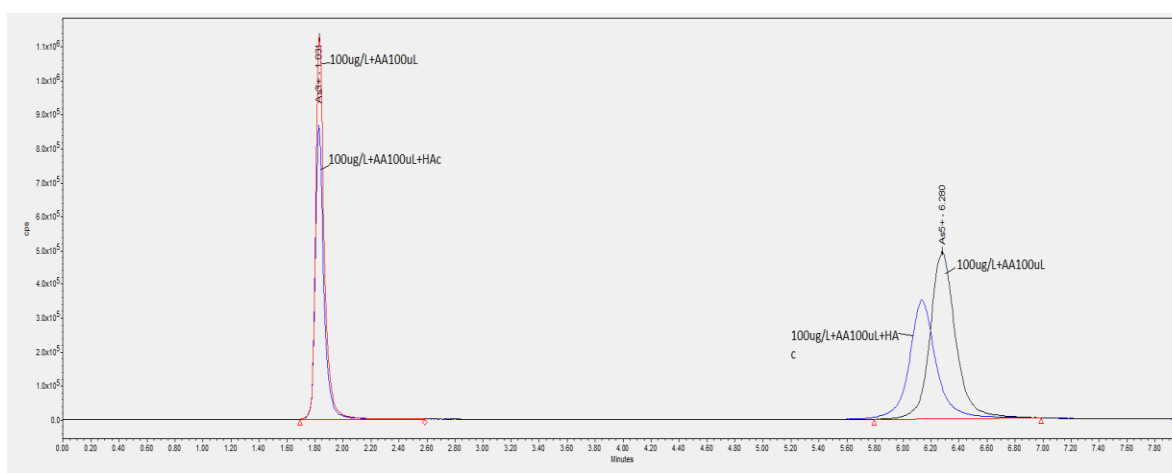
Dodatak 4. Kromatogram standardne otopine As(III) $\gamma = 50 \mu\text{gL}^{-1}$ i As(V) $\gamma = 50 \mu\text{gL}^{-1}$.Dodatak 5. Kromatogram standardne otopine As(III) $\gamma = 100 \mu\text{gL}^{-1}$ i As(V) $\gamma = 100 \mu\text{gL}^{-1}$.Dodatak 6. Kromatogram standardne otopine As(III) $\gamma = 200 \mu\text{gL}^{-1}$ i As(V) $\gamma = 200 \mu\text{gL}^{-1}$.



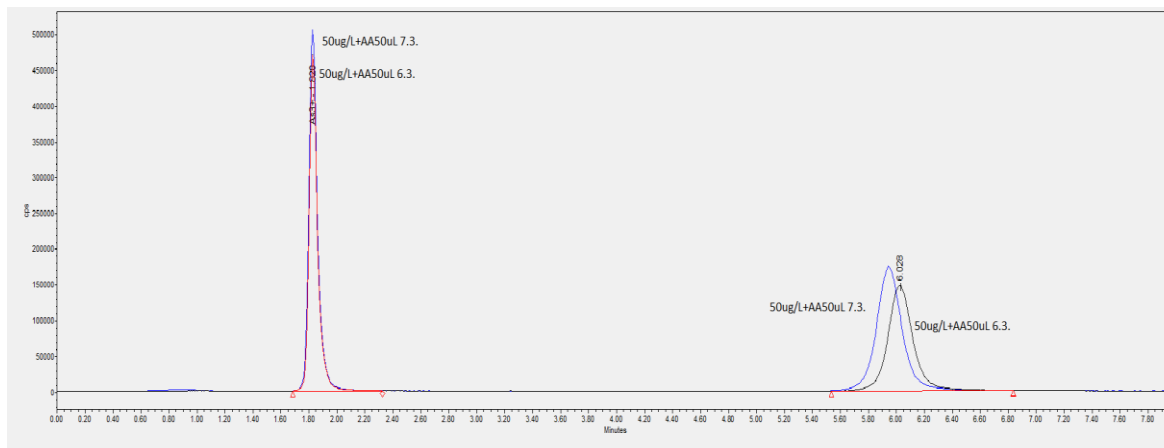
Dodatak 7. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija 2, 10 i 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom AA (askorbinske kiseline) 125 μL (2.5 mM u konačnom volumenu).



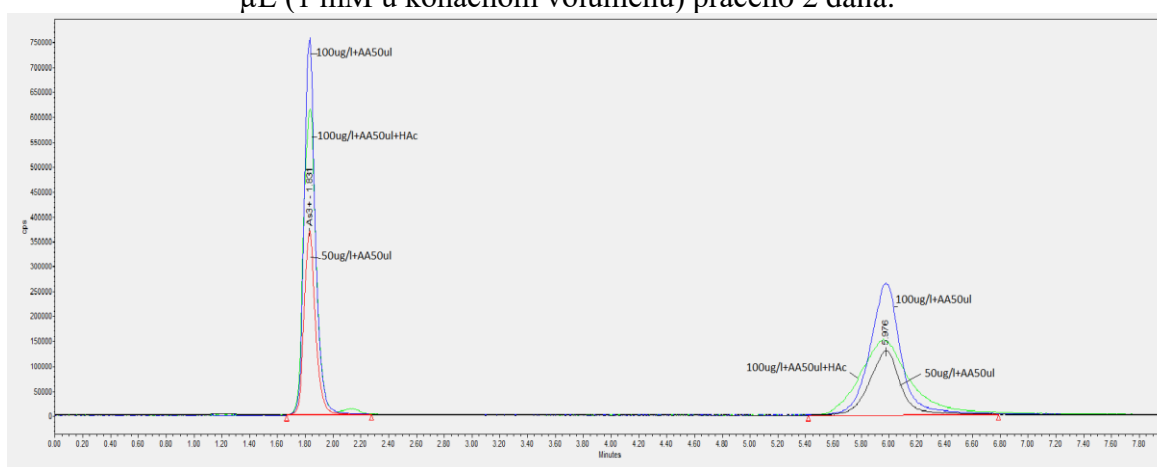
Dodatak 8. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracije 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom AA 125 μL (2.5 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu).



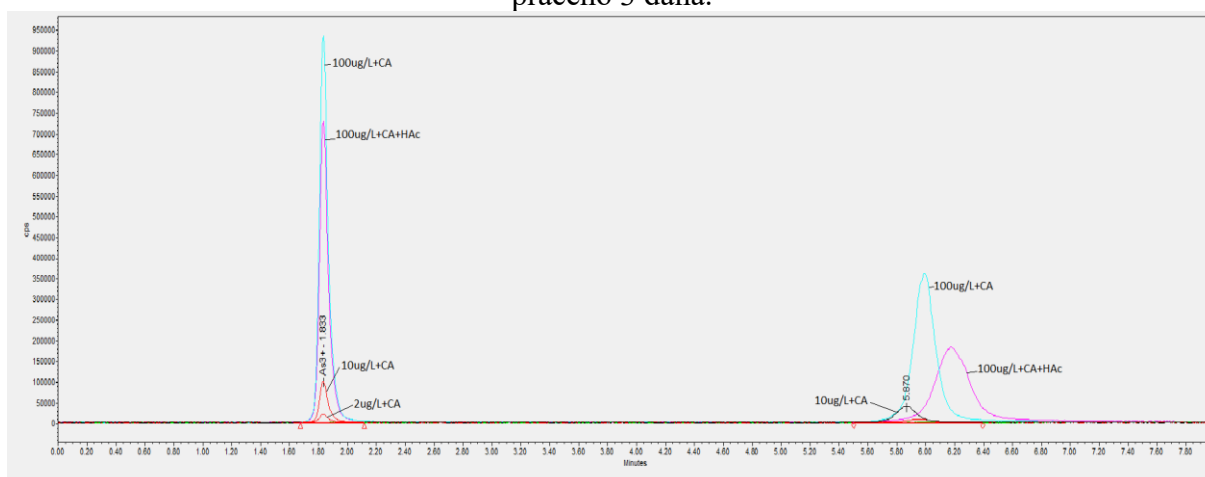
Dodatak 9. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracije 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom AA 100 μL (2 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu).



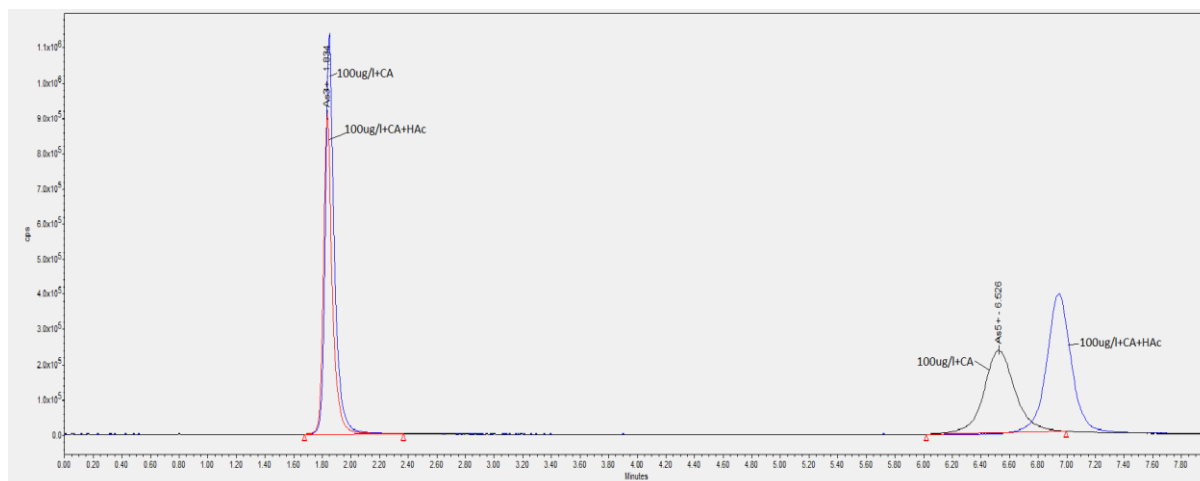
Dodatak 10. Kromatogram otopine As(III) i As(V) koncentracij 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom AA 50 μL (1 mM u konačnom volumenu) praćeno 2 dana.



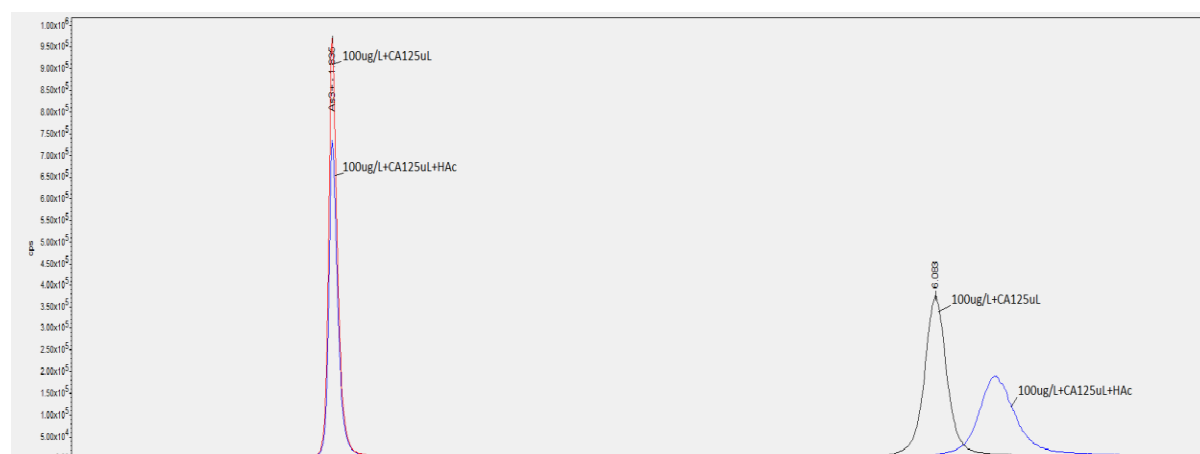
Dodatak 11. Kromatogram otopine As(III) i As(V) koncentracije 50 i 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom AA 50 μL (1 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu) praćeno 3 dana.



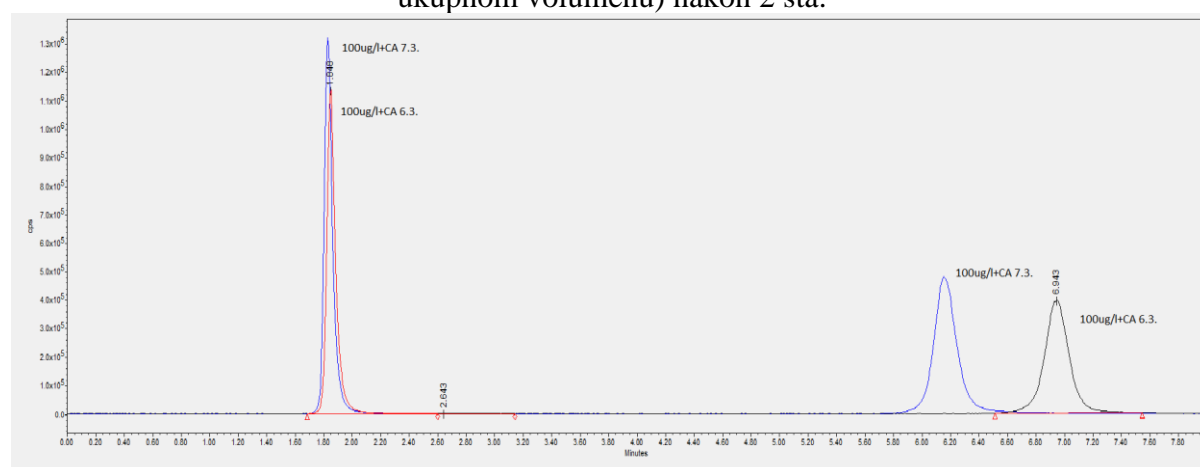
Dodatak 12. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracije 2,10,100 $\mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom CA 125 μL (2,5 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu).



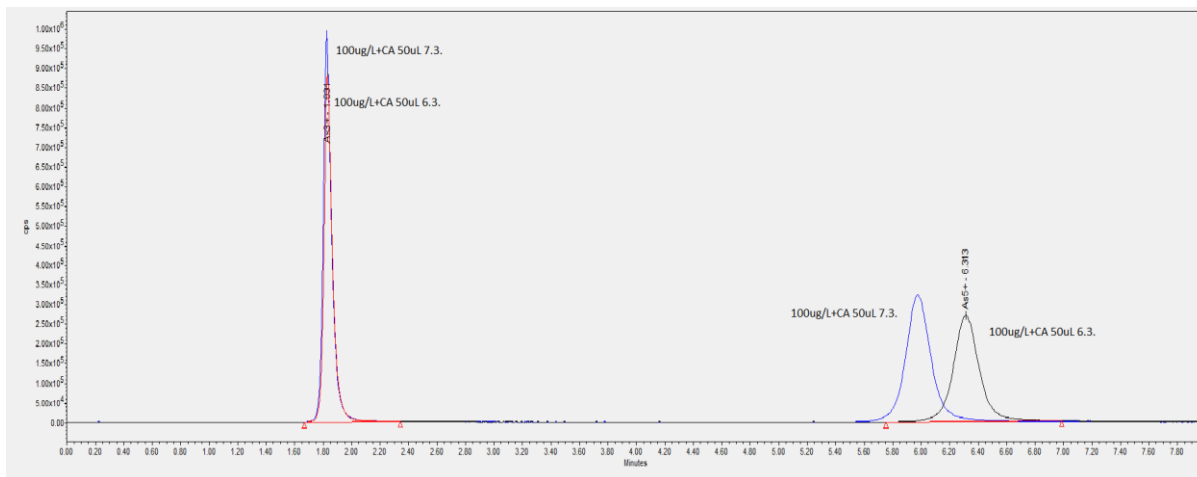
Dodatak 13. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracije $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom CA (citratne kiseline) $125 \mu\text{L}$ (2.5 mM u ukupnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu).



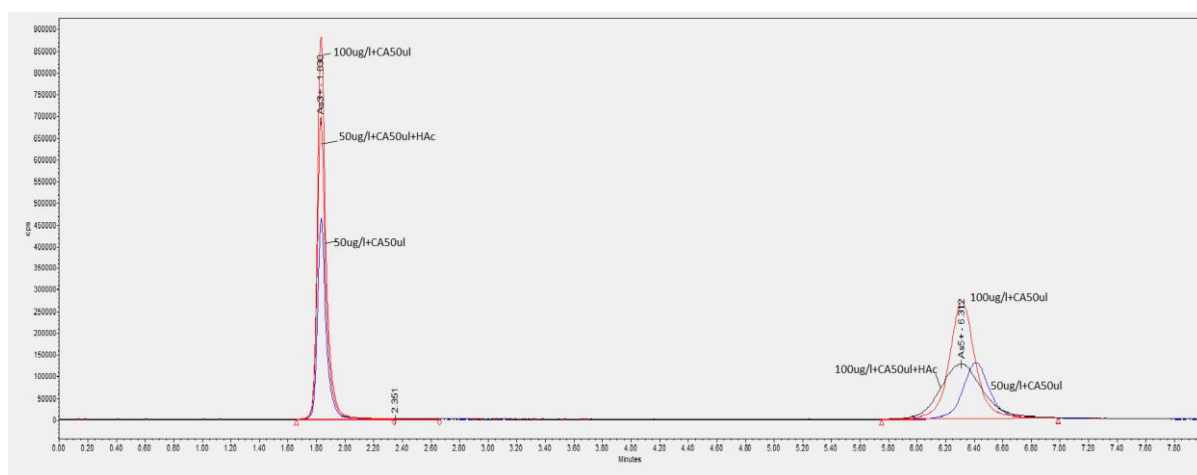
Dodatak 14. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracije $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom CA (citratne kiseline) $125 \mu\text{L}$ (2.5 mM u ukupnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu) nakon 2 sta.



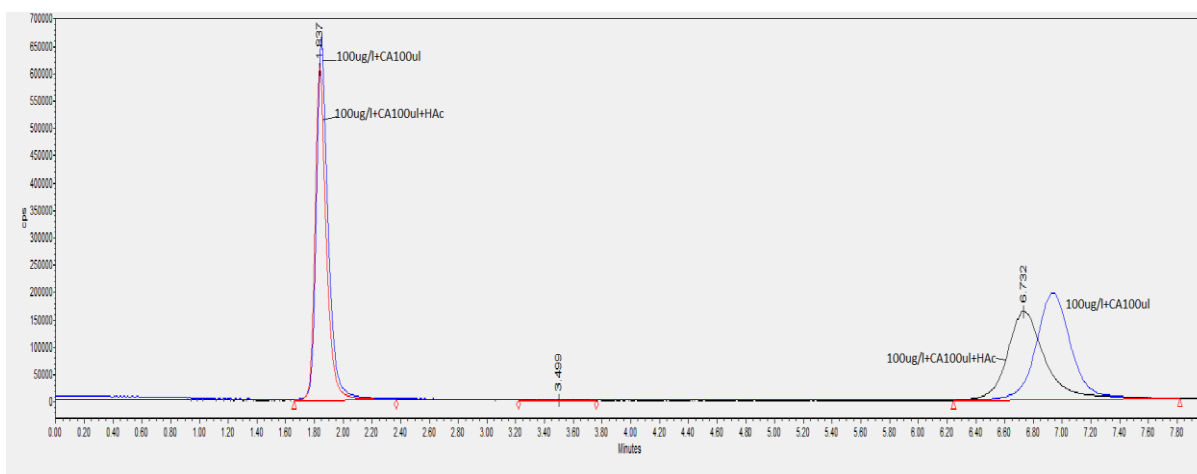
Dodatak 15. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracije $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom CA (citratne kiseline) $100 \mu\text{L}$ (2 mM u konačnom volumenu) praćeno 2 dana.



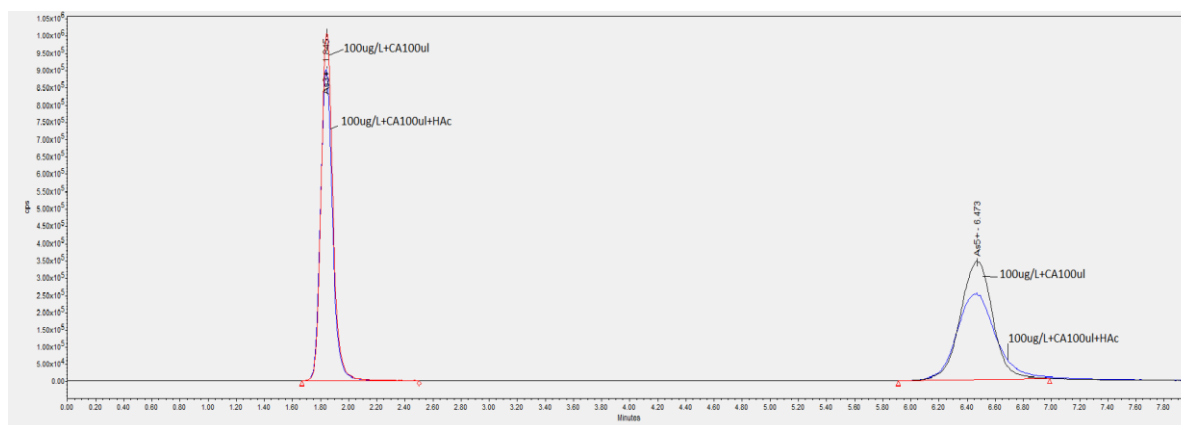
Dodatak 16. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracije $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom CA (citratne kiseline) $50 \mu\text{L}$ (1 mM u konačnom volumenu) praćeno 2 dana.



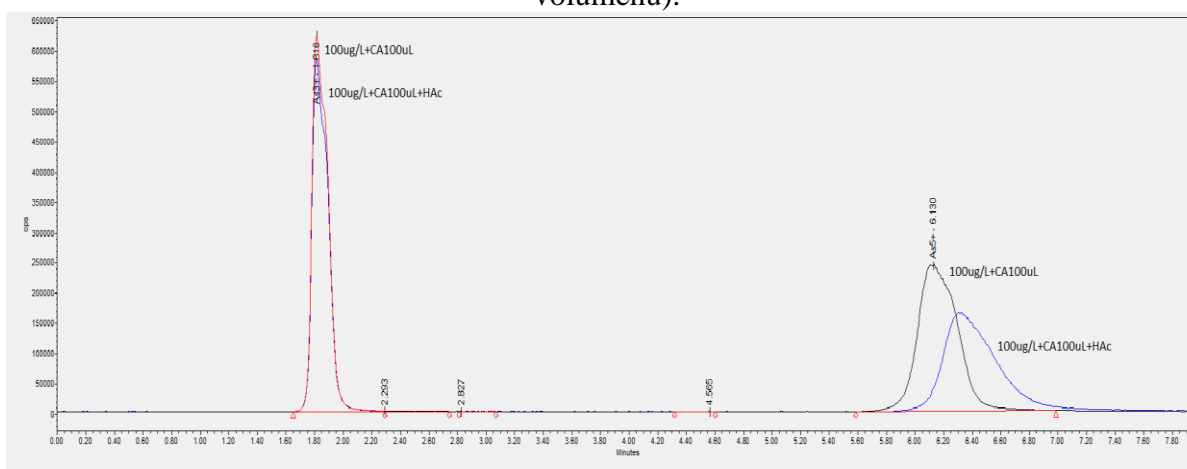
Dodatak 17. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija 50 i $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom CA (citratne kiseline) $50 \mu\text{L}$ (1 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1% u ukupnom volumenu).



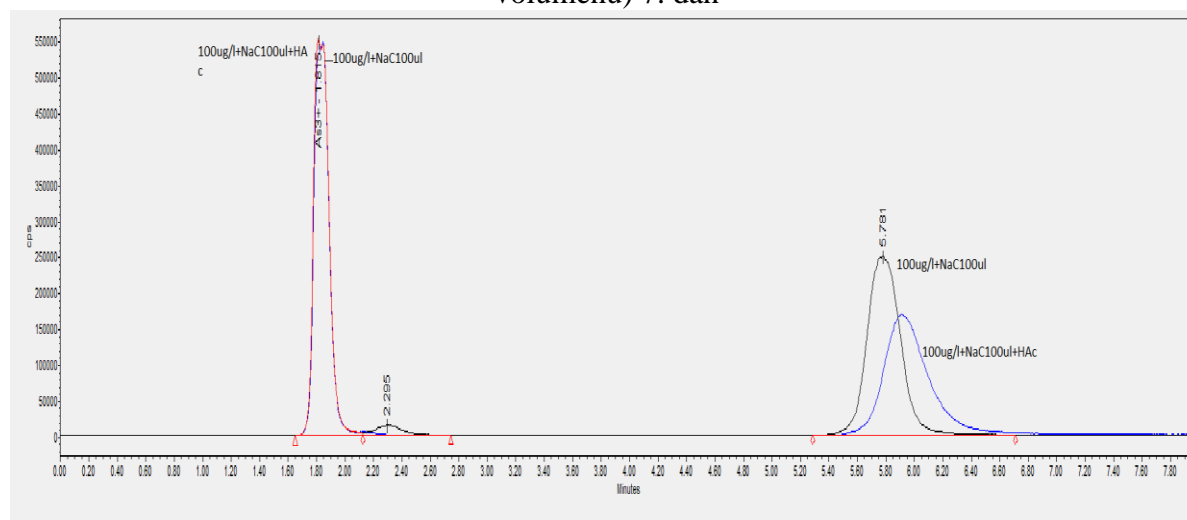
Dodatak 18. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom CA (citratne kiseline) $100 \mu\text{L}$ (2 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1% u ukupnom volumenu).



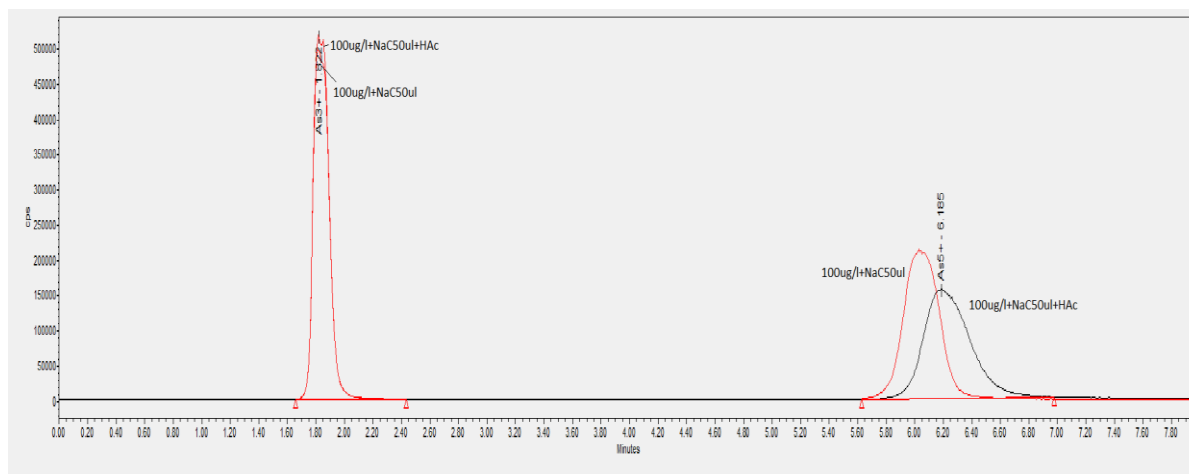
Dodatak 19. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom CA (citratne kiseline) $100 \mu\text{L}$ (2 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1% u ukupnom volumenu).



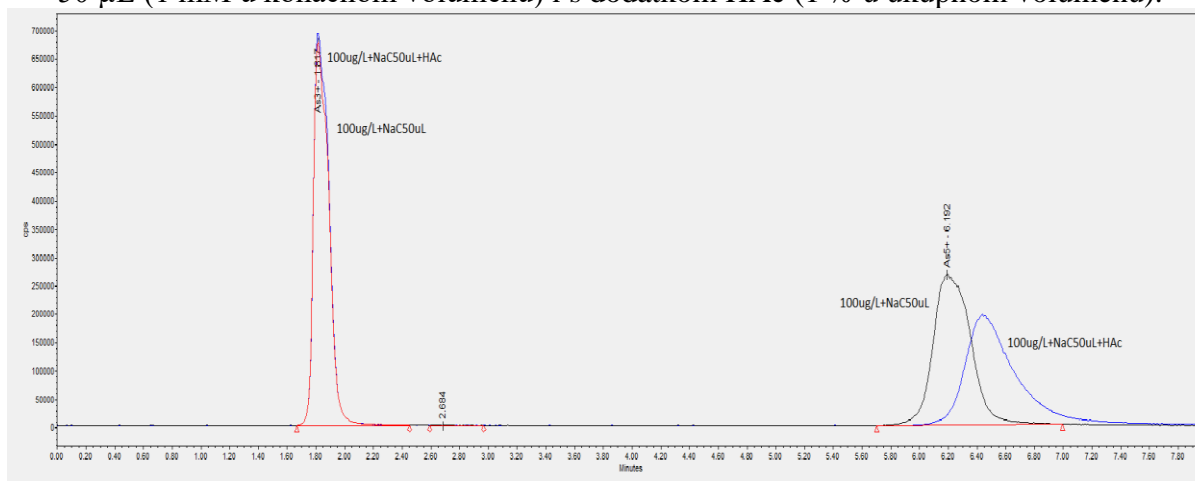
Dodatak 20. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom CA (citratne kiseline) $100 \mu\text{L}$ (2 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1% u ukupnom volumenu) 7. dan



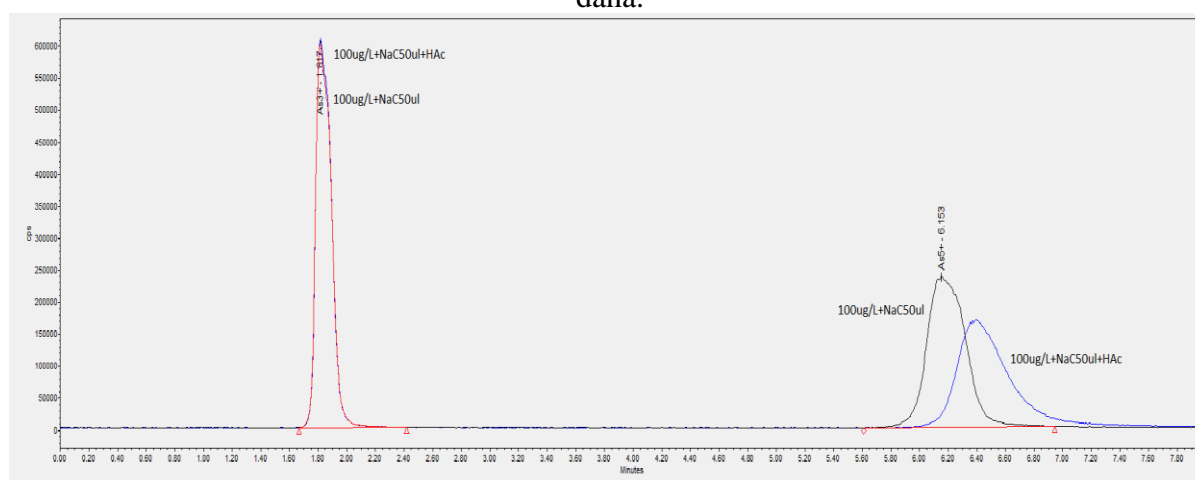
Dodatak 21. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom NaCl $100 \mu\text{L}$ (2 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1% u ukupnom volumenu).



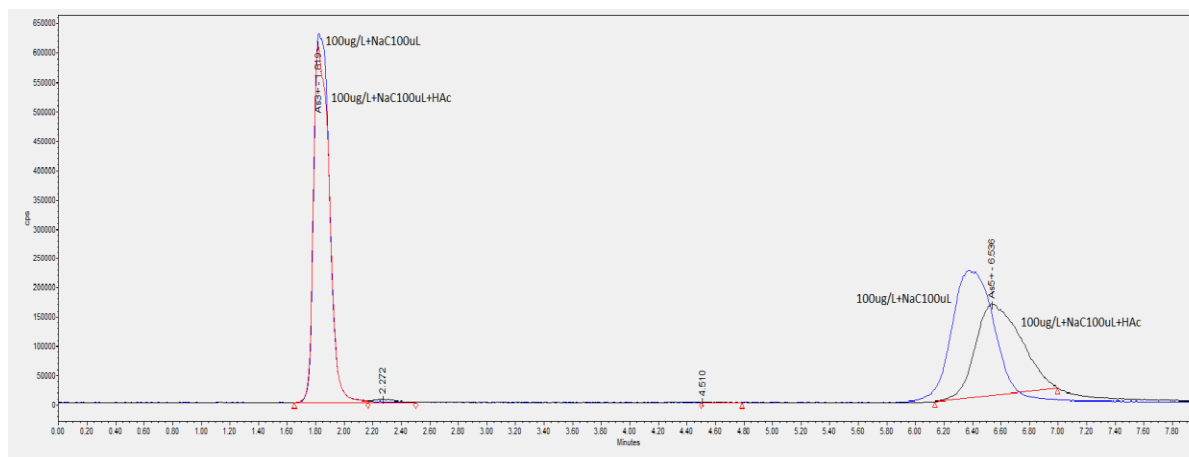
Dodatak 22. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom NaC 50 μL (1 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu).



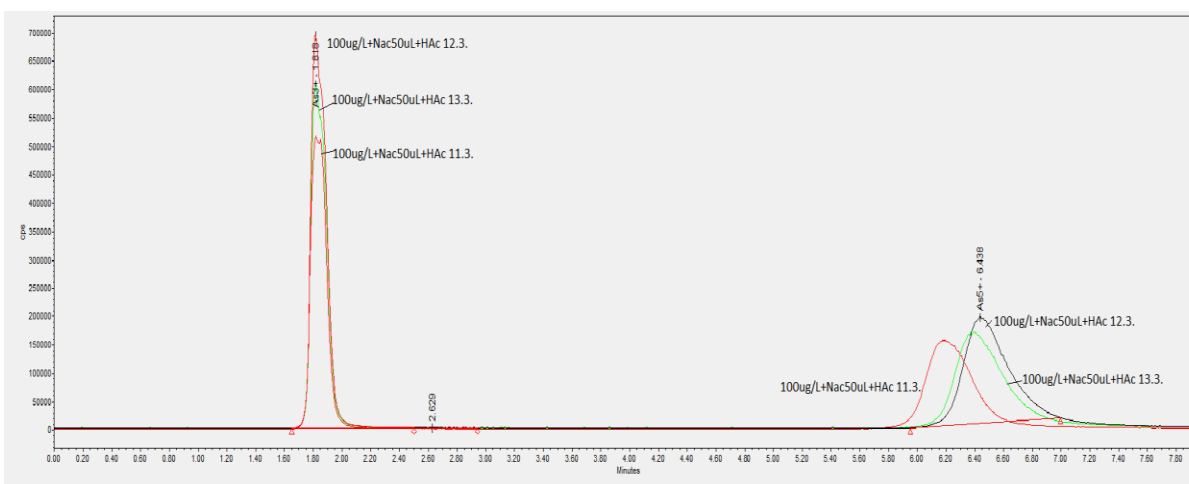
Dodatak 23. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom NaC 50 μL (1 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu) nakon 2 dana.



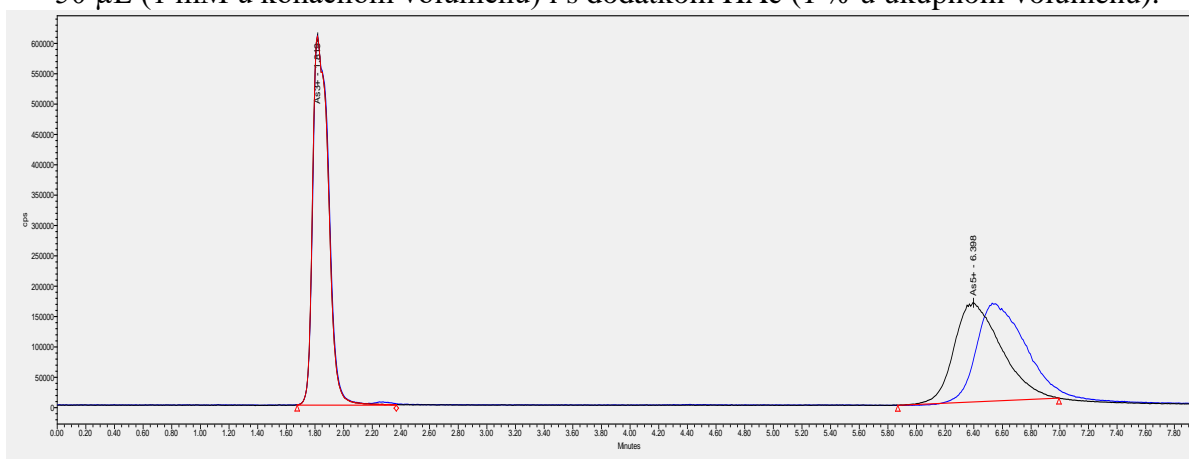
Dodatak 24. Otopina As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom NaC 50 μL (1 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu) nakon 3 dana.



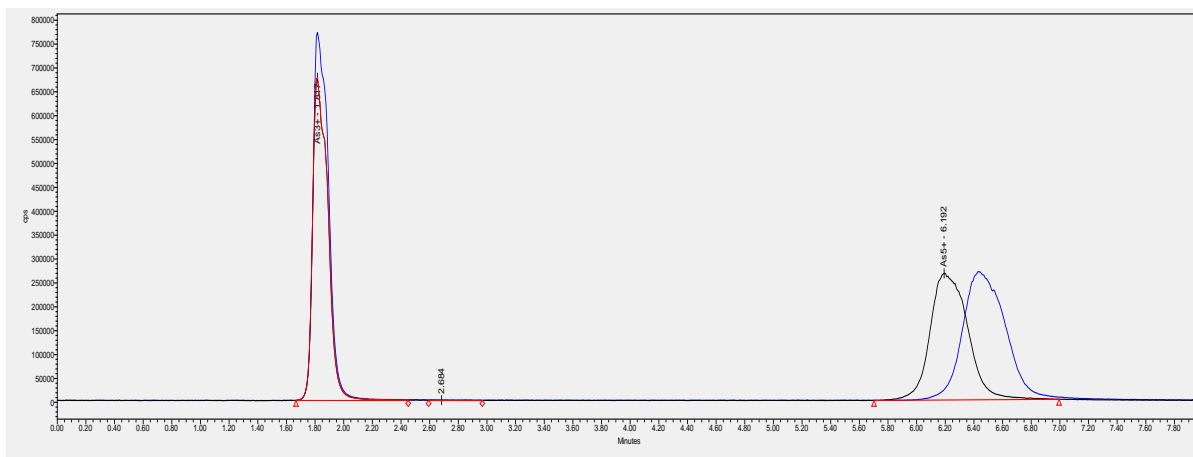
Dodatak 25. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom NaC $100 \mu\text{L}$ (2 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1% u ukupnom volumenu) nakon 3 dana.



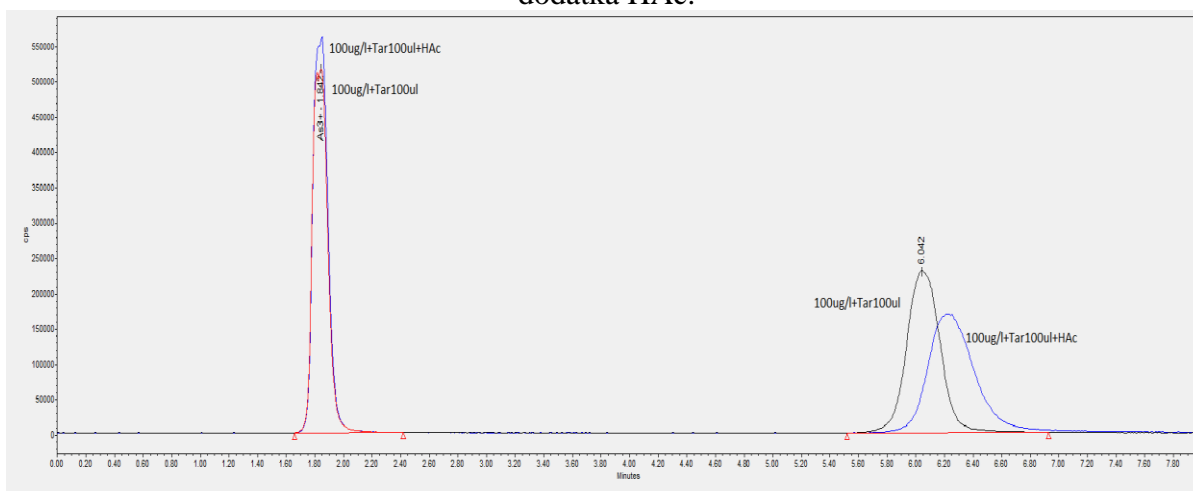
Dodatak 26. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom NaC $50 \mu\text{L}$ (1 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1% u ukupnom volumenu).



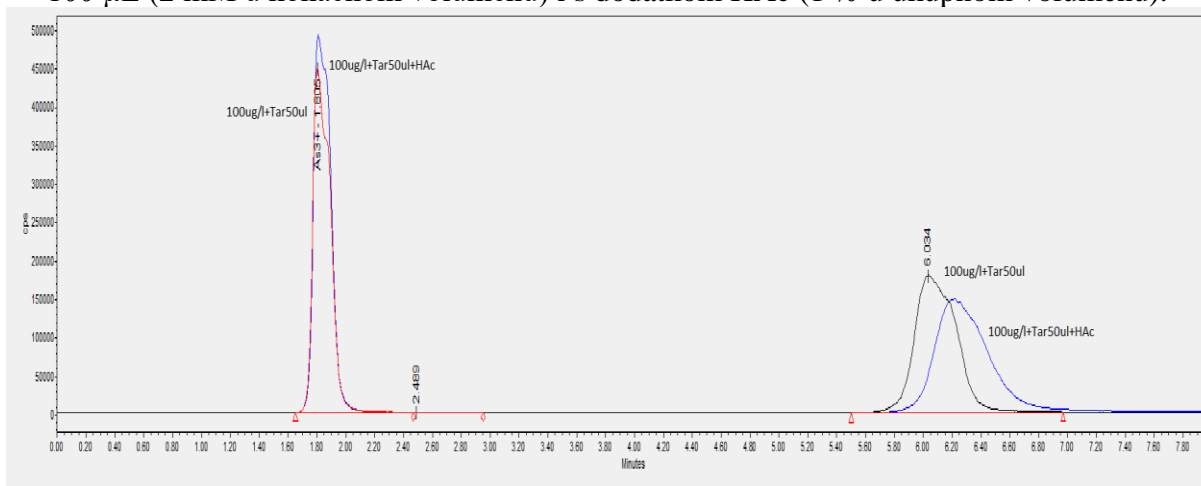
Dodatak 27. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom NaC $100 \mu\text{L}$ (2 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1% u ukupnom volumenu) i bez dodatka HAc.



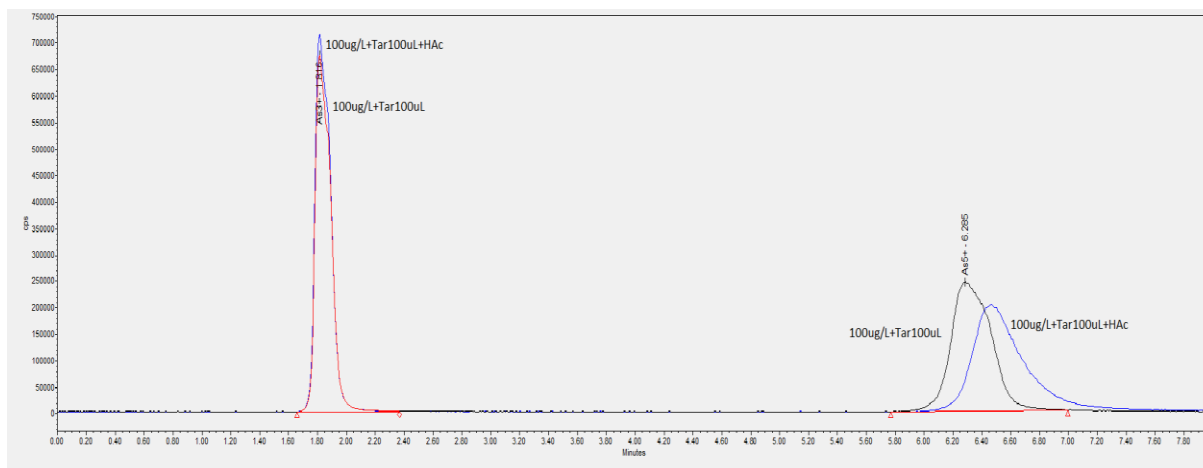
Dodatak 28. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom NaC $50 \mu\text{L}$ (1 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAC (1 % u ukupnom volumenu) i bez dodatka HAC.



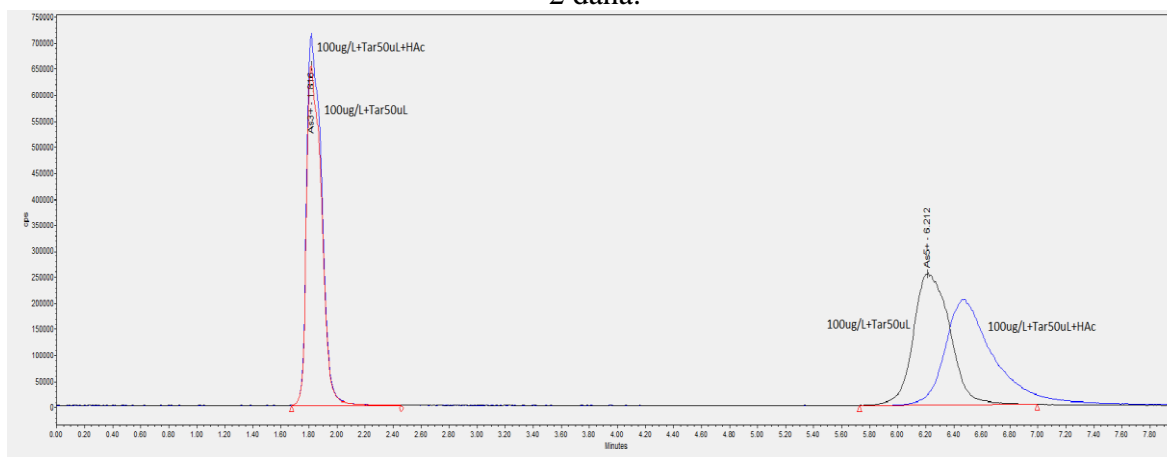
Dodatak 29. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom TAR $100 \mu\text{L}$ (2 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAC (1 % u ukupnom volumenu).



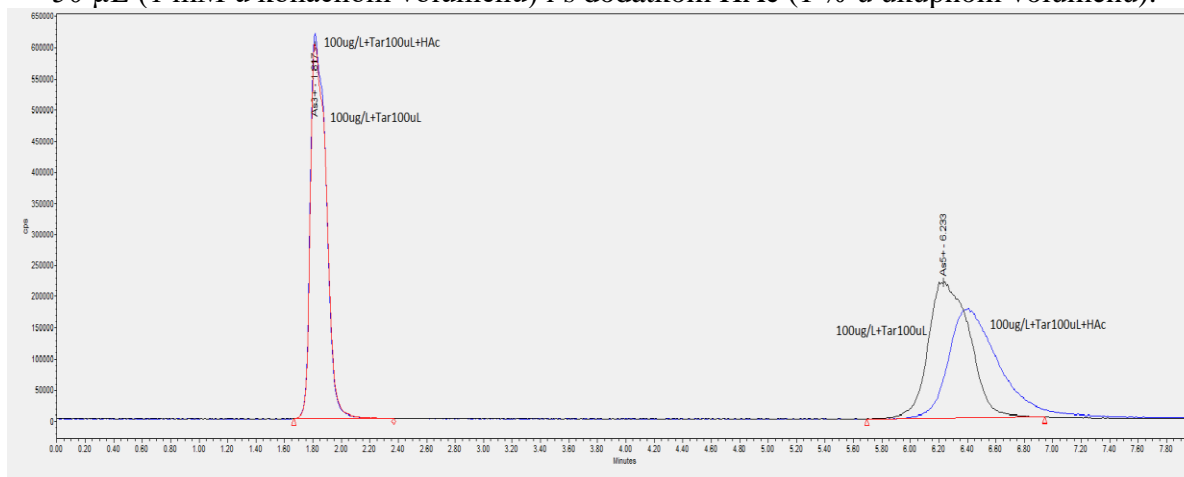
Dodatak 30. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom TAR $50 \mu\text{L}$ (1 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAC (1 % u ukupnom volumenu).



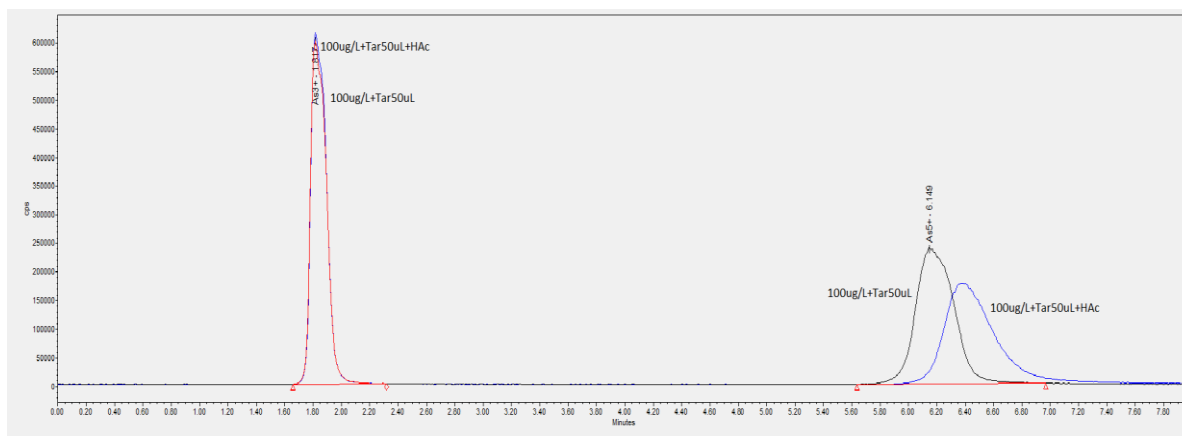
Dodatak 31. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom TAR $100 \mu\text{L}$ (2 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1% u ukupnom volumenu) nakon 2 dana.



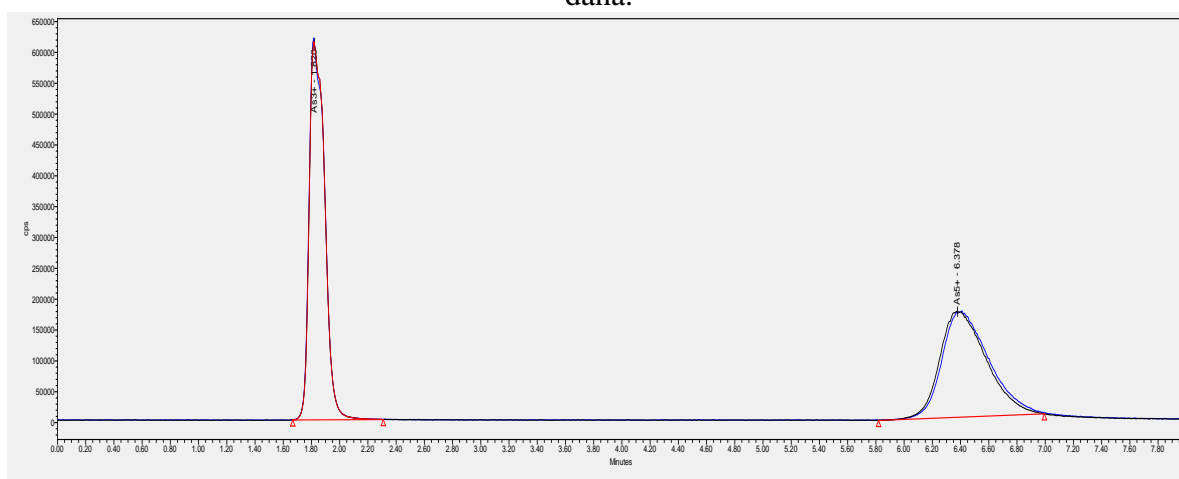
Dodatak 32. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom TAR $50 \mu\text{L}$ (1 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1% u ukupnom volumenu).



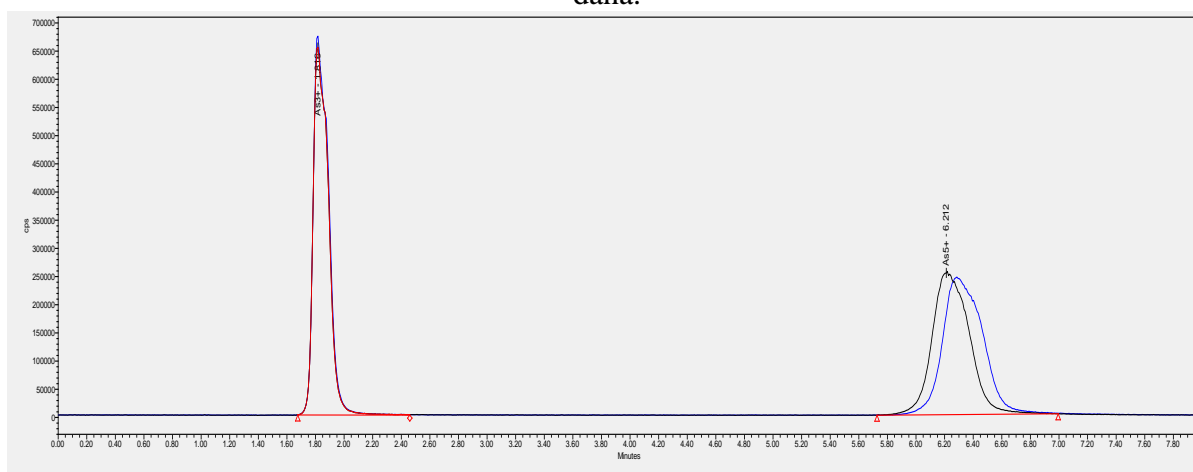
Dodatak 33. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom TAR $100 \mu\text{L}$ (2 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1% u ukupnom volumenu) nakon 2 dana.



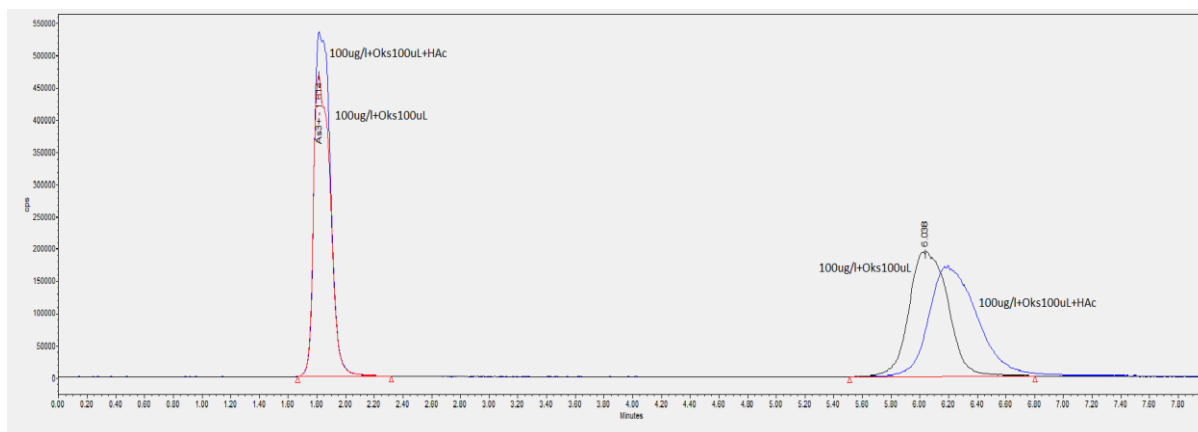
Dodatak 34. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom TAR $50 \mu\text{L}$ (1 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu) nakon 2 dana.



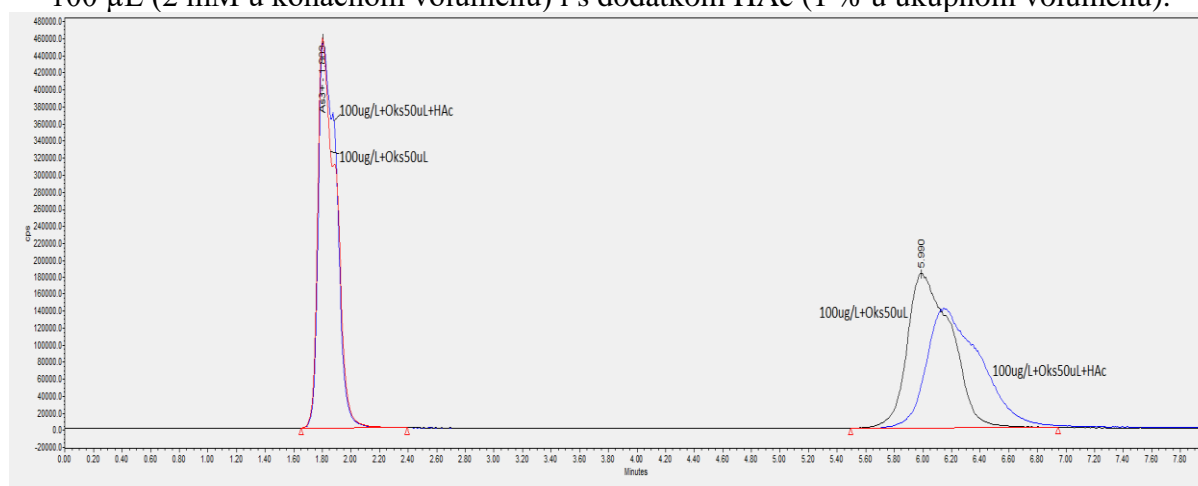
Dodatak 35. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom TAR $50 \mu\text{L}$ (1 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu) nakon 5 dana.



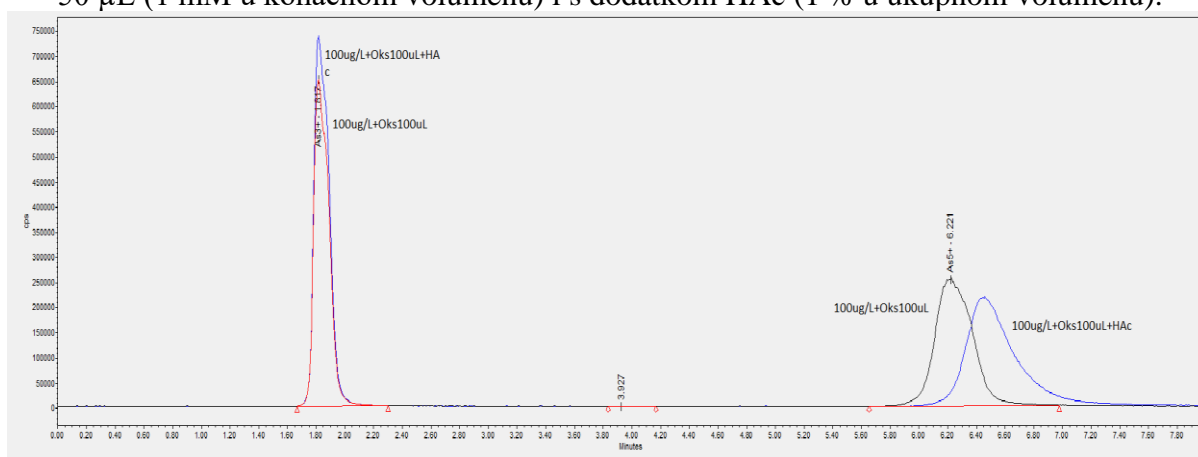
Dodatak 36. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom TAR $100 \mu\text{L}$ (2 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu) nakon 5 dana.



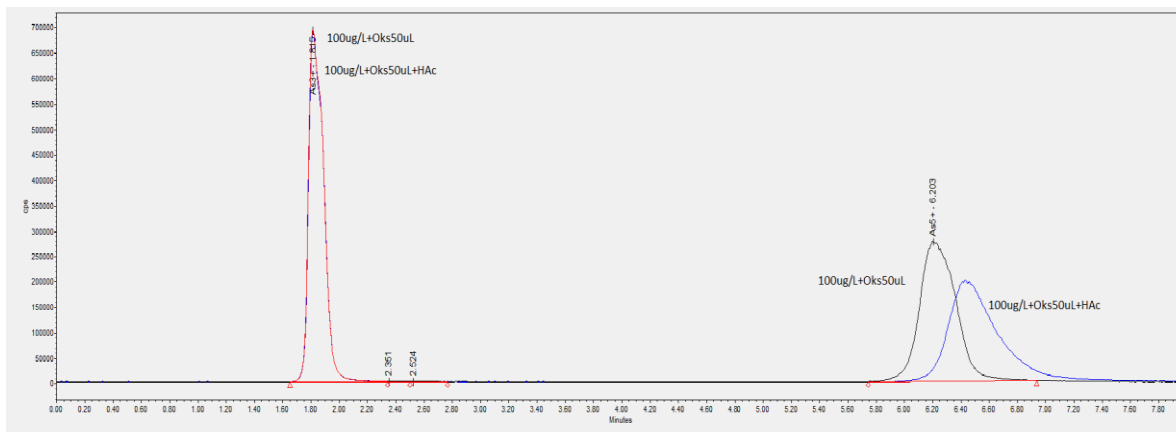
Dodatak 37. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom OKS $100 \mu\text{L}$ (2 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAC (1% u ukupnom volumenu).



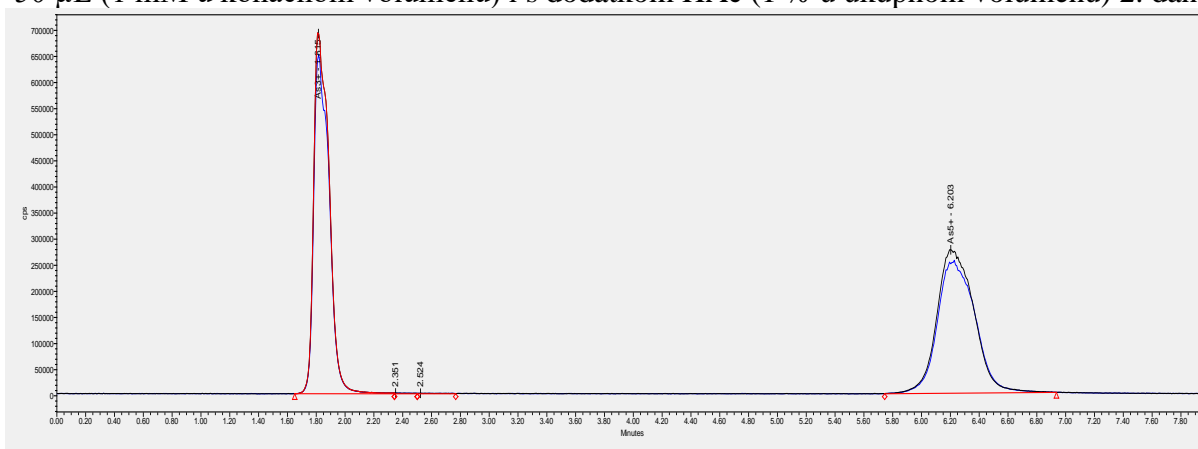
Dodatak 38. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom OKS $50 \mu\text{L}$ (1 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAC (1% u ukupnom volumenu).



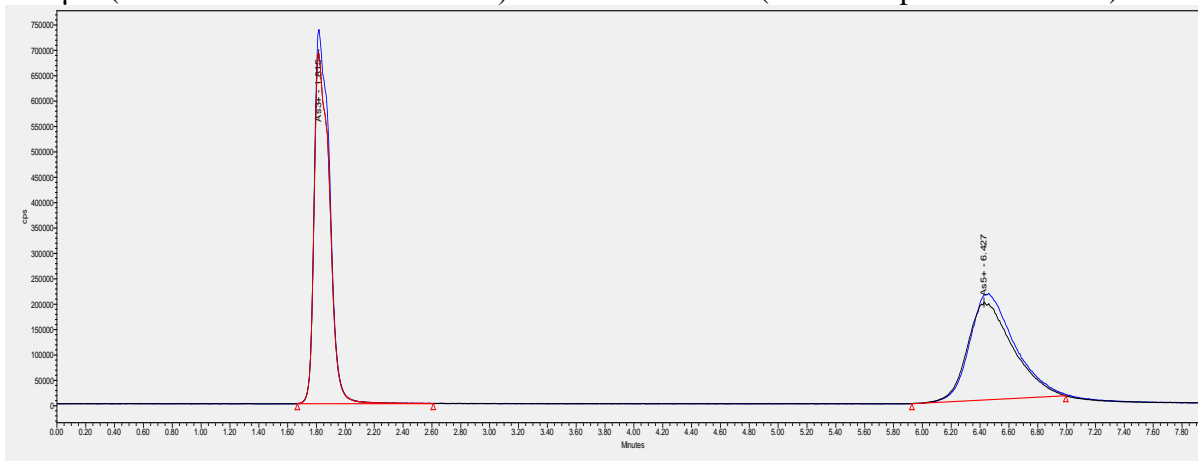
Dodatak 39. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom OKS $100 \mu\text{L}$ (2 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAC (1% u ukupnom volumenu) 2. dan.



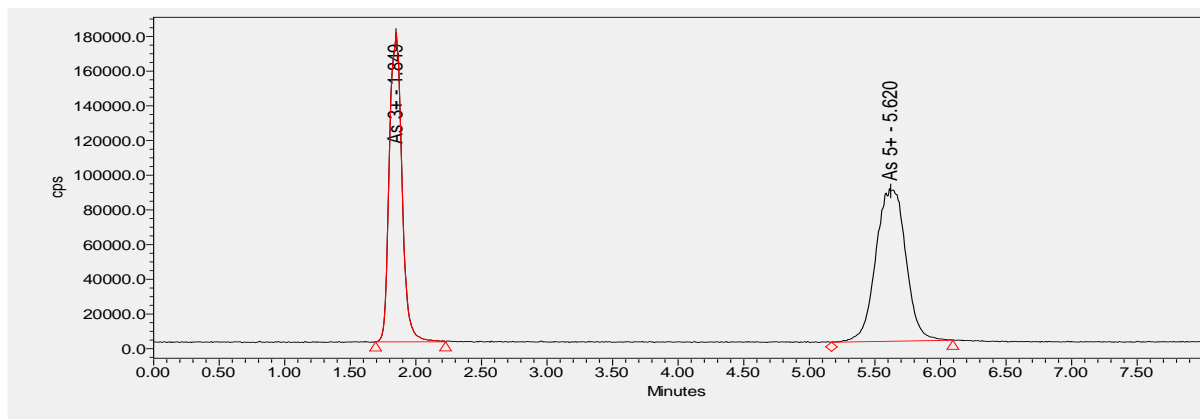
Dodatak 40. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom OKS $50 \mu\text{L}$ (1 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu) 2. dan.



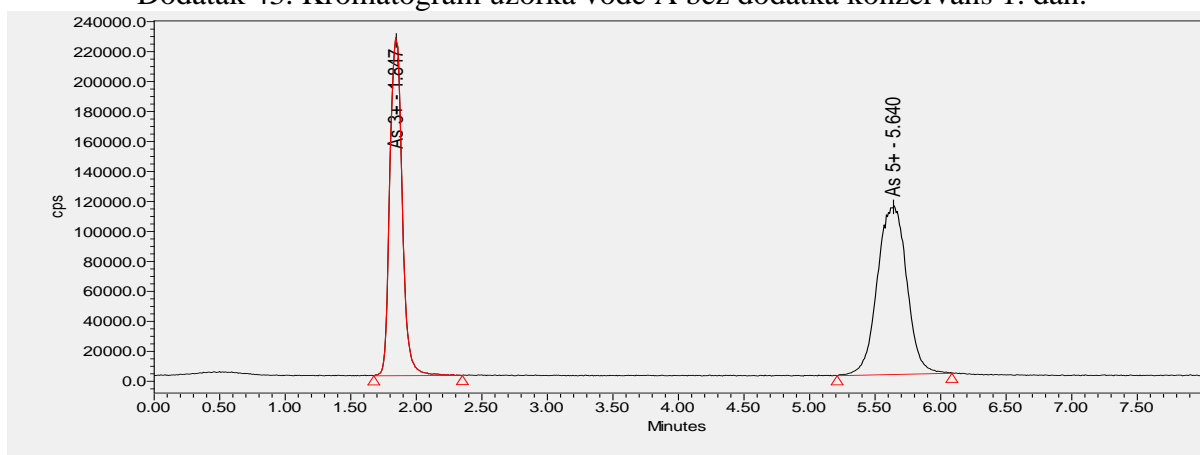
Dodatak 41. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom OKS $100 \mu\text{L}$ (2 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu) 6. dan.



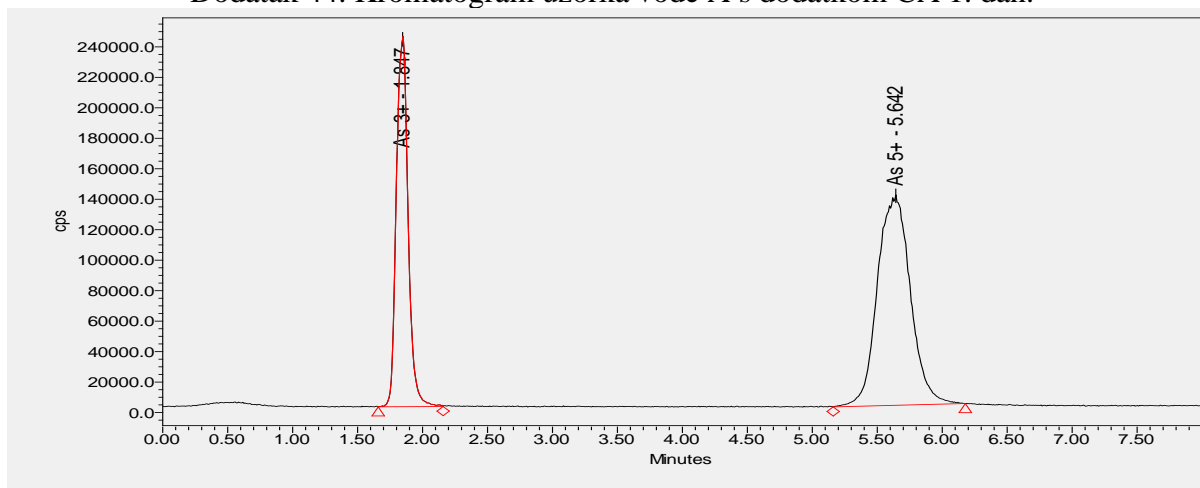
Dodatak 42. Kromatogram otopine As(III)/As(V) koncentracija $100 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom OKS $50 \mu\text{L}$ (1 mM u konačnom volumenu) i s dodatkom HAc (1 % u ukupnom volumenu) 6. dan.



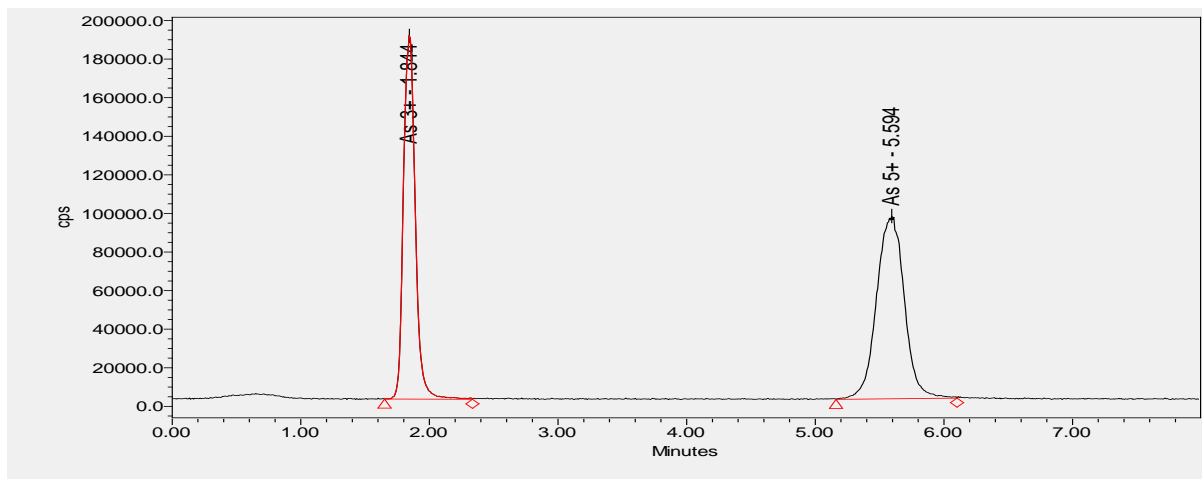
Dodatak 43. Kromatogram uzorka vode A bez dodatka konzervansa 1. dan.



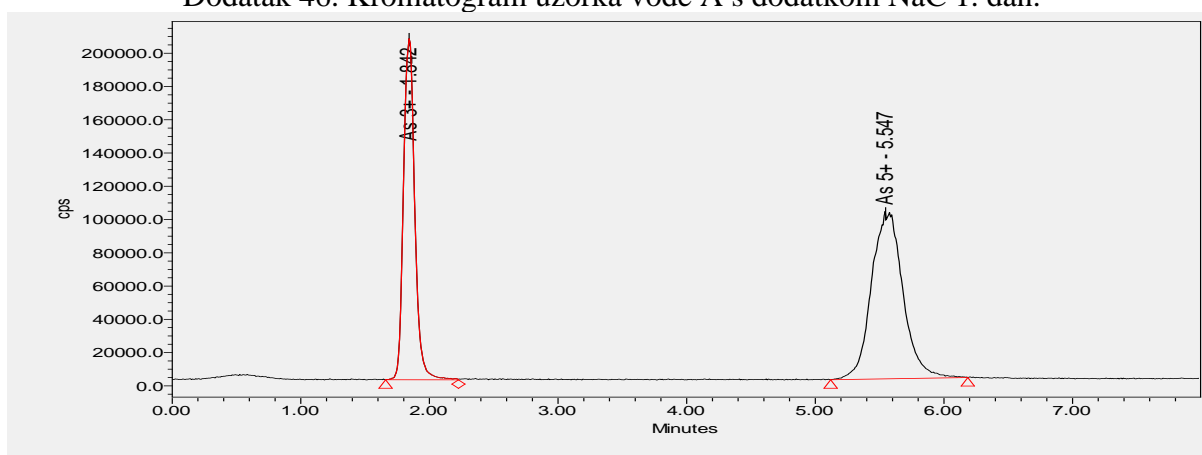
Dodatak 44. Kromatogram uzorka vode A s dodatkom CA 1. dan.



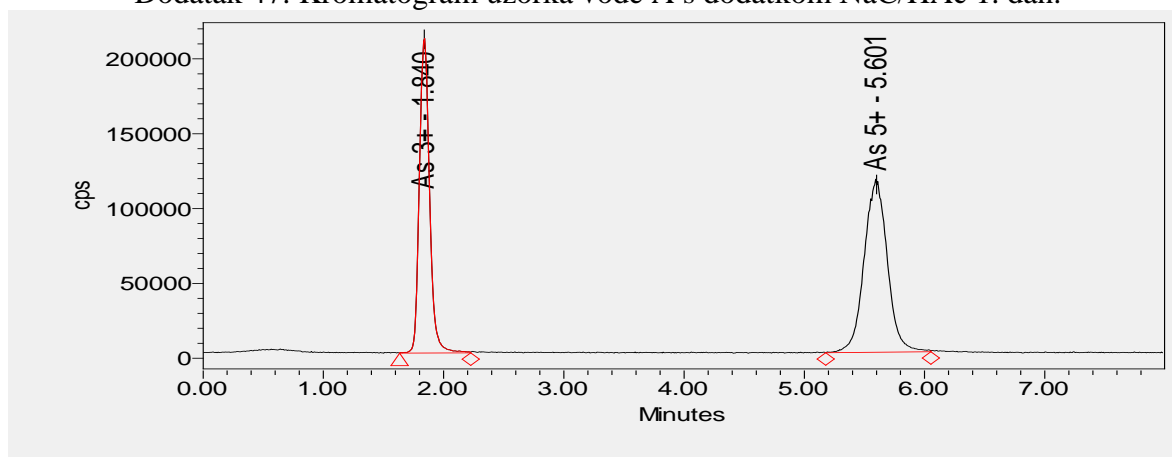
Dodatak 45. Kromatogram uzorka vode A s dodatkom CA/HAc 1. dan.



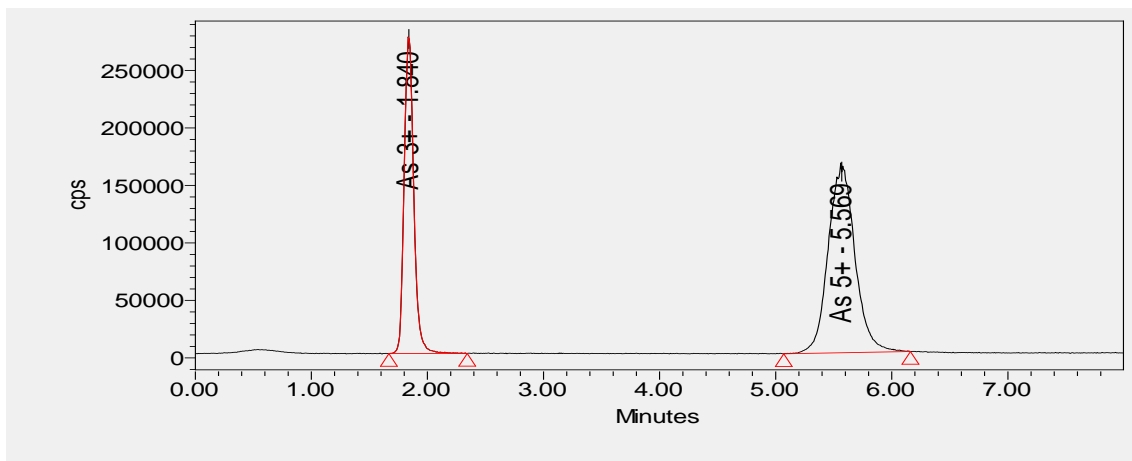
Dodatak 46. Kromatogram uzorka vode A s dodatkom NaCl 1. dan.



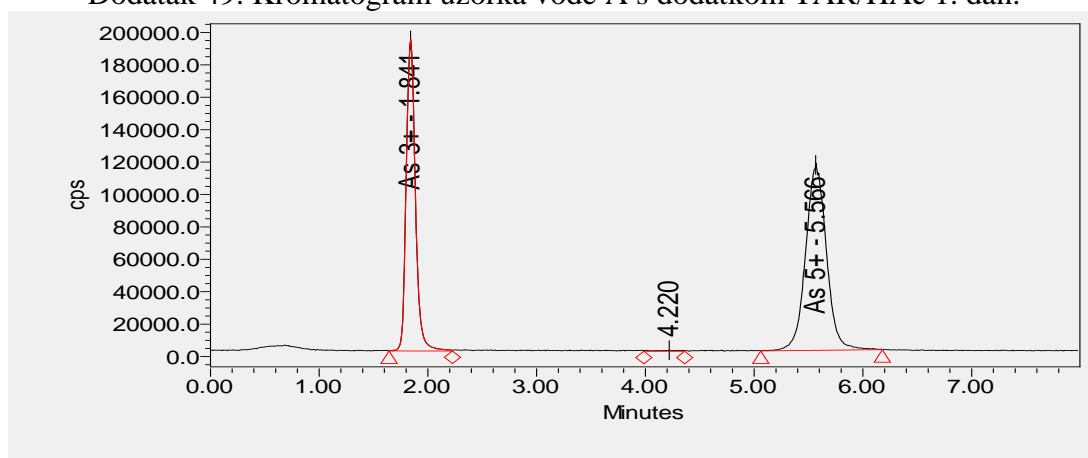
Dodatak 47. Kromatogram uzorka vode A s dodatkom NaCl/HAc 1. dan.



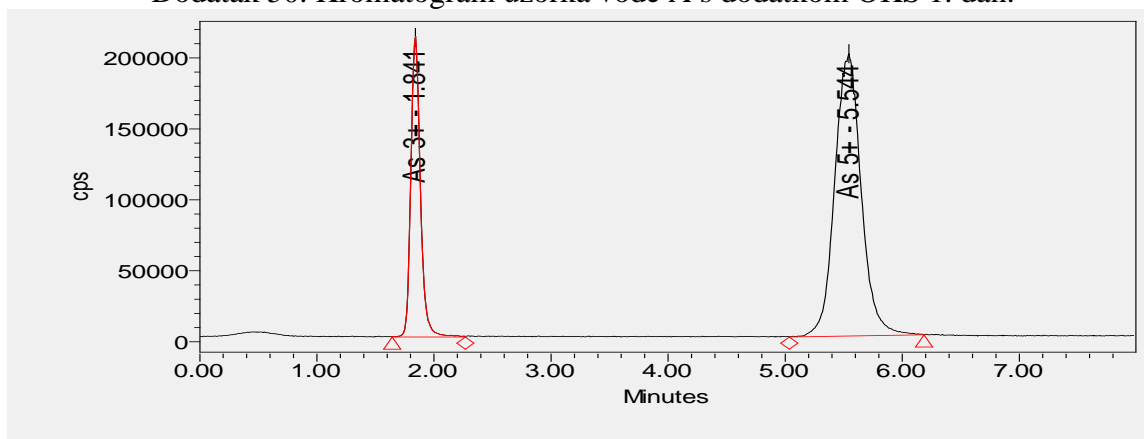
Dodatak 48. Kromatogram uzorka vode A s dodatkom TAR 1. dan.



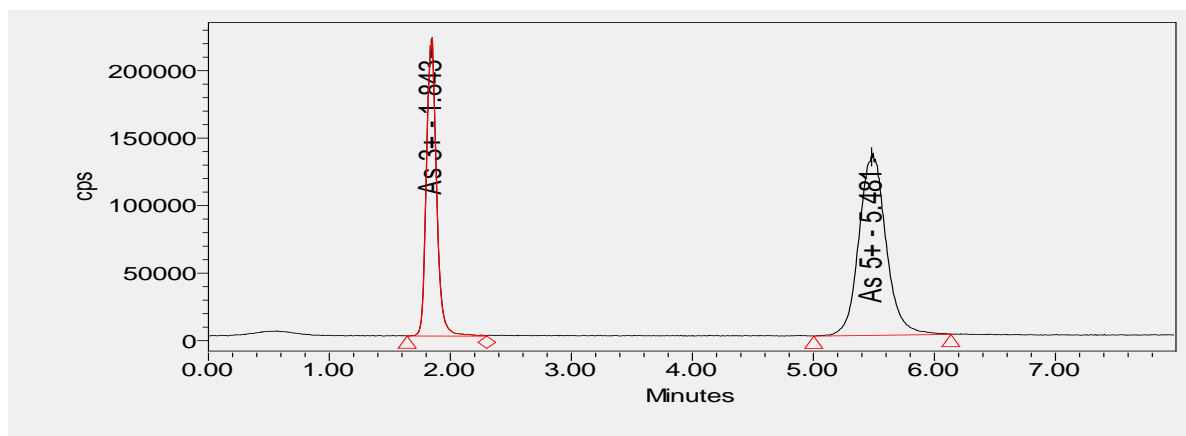
Dodatak 49. Kromatogram uzorka vode A s dodatkom TAR/HAc 1. dan.



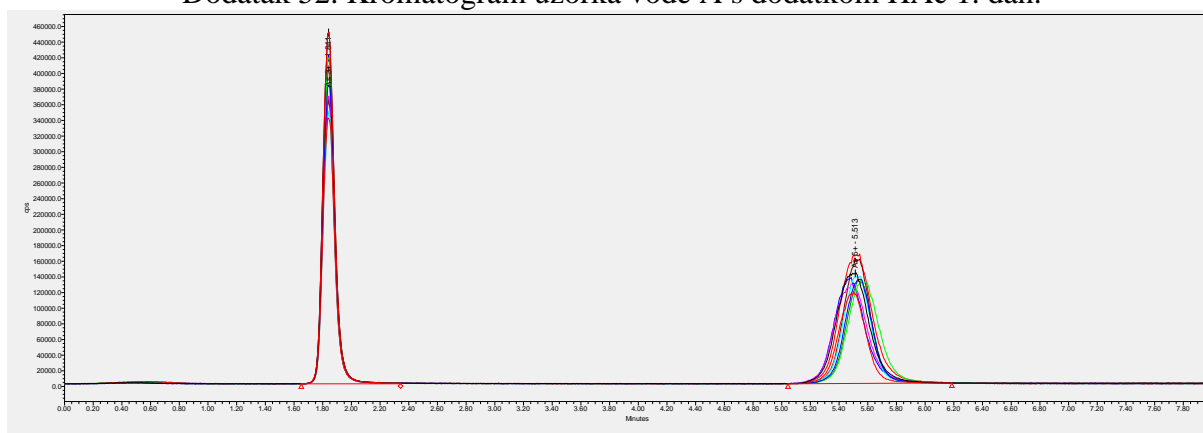
Dodatak 50. Kromatogram uzorka vode A s dodatkom OKS 1. dan.



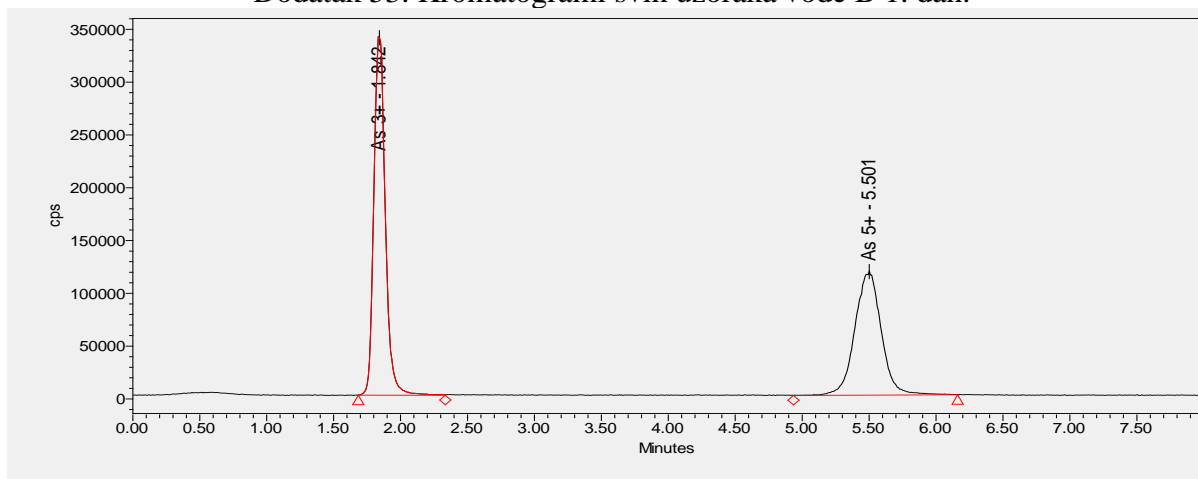
Dodatak 51. Kromatogram uzorka vode A s dodatkom OKS/HAc 1. dan.



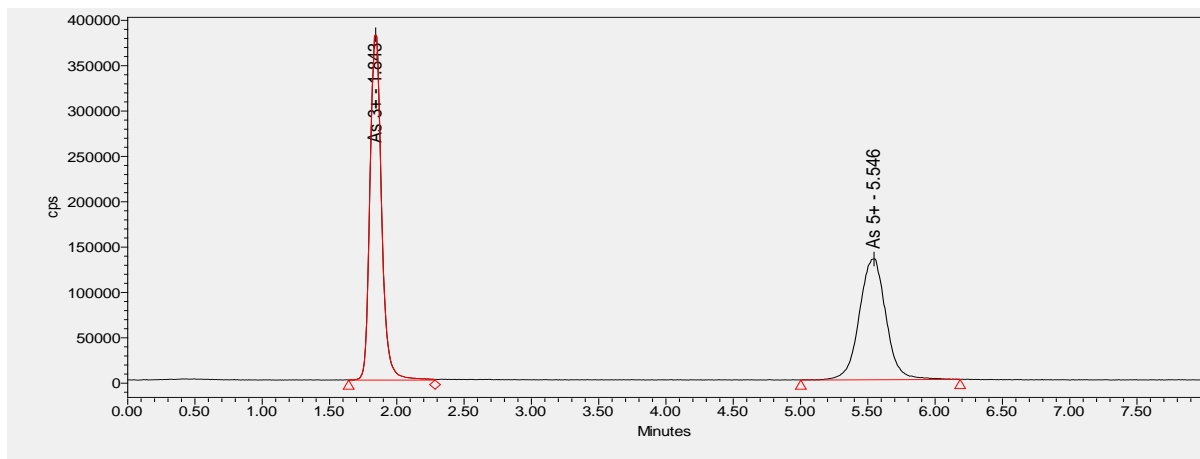
Dodatak 52. Kromatogram uzorka vode A s dodatkom HAc 1. dan.



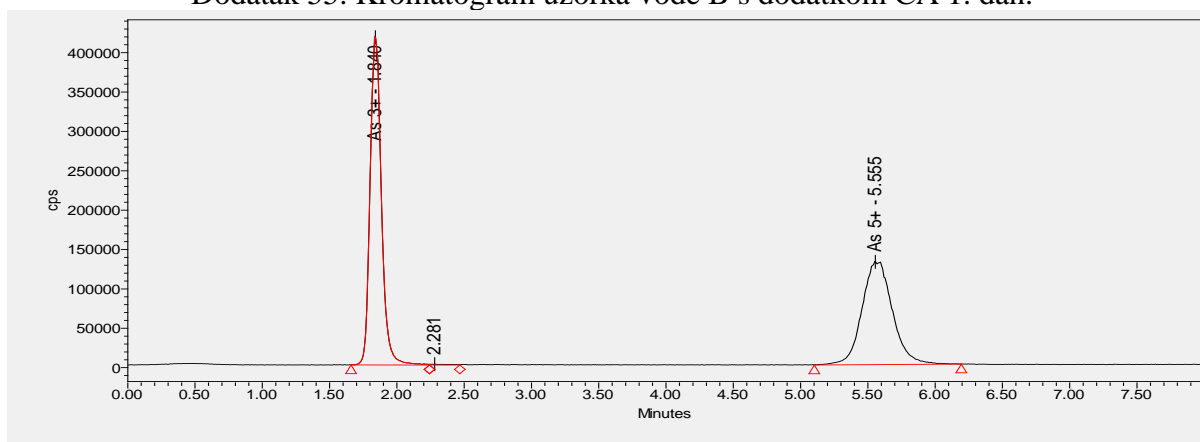
Dodatak 53. Kromatogrami svih uzoraka vode B 1. dan.



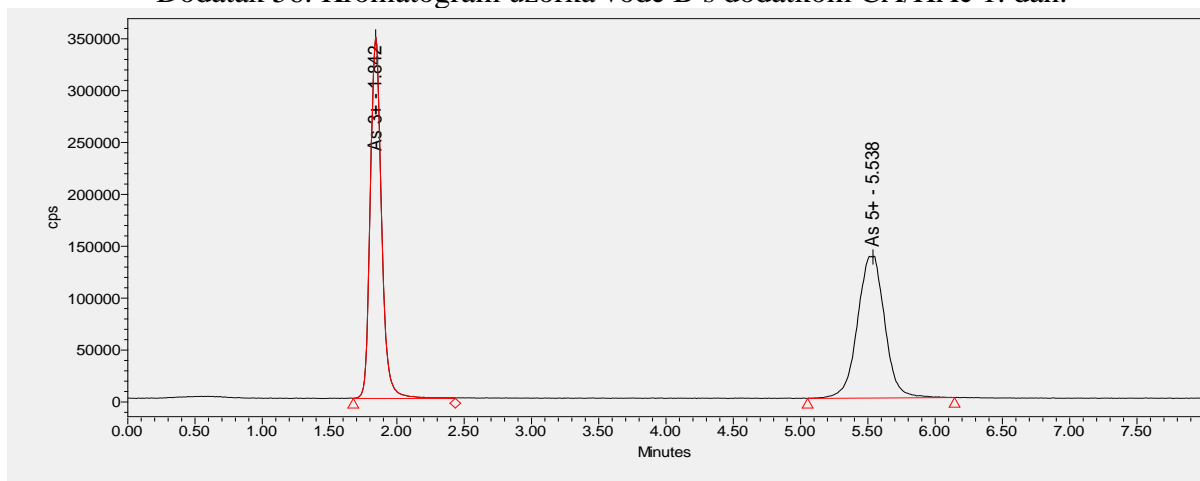
Dodatak 54. Kromatogram uzorka vode B bez dodatka konzervansa 1. dan.



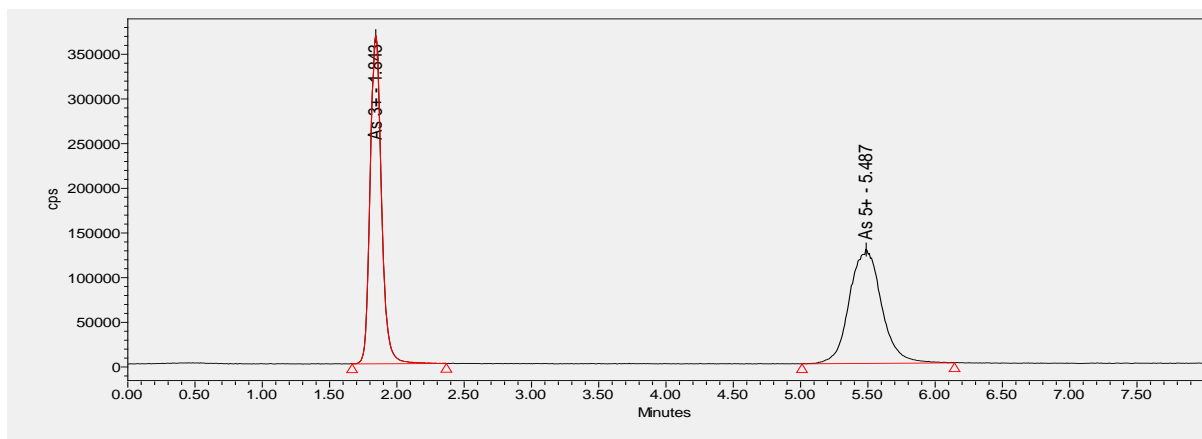
Dodatak 55. Kromatogram uzorka vode B s dodatkom CA 1. dan.



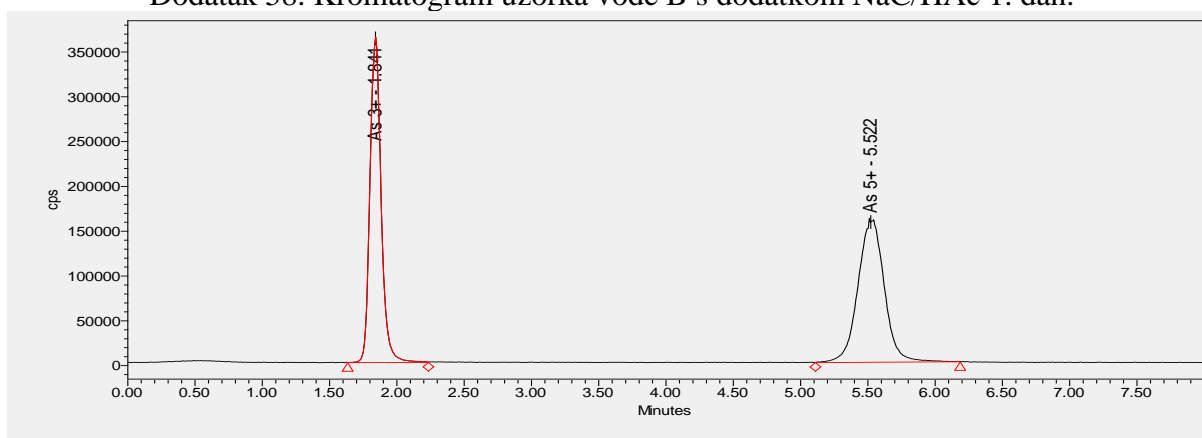
Dodatak 56. Kromatogram uzorka vode B s dodatkom CA/HAc 1. dan.



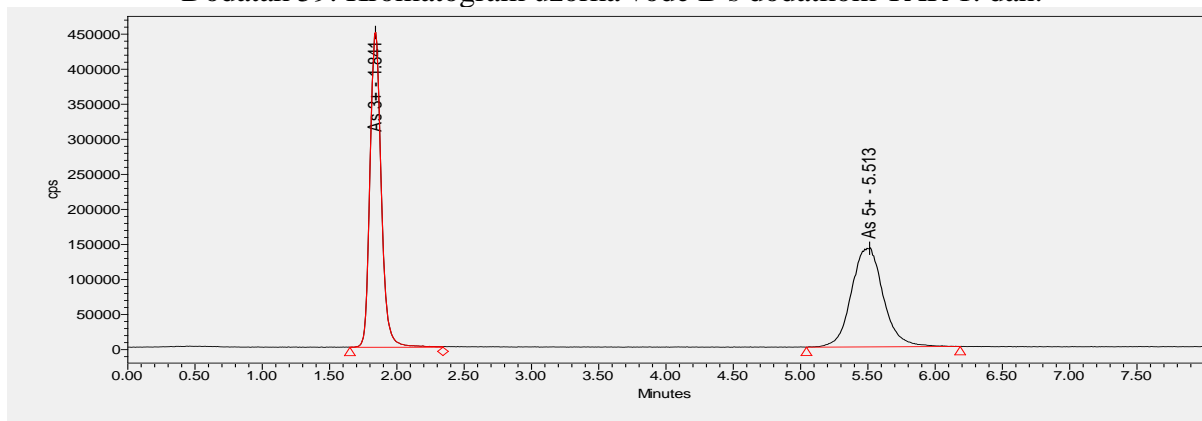
Dodatak 57. Kromatogram uzorka vode B s dodatkom NaC 1. dan.



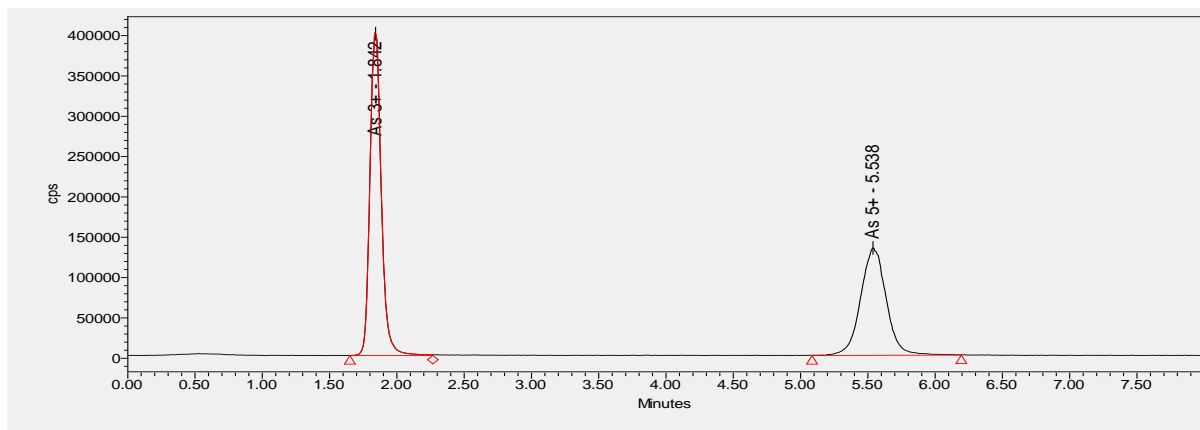
Dodatak 58. Kromatogram uzorka vode B s dodatkom NaC/HAc 1. dan.



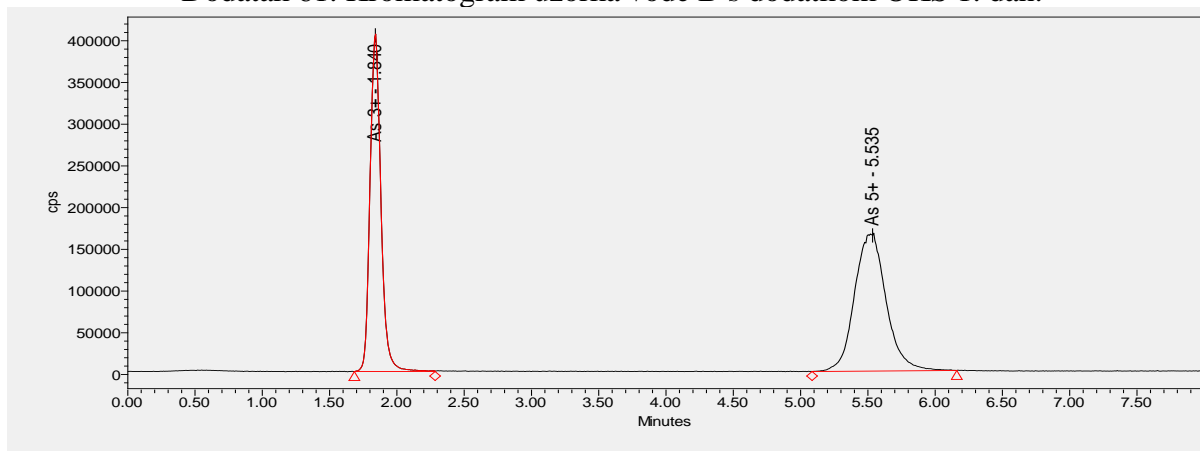
Dodatak 59. Kromatogram uzorka vode B s dodatkom TAR 1. dan.



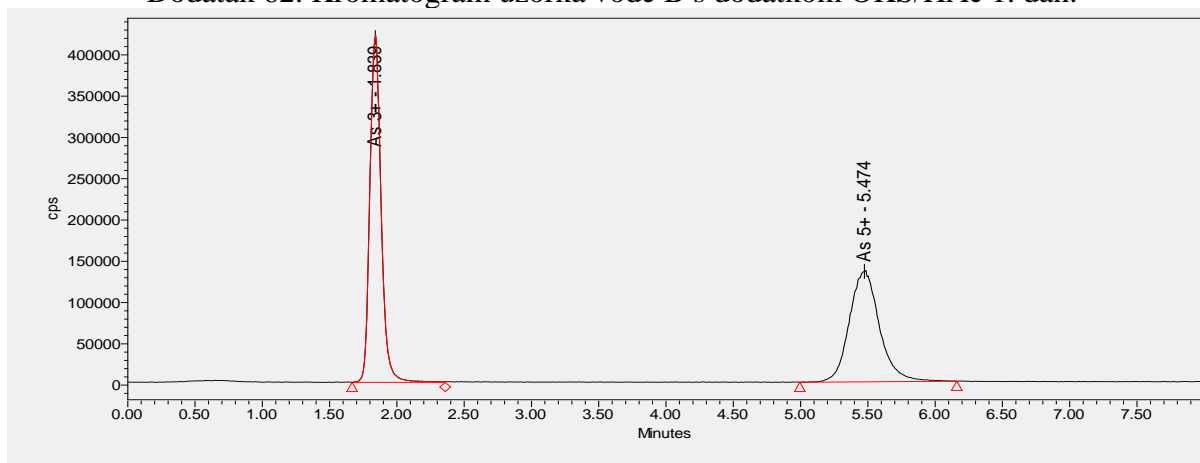
Dodatak 60. Kromatogram uzorka vode B s dodatkom TAR/HAc 1. dan.



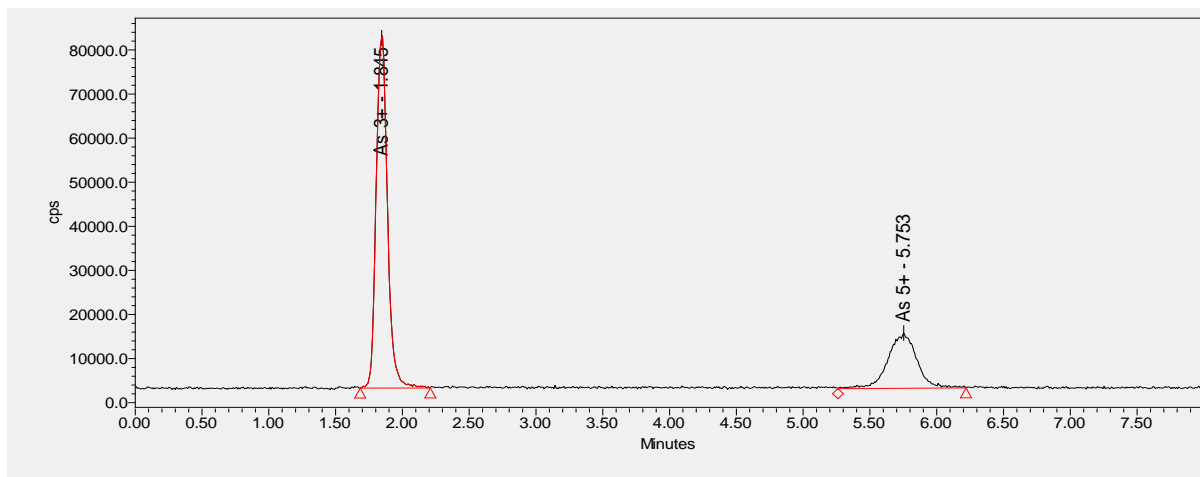
Dodatak 61. Kromatogram uzorka vode B s dodatkom OXS 1. dan.



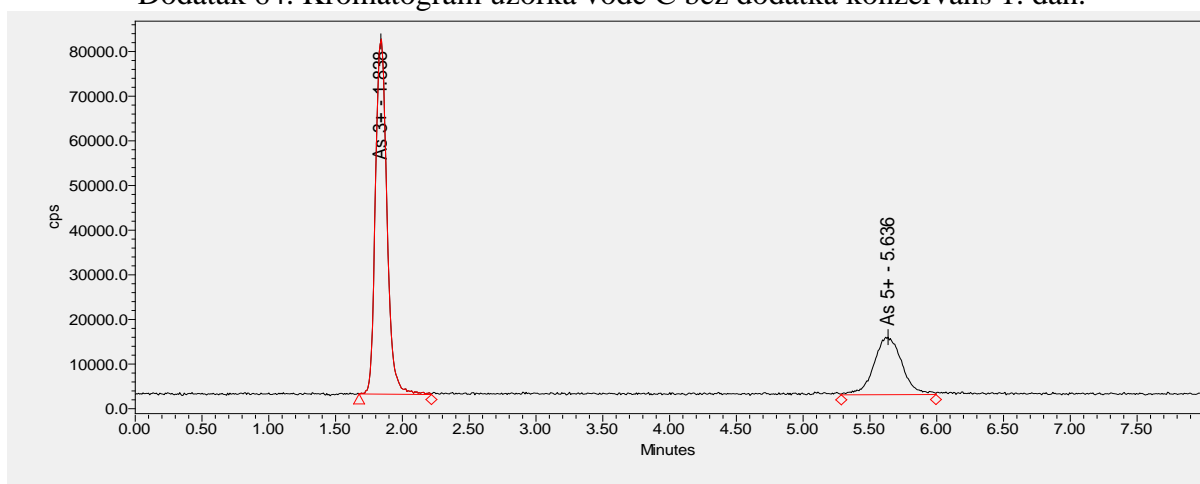
Dodatak 62. Kromatogram uzorka vode B s dodatkom OXS/HAc 1. dan.



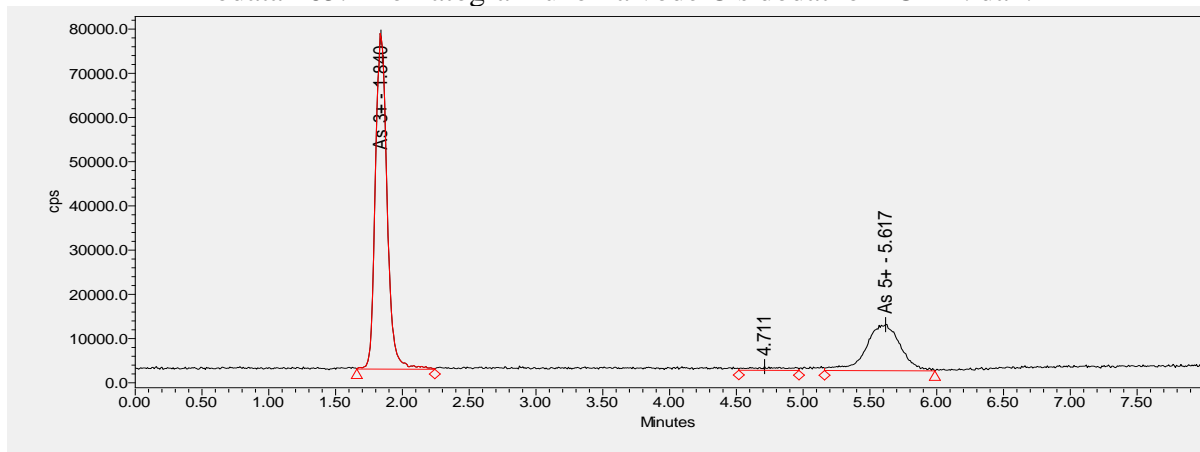
Dodatak 63. Kromatogram uzorka vode B s dodatkom HAc 1. dan.



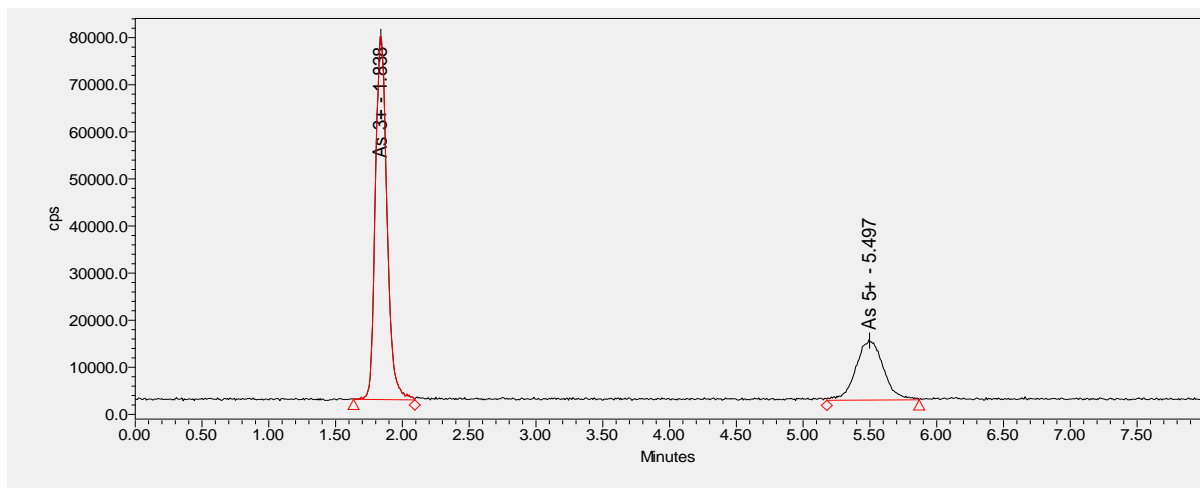
Dodatak 64. Kromatogram uzorka vode C bez dodatka konzervans 1. dan.



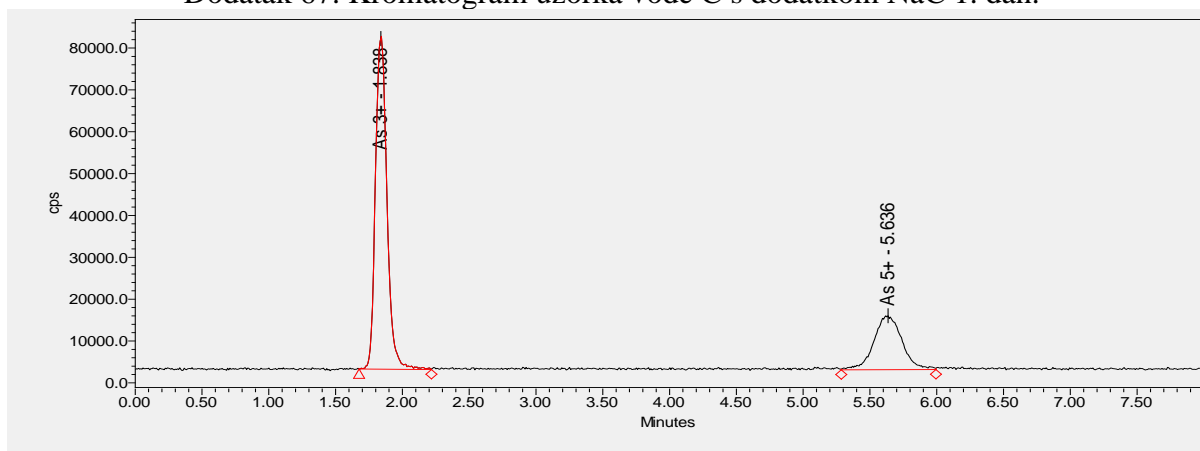
Dodatak 65. Kromatogram uzorka vode C s dodatkom CA 1. dan.



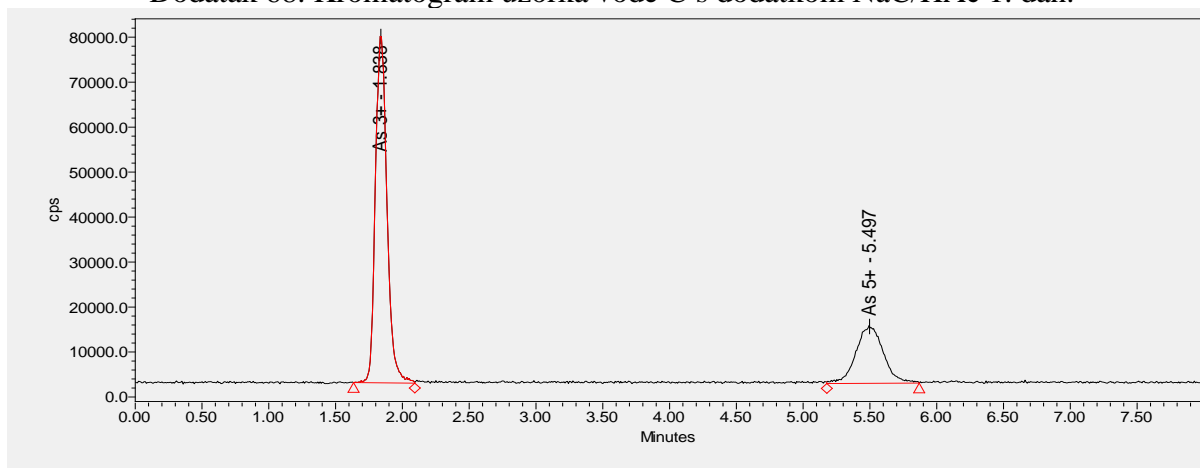
Dodatak 66. Kromatogram uzorka vode C s dodatkom CA/HAc 1. dan.



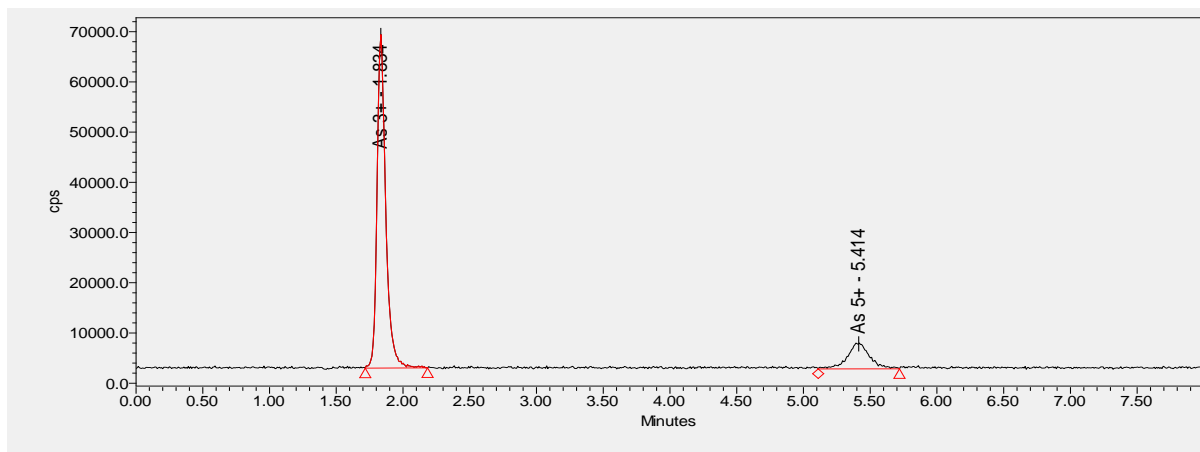
Dodatak 67. Kromatogram uzorka vode C s dodatkom NaCl 1. dan.



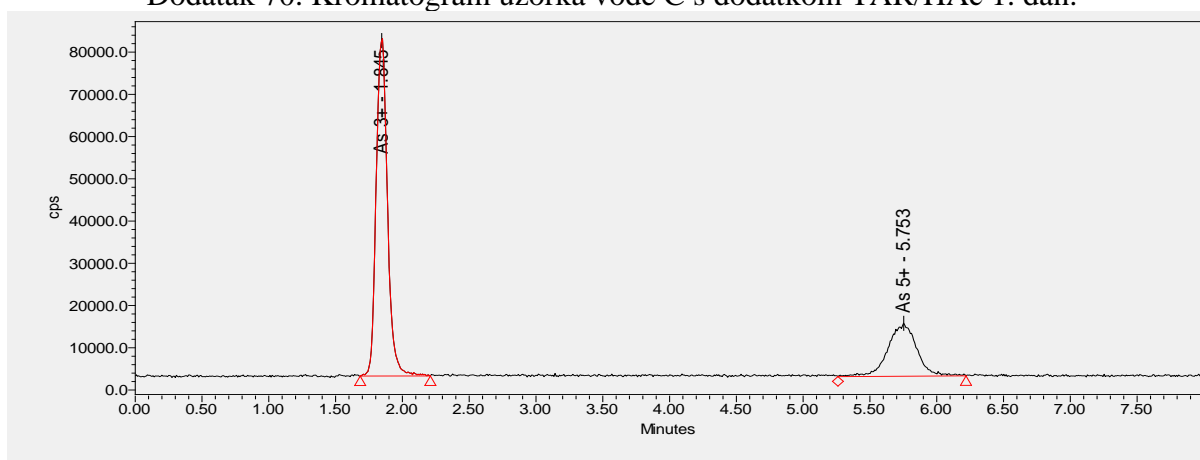
Dodatak 68. Kromatogram uzorka vode C s dodatkom NaCl/HAc 1. dan.



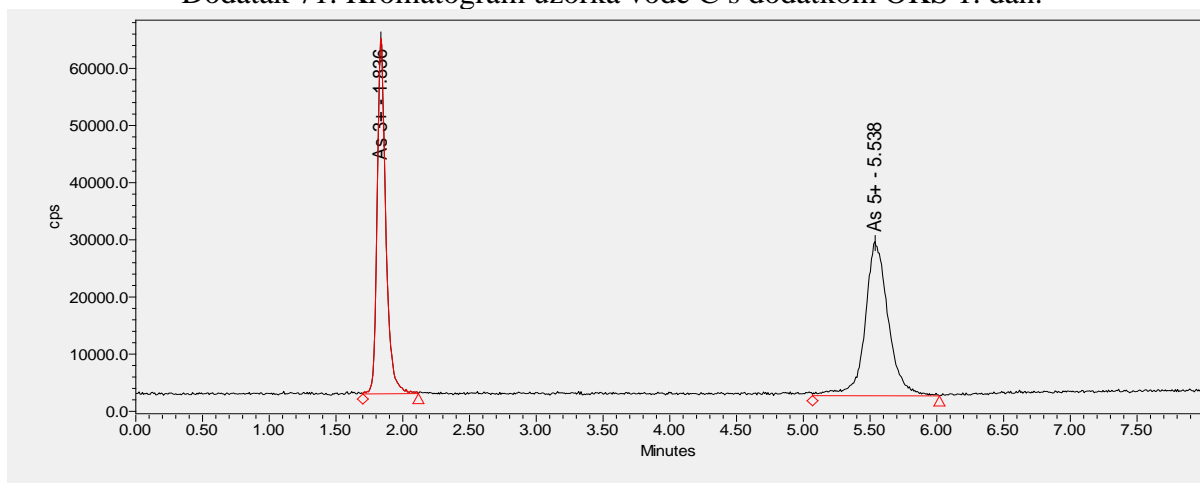
Dodatak 69. Kromatogram uzorka vode C s dodatkom TAR 1. dan.



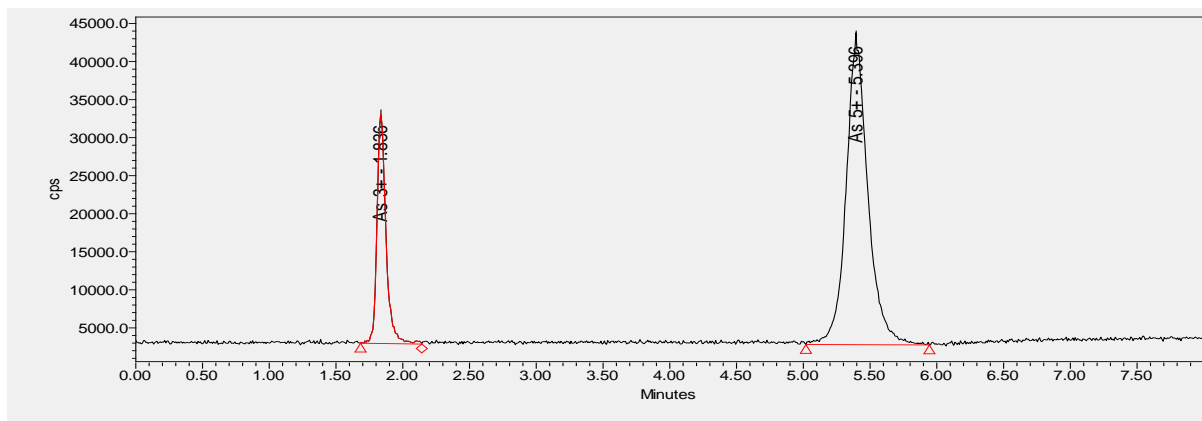
Dodatak 70. Kromatogram uzorka vode C s dodatkom TAR/HAc 1. dan.



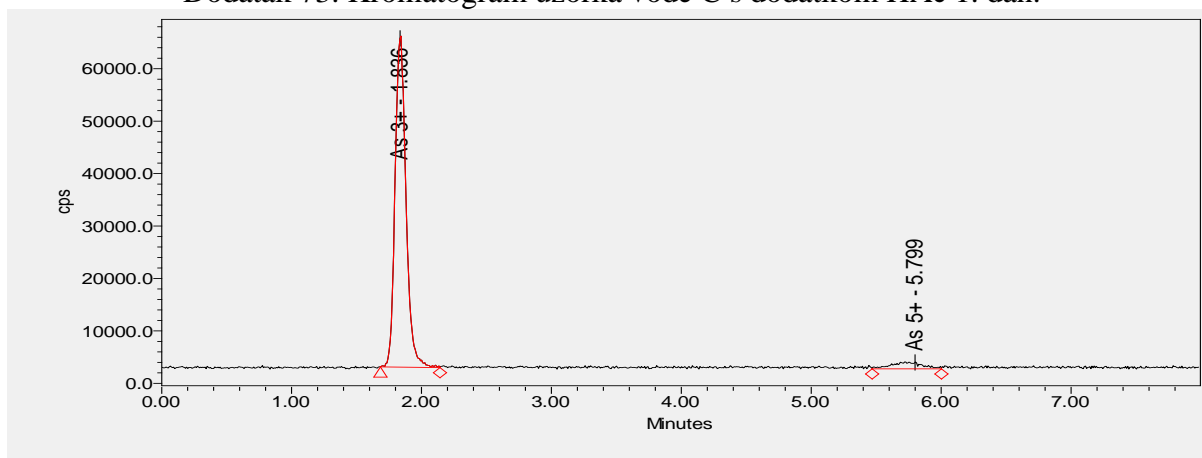
Dodatak 71. Kromatogram uzorka vode C s dodatkom OKS 1. dan.



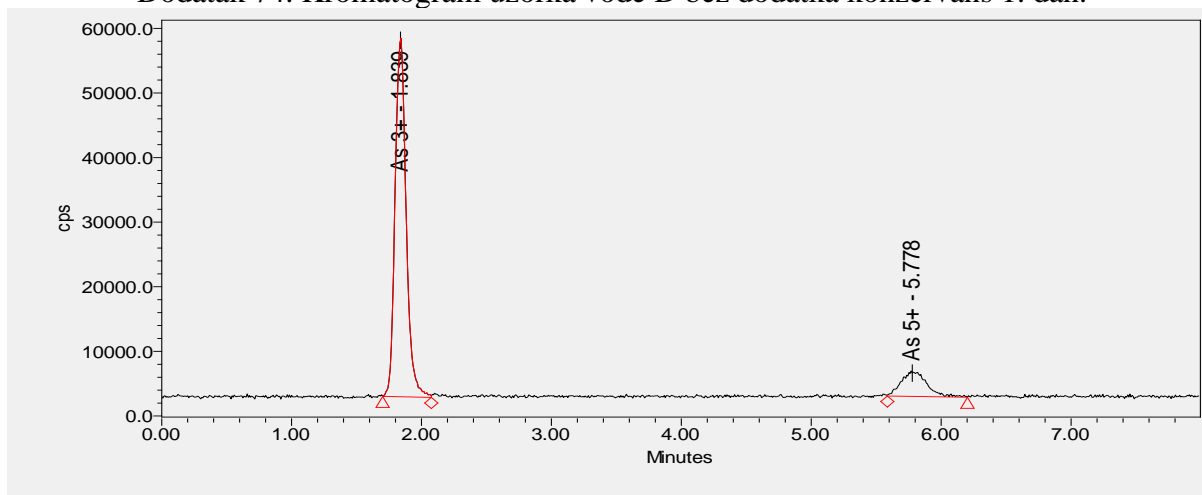
Dodatak 72. Kromatogram uzorka vode C s dodatkom OKS/HAc 1. dan.



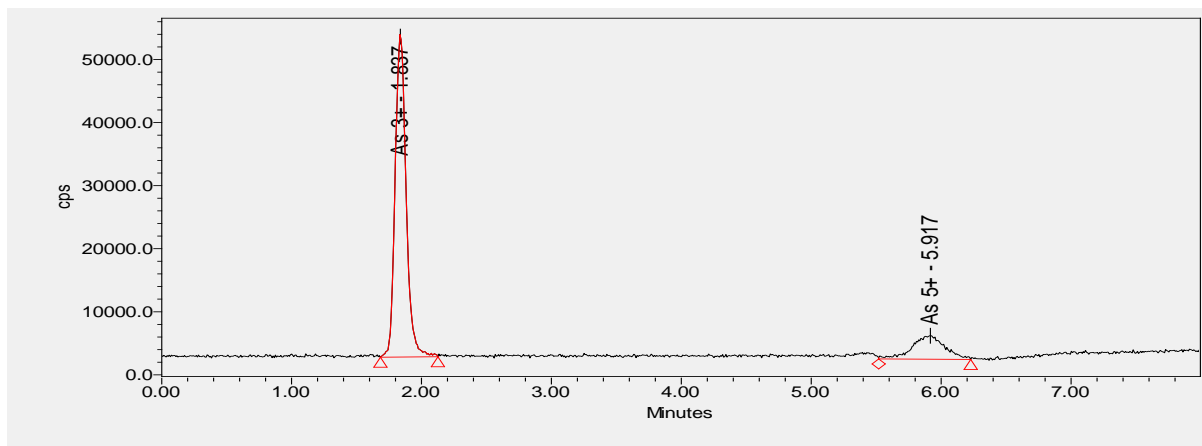
Dodatak 73. Kromatogram uzorka vode C s dodatkom HAc 1. dan.



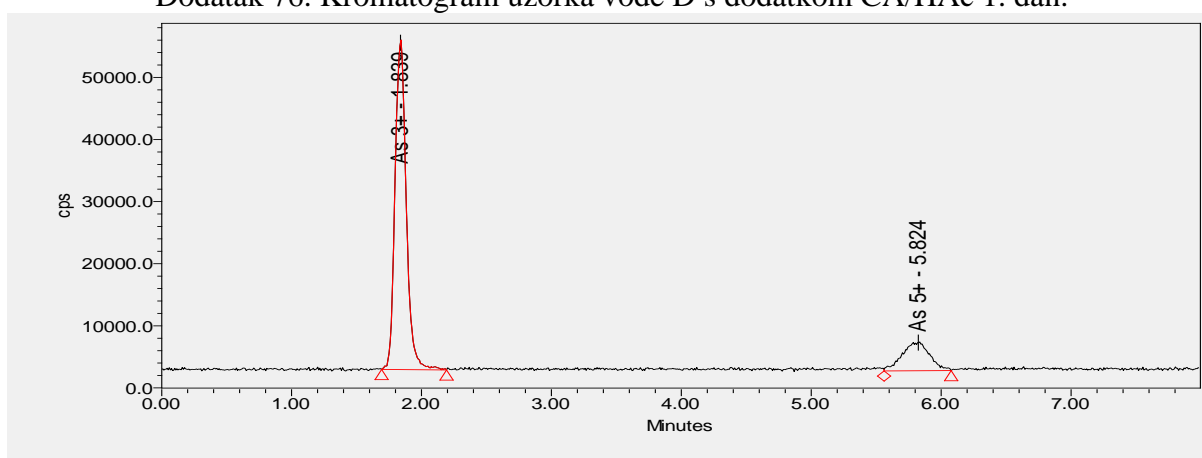
Dodatak 74. Kromatogram uzorka vode D bez dodatka konzervansa 1. dan.



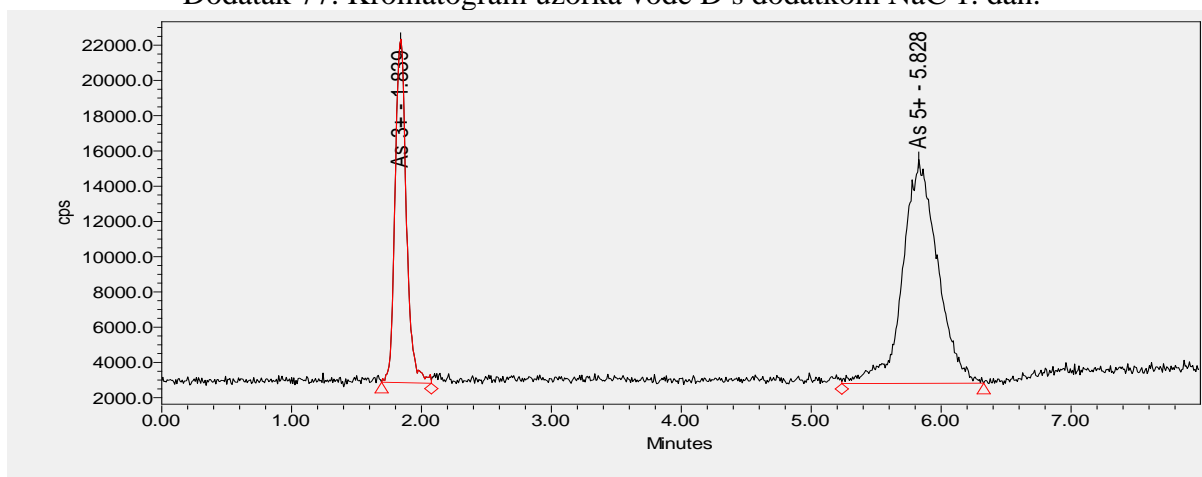
Dodatak 75. Kromatogram uzorka vode D s dodatkom CA 1. dan.



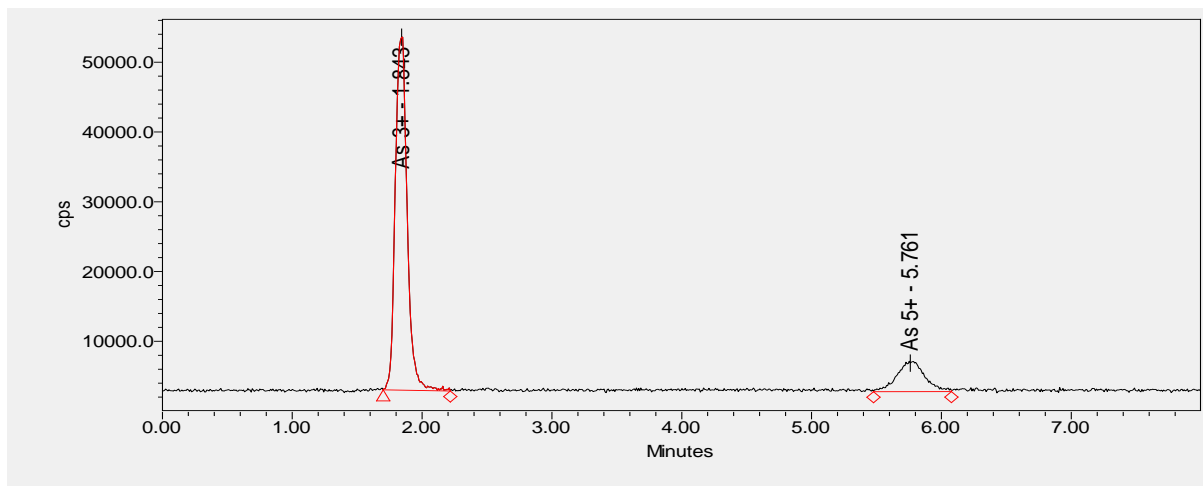
Dodatak 76. Kromatogram uzorka vode D s dodatkom CA/HAc 1. dan.



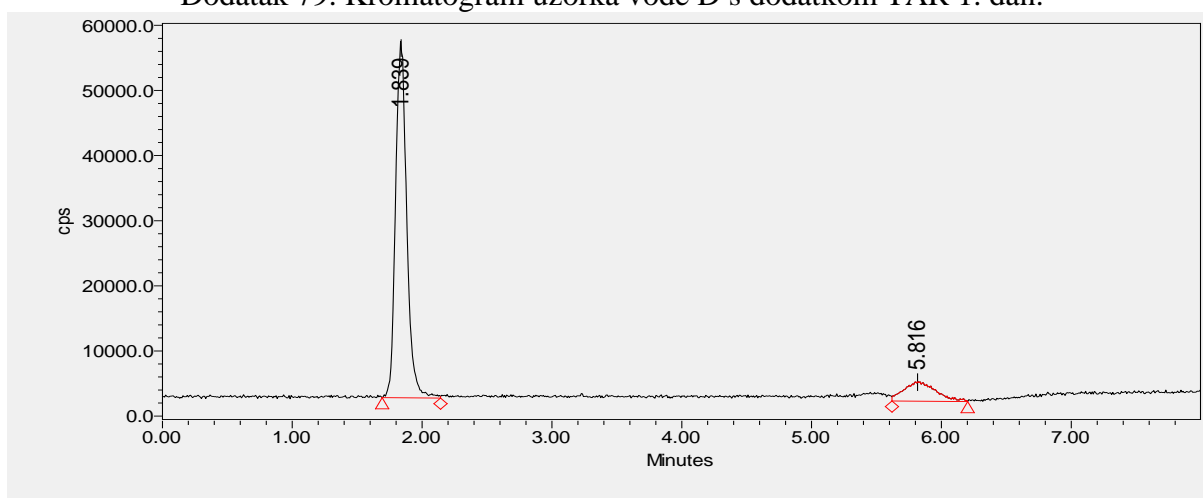
Dodatak 77. Kromatogram uzorka vode D s dodatkom NaC 1. dan.



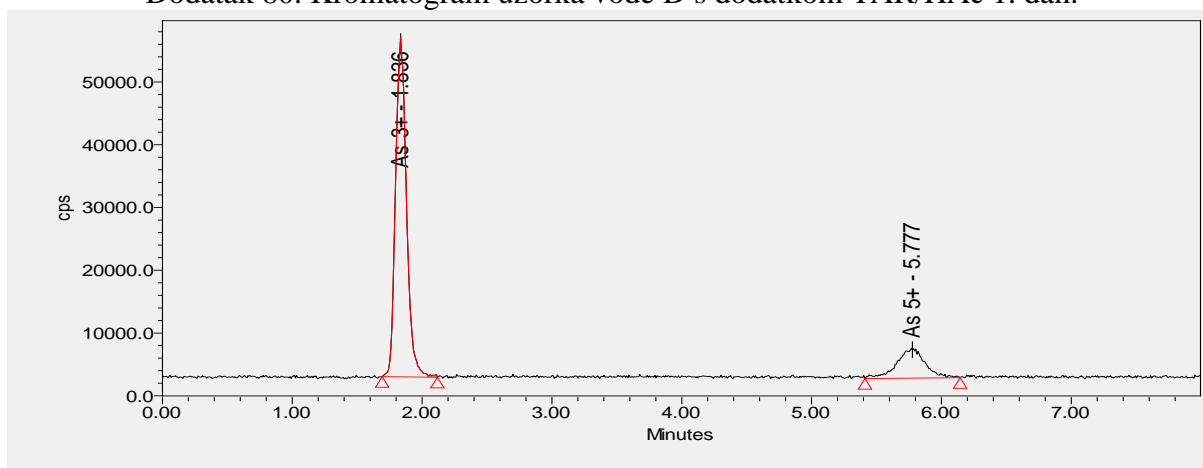
Dodatak 78. Kromatogram uzorka vode D s dodatkom NaC/HAc 1. dan.



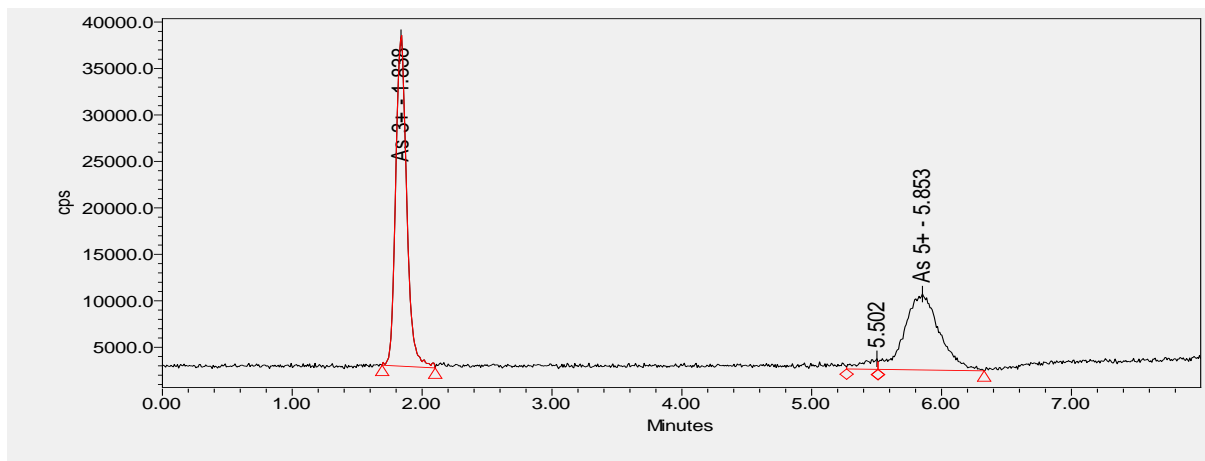
Dodatak 79. Kromatogram uzorka vode D s dodatkom TAR 1. dan.



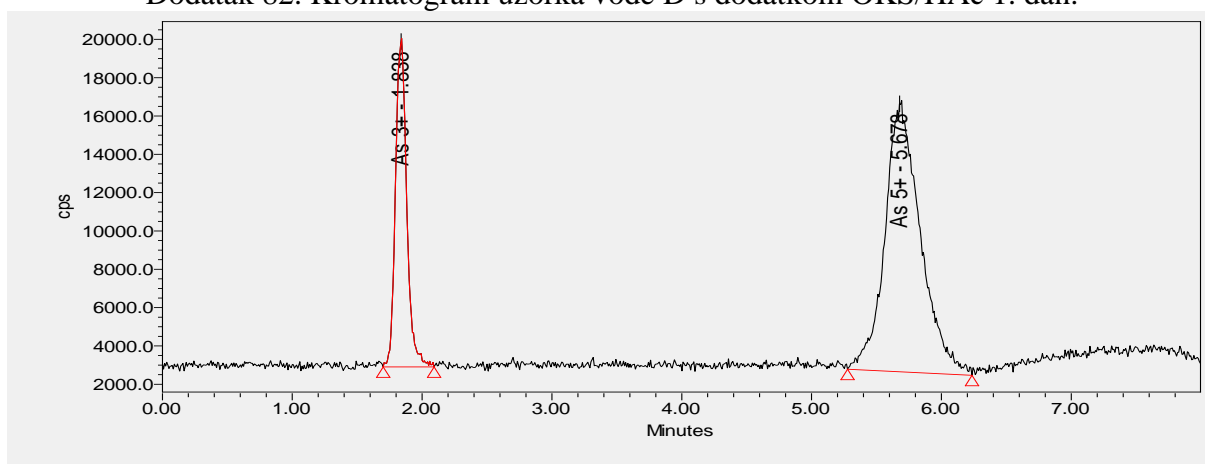
Dodatak 80. Kromatogram uzorka vode D s dodatkom TAR/HAC 1. dan.



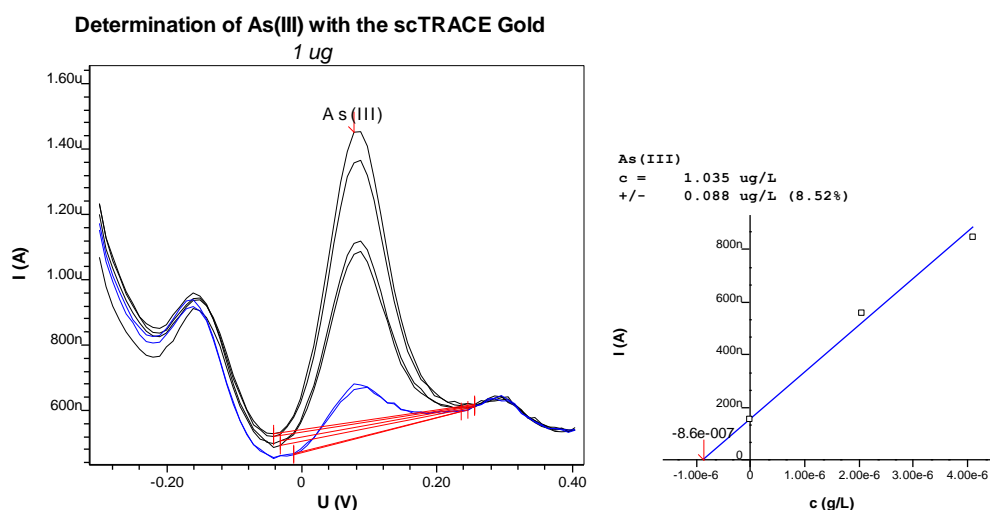
Dodatak 81. Kromatogram uzorka vode D s dodatkom OXS 1. dan.



Dodatak 82. Kromatogram uzorka vode D s dodatkom OKS/HAc 1. dan.

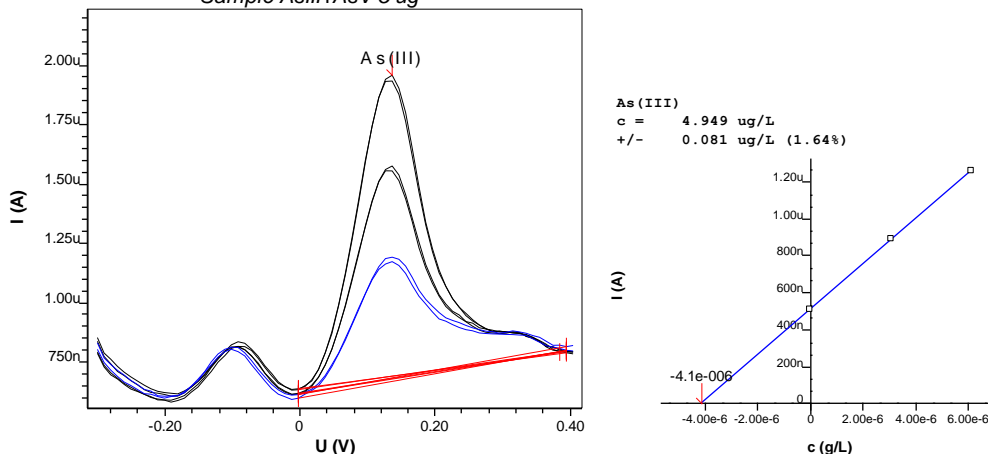


Dodatak 83. Kromatogram uzorka vode D s dodatkom HAc 1. dan.



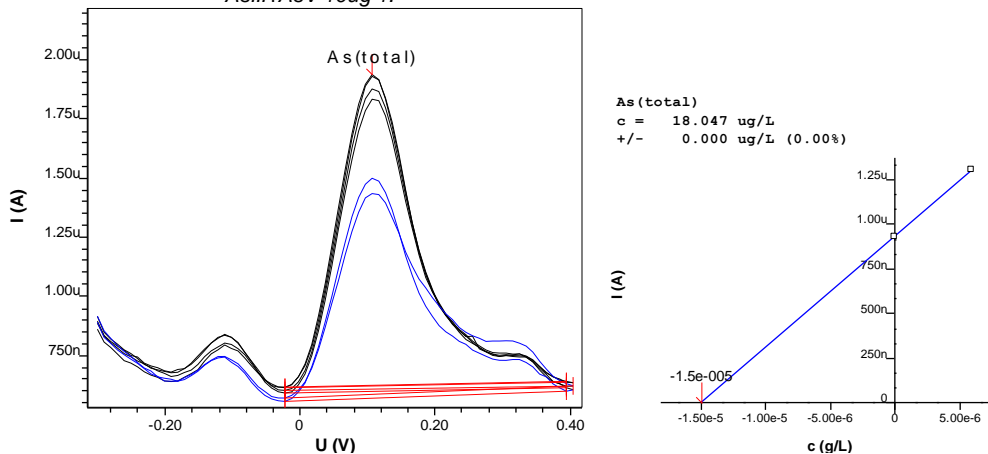
Dodatak 84. Voltamogrami određivanja As(III) u modelnoj otopini As(III)/As(V) koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 1 \mu\text{g L}^{-1}$ i odgovarajući analitički pravac.

Determination of As(III) with the scTRACE Gold
Sample AsIII+AsV 5 ug



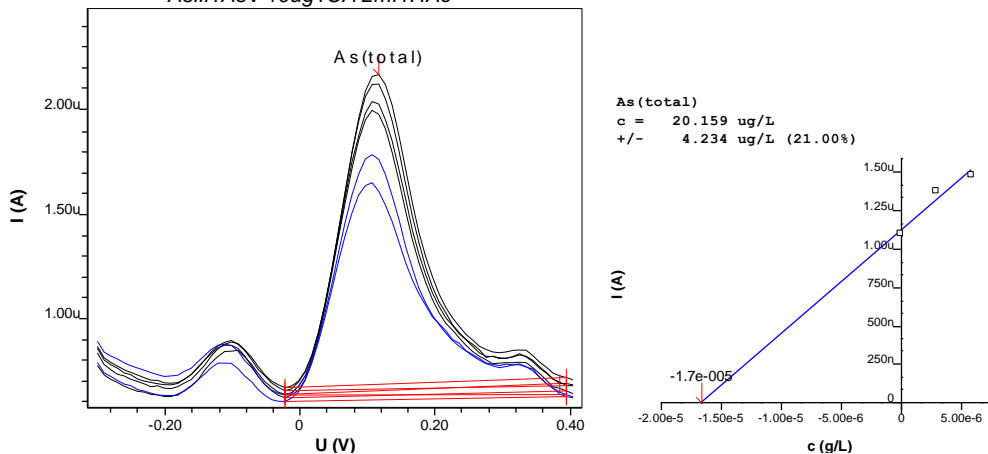
Dodatak 85. Voltamogrami određivanja As(III) u modelnoj otopini As(III)/As(V) koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 5 \mu\text{g L}^{-1}$ i odgovarajući analitički pravac.

Determination of As(total) with the scTRACE Gold
AsIII+AsV 10ug 1.

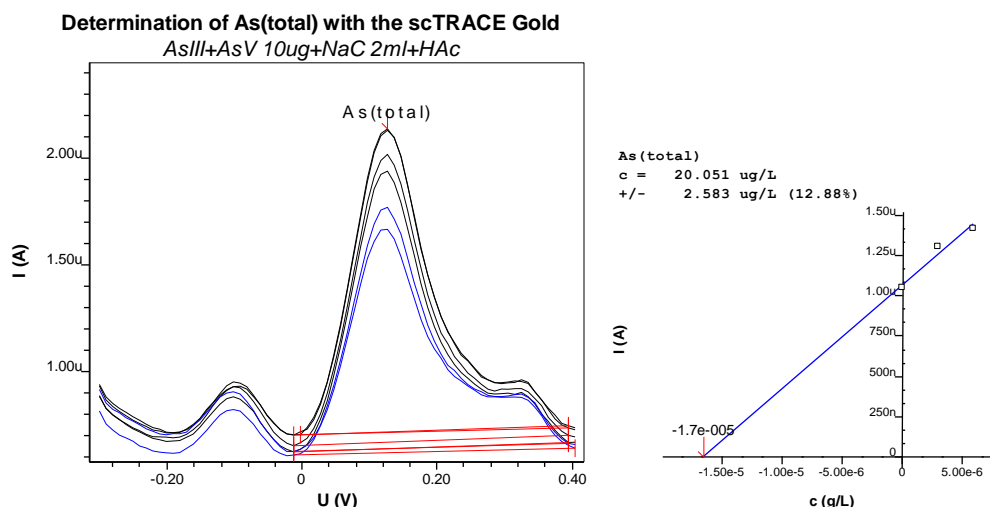


Dodatak 85. Voltamogrami određivanja As(tot) u modelnoj otopini As(III)/As(V) koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$ i odgovarajući analitički pravac.

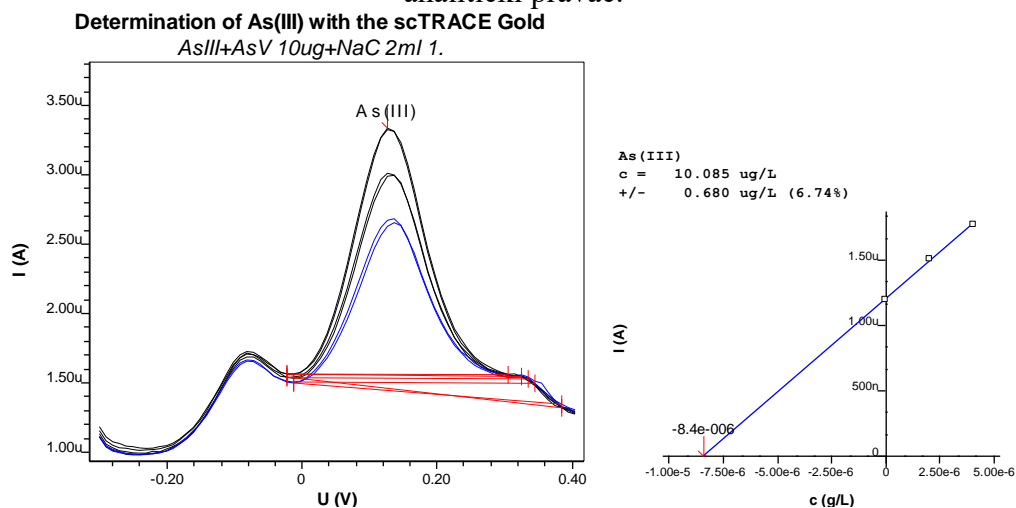
Determination of As(total) with the scTRACE Gold
AsIII+AsV 10ug+CA 2ml+HAc



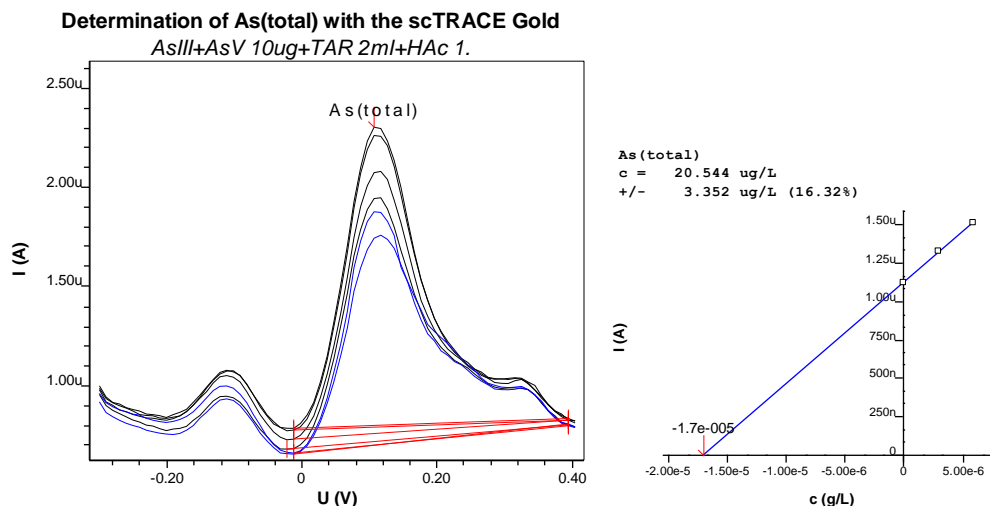
Dodatak 86. Voltamogrami određivanja As(tot) u modelnoj otopini As(III)/As(V) koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$ s dodatkom HAc i odgovarajući analitički pravac.



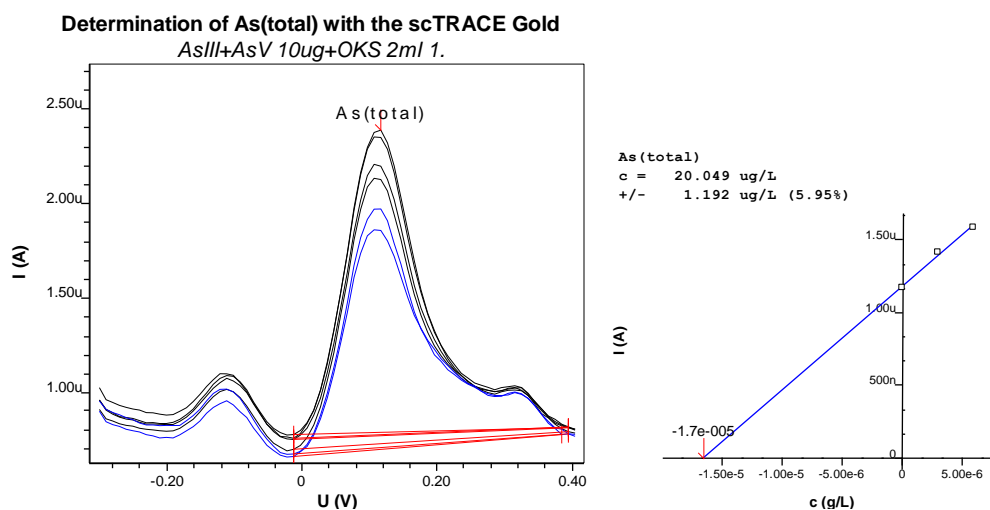
Dodatak 87. Voltamogrami određivanja As(tot) u modelnoj otopini As(III)/As(V) koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$ dodatkom NaC/HAc i odgovarajući analitički pravac.



Dodatak 88. Voltamogrami određivanja As(III) u modelnoj otopini As(III)/As(V) koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$ dodatkom NaC i odgovarajući analitički pravac.

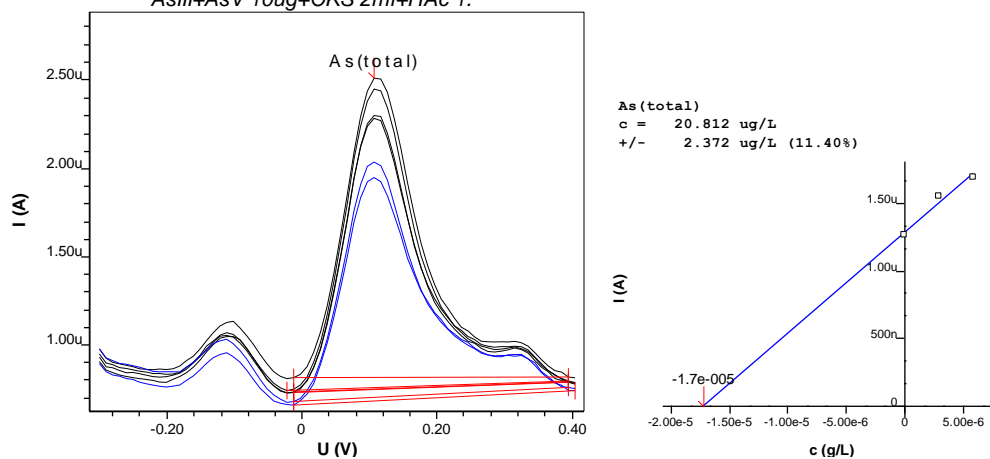


Dodatak 89. Voltamogrami određivanja As(III) u modelnoj otopini As(III)/As(V) koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$ dodatkom TAR/HAc i odgovarajući analitički pravac.



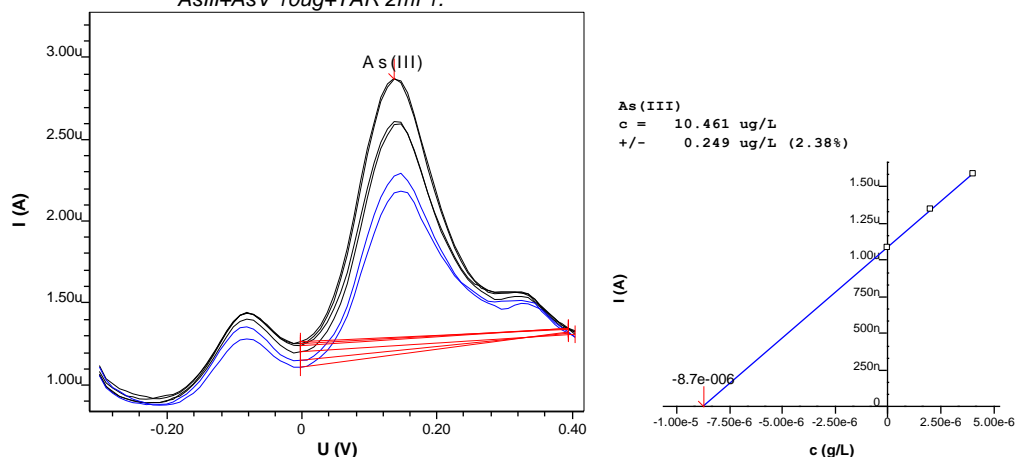
Dodatak 90. Voltamogrami određivanja As(tot) u modelnoj otopini As(III)/As(V) koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \mu\text{g L}^{-1}$ dodatkom OKS i odgovarajući analitički pravac.

Determination of As(total) with the scTRACE Gold
AsIII+AsV 10ug+OKS 2ml+HAc 1.



Dodatak 91. Voltamogrami određivanja As(tot) u modelnoj otopini As(III)/As(V) koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ dodatkom OKS/HAc i odgovarajući analitički pravac.

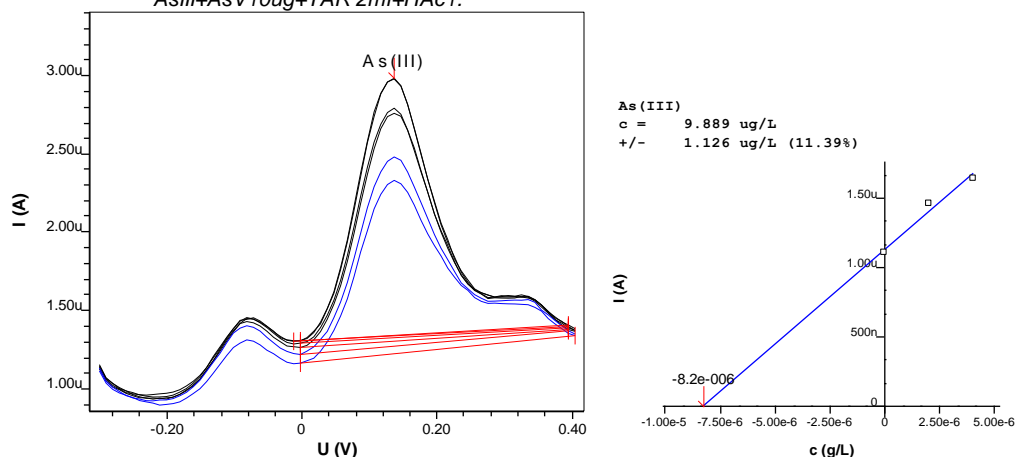
Determination of As(III) with the scTRACE Gold
AsIII+AsV 10ug+TAR 2ml 1.



Dodatak 92. Voltamogrami određivanja As(III) u modelnoj otopini As(III)/As(V) koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ dodatkom TAR i odgovarajući analitički pravac.

Determination of As(III) with the scTRACE Gold

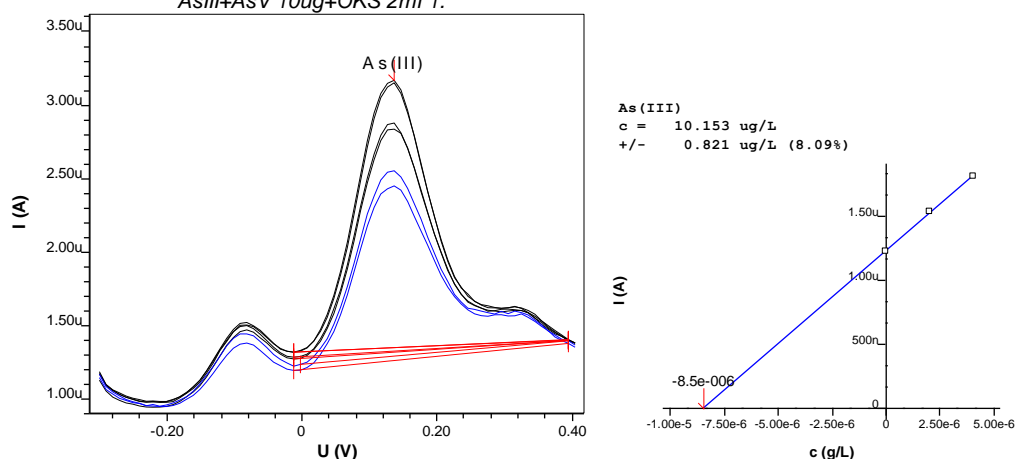
AsIII+AsV10ug+TAR 2ml+HAc1.



Dodatak 93. Voltamogrami određivanja As(III) u modelnoj otopini As(III)/As(V) koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ dodatkom TAR/HAc i odgovarajući analitički pravac.

Determination of As(III) with the scTRACE Gold

AsIII+AsV 10ug+OKS 2ml 1.



Dodatak 94. Voltamogrami određivanja As(III) u modelnoj otopini As(III)/As(V) koncentracija $\gamma(\text{As(III)}) = \gamma(\text{As(V)}) = 10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ dodatkom OKS i odgovarajući analitički pravac.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Amra Alispahić (rođ. Hrvat) rođena je 30. studenoga 1980. godine u gradu Rudo, Republika Bosna i Hercegovina. Udata je i majka dvoje djece.

Nakon završene osnovne škole, 1995. godine upisala je III Gimnaziju u Sarajevu gdje je maturirala 1999. godine. Školovanje je nastavila na Kemijskom odsjeku Prirodno–matematičkog fakulteta, Univerziteta u Sarajevu. Diplomski rad "Sadržaj ukupnih fenola i antocijanina u plodovima brusnice, borovnice i divlje trešnje", pod mentorstvom prof. dr. Emin Sofić, obranila je na Kemijskom odsjeku, Prirodno–matematičkog fakulteta, Univerziteta u Sarajevu 2006. godine te stekla zvanje diplomirani inženjer kemije. Postdiplomski studij na Odsjeku za kemiju Prirodno–matematičkog fakulteta u Sarajevu, smjer: Fizikalna kemija upisala je 2007. godine. Magistarski rad pod nazivom „Ispitivanje uticaja rastvarača i pH na spektralne osobine odabranih ksanten–3–on derivata“, pod mentorstvom prof. dr. Sabina Gojak–Salimović, obranila je na Kemijskom odsjeku, Prirodno–matematičkog fakulteta, Univerziteta u Sarajevu 2015. godine te time stekla zvanje magistar kemijskih nauka. Poslijediplomski doktorski studij na Odsjeku za kemiju, Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, smjer: Fizikalna kemija upisala je 2016. godine. Eksperimentalni dio doktorske disertacije pod nazivom „Stabilnost i toksični učinci specija arsena u uzorcima voda“ napravljen je na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ te na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, Republika Hrvatska pod vodstvom dr. sc. Adele Krivohlavek, znanstvene suradnice i prof. dr. sc. Nives Galić, redovite profesorice. Od 2007. godine zaposlena je kao asistent na predmetima Fizikalna kemija I i II Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Sarajevu. Od 2015. Godine zaposlena je kao viši asistent na predmetima Fizikalna kemija I i II Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Sarajevu. Kao autor i koautor na posterskim priopćenjima učestvovala je na više međunarodnih konferencija. Također je učestvovala na više međunarodnih škola i seminara. Učesnica je nekoliko domaćih i međunarodnih projekata.

Popis znanstvenih radova:

- H. Dzudzevic–Cancar, **A. Alispahic**, A. Dedic, S. Muratovic, A. Ajanovic, K. Duric, I. F. Cancar, Antioxidant activity of commonly consumed fruits grown in Bosnia and Herzegovina and its relation with phenolics, flavonoids and anthocyanins content, *Ponte*

Academic Journal, Volume 78, Issue 5 (2022).

<https://doi.org/10.21506/j.ponte.2022.5.4>

Indeksiran: **Web of Science**, Scopus, Google scholar, WordCat, Publons, CrossRef – DOI depositor, Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), SJR – Scimago Journal and Country Rank.

- Dedić, H. Džudžević–Čančar, **A. Alispahić**, I. Tahirović and E. Muratović, *In vitro* antioxidant and antimicrobial activity of aerial parts of *Prunus spinosa* L. Growing wild in bosnia and herzegovina, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 12 (7) (2021):3643–3653. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12\(7\).3643-53](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12(7).3643-53)
[https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12\(7\).3643-53](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12(7).3643-53)

Indeksiran: Scopus, EMBASE–Elsevier, PubMed (Selected citations), **Web of Science – Emerging Sources Citation Index** (Coverage till January 2021), Corss Ref., Hinari– WHO, Chemical Abstract, Scirus – Elsevier's, Gale– Expanded Academic ASAP, EBSCO.

- ***A. Alispahić**, A. Krivohlavek, N. Galić, Novel Preservation Methods for Inorganic Arsenic Speciation in Model and Natural Water Samples by Stripping Voltammetric Method, *Applied Sciences*, 11 (19) (2021) 8811. <https://doi.org/10.3390/app11198811>

Indeksiran: AGRIS, CAPlus / SciFinder, CNKI, DOAJ, EBSCO, Elsevier, Scopus, FRIDOC, Gale, Inspec, INSPIRE, J–Gate, OpenAIRE, PATENTSCOPE, ProQuest, SafetyLit, **Web of Science, SCIE**, Current Contents – Engineering, Computing & Technology, Current Contents – Physical, Chemical & Earth Sciences.

- B. Imamović, I. Ivazović, **A. Alispahić**, E. Bečić, M. Dedić, A. Dacić, Assessment of the Suitability of Methods for Testing the Antioxidant Activity of Anti–Aging Creams, *Applied Sciences* 11 (4), 1358. <https://doi.org/10.3390/app11041358>

Indeksiran: AGRIS, CAPlus / SciFinder, CNKI, DOAJ, EBSCO, Elsevier, Scopus, FRIDOC, Gale, Inspec, INSPIRE, J–Gate, OpenAIRE, PATENTSCOPE, ProQuest, SafetyLit, **Web of Science, SCIE**, Current Contents – Engineering, Computing & Technology, Current Contents – Physical, Chemical & Earth Sciences.

- Š. Mandal, **A. Alispahić**, A. Dedić, H. Džudžević–Čančar, Spectrophotometric Determination of Magnesium Oxide Content in Supplements of Magnesium, *Kemija u industriji* 68 (5–6) (2019) 197–200. <https://doi.org/10.15255/KUI.2018.046>

Indeksiran: **Web of Science™ Core Collection – Emerging Sources Citation Index (ESCI)**, Analytical Abstracts, Cabell's Directory, Chemical Abstracts Plus (CAPlus).

- H. D. Cancar, A. Dedic, **A. Alispahic**, S. Muratovic, I. Tahirovic, Chromatographic And Spectroscopic Characterisation Of Lycopene Extracted From Fresh And Thermally Processed Tomato Fruit, *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 9 (6) (2018) 1094. https://www.rjpbcs.com/2018_9.6.html

Indeksiran: NCBI NLM Catalogue, EMBASE (Elsevier), SCIMAGO, CAS, Citefactor, CABI, Google Scholar, Open J–Gate, Biblioteka, Science Central, Index Scholar, AYUSH Research Portal, Indexed Copernicus, EBSCO, PSOAR, Ulrichs Directory of Periodicals, SIA etc.

- **Alispahić**, A. Šapčanin, M. Salihović, E. Ramić, A. Dedić, M. Pazalja, Phenolic content and antioxidant activity of mushroom extracts from Bosnian market, *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, 44 (2) (2015) 5–8. <http://hemija.pmf.unsa.ba/glasnik/index.php/2014-03-20-22-03-11/issue-44>

Indeksiran: **Emerging Sources Citation Index (Web of Science, Clarivate Analytics)**, Academic Search Complete (EBSCO), CAPlus (Chemical Abstracts Plus), Google Scholar.

- M. Salihovic, A. Sapcanin, M. Pazalja, A. Alispahic, A. Dedic, E. Ramic, Determination of caffeine in different commercially available green and black teas. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina* 43 (2014) 1–4. <http://hemija.pmf.unsa.ba/glasnik/index.php/2014-03-20-22-03-11/issue-43>

Indeksiran: **Emerging Sources Citation Index (Web of Science, Clarivate Analytics)**, Academic Search Complete (EBSCO), CAPlus (Chemical Abstracts Plus), Google Scholar.

<http://hemija.pmf.unsa.ba/glasnik/index.php/2014-03-20-22-03-11/issue-43>