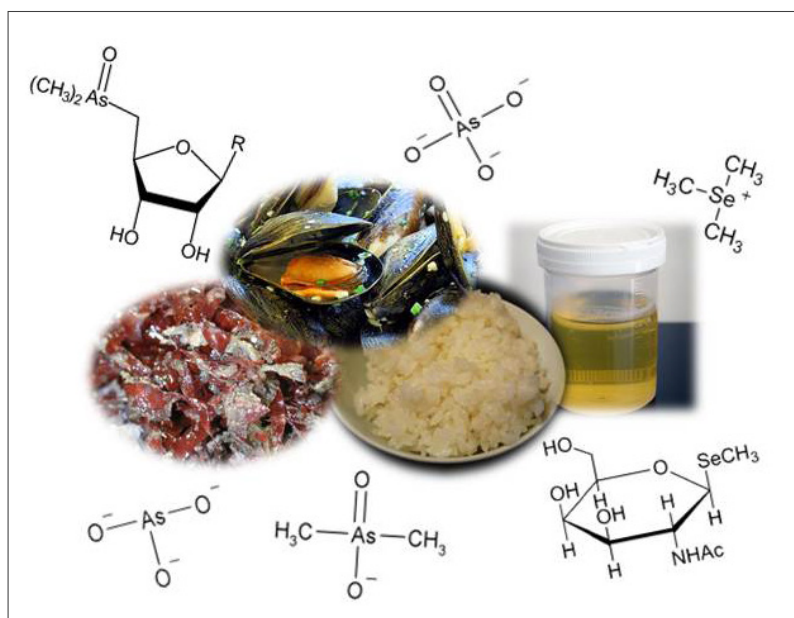




FRANCISCO ARDINI
DIPARTIMENTO DI CHIMICA E CHIMICA INDUSTRIALE
UNIVERSITÀ DI GENOVA
ARDINI@CHIMICA.UNIGE.IT

TECNICHE ANALITICHE INNOVATIVE NELLA SPECIAZIONE DI ARSENICO E SELENIO

La tossicità di arsenico e selenio dipende fortemente dalla loro forma chimica. Per poter discriminare e quantificare le varie specie di questi due elementi in diversi ambiti (ambientale, biologico, clinico e alimentare) sono state sviluppate delle metodiche analitiche innovative basate sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa inorganica.



Tra gli elementi in tracce da monitorare a livello ambientale, clinico e alimentare, arsenico e selenio sono particolarmente importanti, il primo a causa della sua elevata tossicità e il secondo per il suo duplice ruolo di elemento essenziale o tossi-

co in funzione della sua concentrazione. In particolare, l'arsenico elementare e i suoi composti sono classificati dall'Unione Europea come "tossici" e "pericolosi per l'ambiente" con la direttiva 67/548/EEC, e inseriti dall'International Agency for Research on Cancer nella categoria delle sostanze con effetto cancerogeno sull'uomo. Tuttavia, la sua tossicità dipende fortemente dalla sua forma chimica. Le principali specie inorganiche, gli ioni arsenito (As(III)) e arseniato (As(V)), sono cancerogene e più tossiche rispetto a quelle organiche [1]. Tra le sue forme organiche, quelle metilate (monometilarsinato, MMA, e dimetilarsinato, DMA) risultano meno tossiche in quanto entrano nei meccanismi di detossificazione di alcuni organismi e vengono escrete per via urinaria, ma sono anch'esse potenzialmente cancerogene [2]; altri composti organici,

Il dott. Ardini è stato insignito del "Premio Mazzucotelli" durante il convegno ISA2016 svoltosi a Matera dal 29 maggio al 1° giugno 2016.



come l'arsenobetaina e l'arsenocolina, sono invece considerati non tossici, mentre il metabolismo degli arsenozuccheri non è ancora completamente chiarito [3].

Il selenio, invece, è un elemento essenziale per la salute umana e viene assunto principalmente tramite la dieta in quantità variabile a seconda del tipo di alimento e della sua origine. L'alimento più ricco in questo elemento è la noce del Brasile [4], ma elevate concentrazioni di selenio possono essere trovate anche nei prodotti ittici e nelle frattaglie animali [5]. Tuttavia, il confine tra livello essenziale e tossico di selenio è molto sottile e gli effetti biologici risultanti dipendono dalla quantità e dalla forma chimica attraverso la quale il selenio è ingerito e/o trasformato [5, 6].

Dato che l'escrezione renale è la principale via di eliminazione del selenio, la determinazione dei suoi metaboliti nell'urina può aiutare a capire i cambiamenti che avvengono nel corpo e che producono effetti benefici o negativi [7]. In particolare, la principale specie del selenio presente nell'urina è il metil 2-acetammido-2-deossi-1-seleno- β -D-galattopiranoside (selenozucchero 1), seguito dallo ione trimetilselenonio (TMSe) e dai selenozuccheri metil 2-acetammido-2-deossi-1-seleno- β -D-galattopiranoside (selenozucchero 2) e l'analogo deacilato metil 2-ammino-2-deossi-1-seleno- β -D-galattopiranoside (selenozucchero 3) come costituenti minori. Secondo Kobayashi *et al.* [6] il selenio è eliminato attraverso l'urina sotto forma di selenozucchero 1 quando la sua concentrazione si trova sotto il livello tossico, mentre dosi tossiche di questo elemento sono escrete nelle urine sotto forma di TMSe, oltre che attraverso la respirazione come dimetilseleniuro.

Data la varietà di specie nelle quali può presentarsi un elemento, caratterizzate da diversa tossicità, risulta evidente la necessità di identificare i singoli composti in modo da comprenderne i meccanismi di biotrasformazione e di detossificazione negli organismi, e capire quali possano essere le potenziali

ripercussioni sull'ambiente e sulla salute dell'uomo, non valutabili attraverso l'analisi della sola concentrazione totale degli elementi. Risulta importante perciò effettuare delle analisi di speciazione, definite dalla IUPAC come le "attività analitiche di identificazione e/o misura delle quantità di una o più specie chimiche individuali in un campione" [8].

Per effettuare analisi di speciazione è necessario separare le diverse specie di un elemento e successivamente determinarle in maniera accurata. La tecnica analitica più utilizzata per la fase di separazione è la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), con meccanismo a scambio ionico per le specie dell'arsenico e a fase inversa per quelle del selenio. Queste tecniche cromatografiche vengono accoppiate a un metodo di rivelazione con buone caratteristiche di sensibilità (in quanto tali specie sono spesso presenti a basse concentrazioni) e selettività (vista la complessità delle matrici analizzate). La spettrometria di massa con sorgente a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) è la tecnica più utilizzata per quello che può offrire in termini di robustezza, sensibilità, ampiezza di intervallo dinamico e semplicità spettrale [9, 10]. Il maggiore svantaggio dell'accoppiamento HPLC-ICP-MS è dato dalla necessità di usare per la cromatografia fasi mobili organiche o saline che, ai flussi di eluente comunemente impiegati in HPLC (circa 1 mL/min), possono causare una degradazione della stabilità del plasma e del segnale del fondo, con ripercussioni negative sulle prestazioni dell'analisi ICP-MS [9, 10].

In questo lavoro vengono passati in rassegna alcuni approcci utilizzati per ovviare a questo inconveniente: il primo consiste nella cromatografia liquida ad alta temperatura (HTLC), che è in grado di lavorare efficacemente con fasi mobili costituite quasi esclusivamente da acqua pura, ed è stata applicata alla determinazione di arsenozuccheri negli organismi marini e dei metaboliti del selenio nelle urine [11, 12]; il secondo consiste nella diminuzione della quantità di soluzione introdotta nello spettrometro

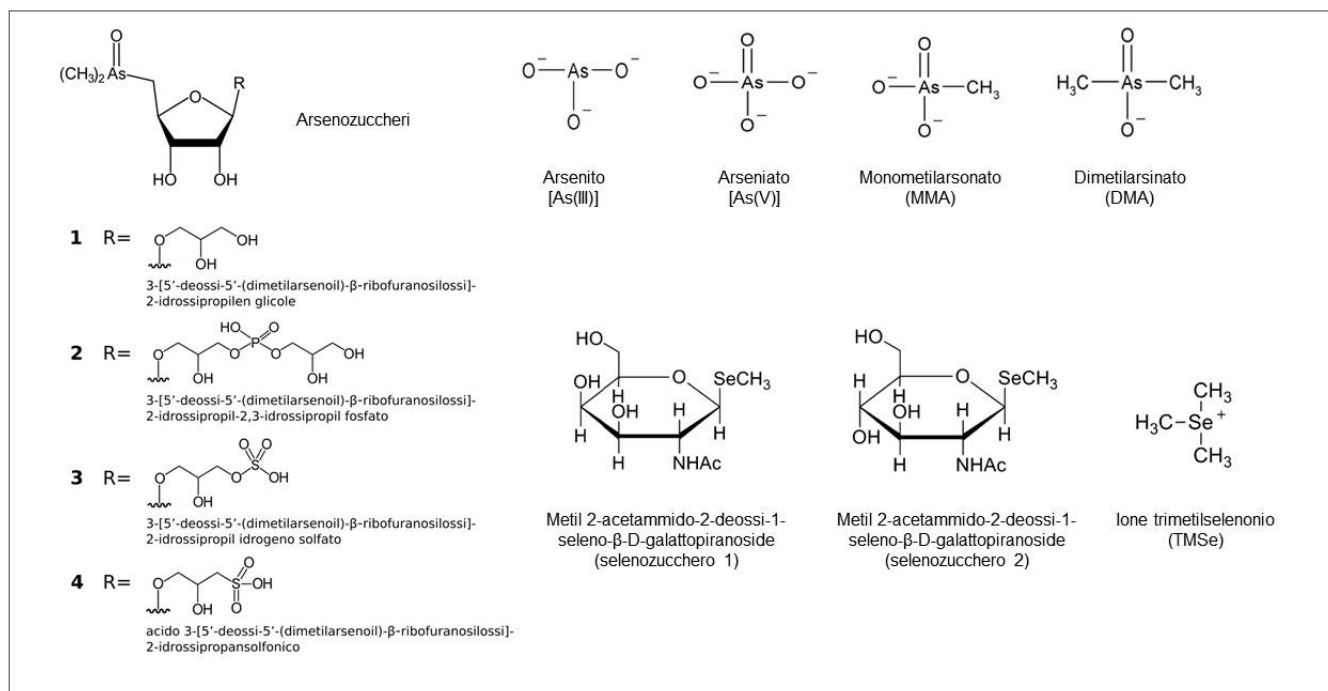


Fig. 1 - Strutture dei composti determinati

mediante l'uso di colonne con un minor diametro interno (narrow-bore), ed è stata utilizzata per la determinazione delle principali specie tossiche dell'arsenico in campioni alimentari (prodotti ittici e derivati del riso) [13].

Analiti e metodiche

Le strutture degli analiti determinati sono riportate in Fig. 1.

Per la determinazione degli arsenozuccheri in organismi marini tramite HTLC, una porzione di circa 50 mg di campione liofilizzato è stata estratta con 5 mL di MeOH al 20% tramite agitazione durante la notte, per poi essere centrifugata e filtrata su filtri PVDF da 0,45 μm . L'ottimizzazione e la quantificazione sono state effettuate usando come materiale di riferimento un estratto di alga bruna [14], comunemente usato negli studi sugli arsenozuccheri in quanto, data la complessità della loro sintesi per via chimica e del loro isolamento dalle alghe in forma pura, non esistono standard certificati per questo tipo di composti. Per la determinazione dei composti del selenio tramite HTLC, i campioni di urine sono stati raccolti, agitati vigorosamente per omogeneizzarli e filtrati su filtri in cellulosa da 0,45 μm .

Per la speciazione dell'arsenico con colonna narrow-bore, i prodotti ittici sono stati preparati seguendo la stessa procedura descritta per la determinazione degli arsenozuccheri. Per i derivati del riso, invece, il campione pesato è stato trattato con MeOH al 20% in un bagno a ultrasuoni per 6 h, e successivamente centrifugato e filtrato.

Risultati e discussione

HTLC

La cromatografia liquida ad alta temperatura (HTLC) è una variante della cromatografia liquida che utilizza alte temperature per la separazione degli analiti facendo fluire la fase mobile all'interno di un sistema di riscaldamento (tipicamente un forno) [15]. L'effetto della temperatura sulla separazione cromatografica è studiato e impiegato fin dagli anni Quaranta, ma solo grazie ai recenti sviluppi di nuove fasi stazionarie termicamente stabili e sistemi di riscaldamento efficienti è stato possibile sfruttarne le potenzialità in maniera relativamente diffusa. L'aumento di temperatura abbassa la viscosità della fase mobile, portando a numerosi vantaggi, quali minori tempi di ritenzione, migliore efficienza di separazione della colonna, migliori rapporti segnale/ru-



more e la possibilità di ridurre o eliminare del tutto modificatori organici o tamponi salini dalla fase mobile. Questo permette quindi di usare semplicemente acqua pura come eluente, aspetto particolarmente vantaggioso in termini di semplicità di lavoro, costi, produzione di rifiuti non tossici e possibilità di accoppiamento con tecniche strumentali per le quali l'uso di un

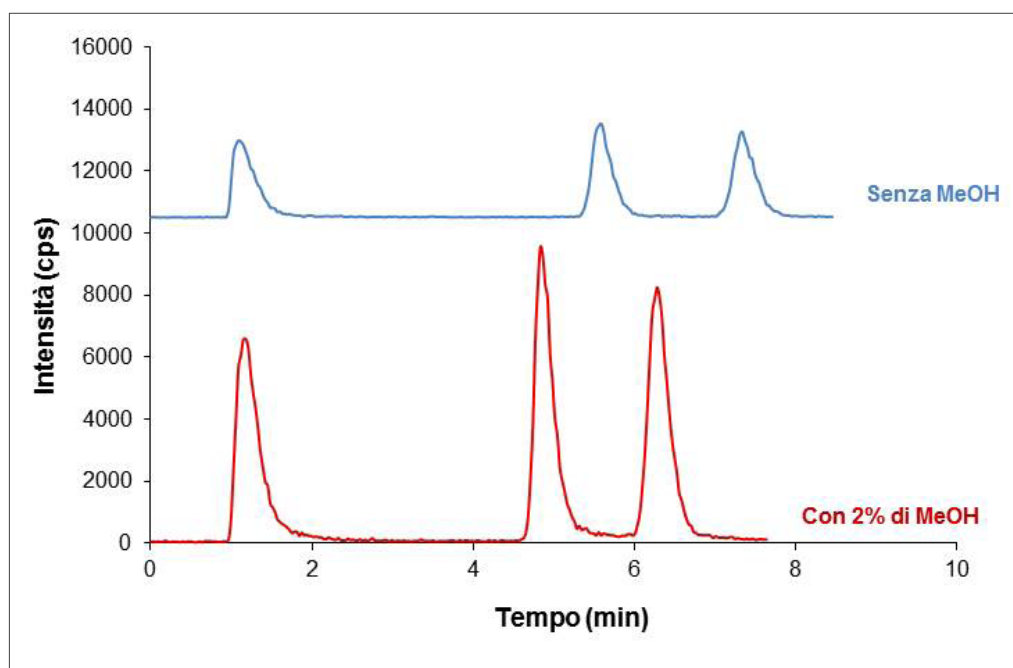


Fig. 2 - Effetto del metanolo sulla separazione cromatografica dei metaboliti del selenio

solvente organico è poco tollerato (come appunto la spettrometria con sorgente a plasma).

Perciò, è stato studiato l'accoppiamento HTLC-ICP-MS nel campo della speciazione elementare, in particolare per la determinazione di arsenozuccheri negli organismi marini [11] e dei metaboliti del selenio nelle urine [12]. Come fase stazionaria è stata utilizzata una colonna di grafite porosa, la quale è costituita da particelle sferiche porose di grafite, mentre a livello molecolare è composta da piani di atomi di carbonio arrangiati esagonalmente senza gruppi superficiali disponibili per attacco chimico. La ritenzione complessiva in questa colonna è data da una combinazione di due meccanismi:

- i) interazioni tra analita-fase mobile e analita-superficie della grafite, per le quali la ritenzione aumenta all'aumentare dell'idrofobicità della molecola;
- ii) interazioni (indotte da carica) di un analita polare con la superficie polarizzabile della grafite, che dipendono dall'area molecolare in contatto con la superficie della grafite e da tipo e posizione dei gruppi funzionali in relazione alla superficie della grafite.

La fase mobile è costituita da semplice acqua ultra-

pura (con un'aggiunta di alcuni microlitri di HNO_3 e NH_3 per aggiustare il valore di pH) della quale sono stati ottimizzati forza ionica, pH e l'aggiunta di una piccola quantità di MeOH per migliorare la sensibilità strumentale. La presenza di una piccola percentuale di composti organici in soluzione aumenta infatti il segnale ICP-MS di elementi aventi elevata energia di ionizzazione (come arsenico e selenio) [16]. Questo è stato verificato con l'aggiunta di 2% di MeOH nella fase mobile, ed è stato osservato (esempio in Fig. 2 per la determinazione dei metaboliti del selenio) come questa causasse, oltre a un aumento della sensibilità di un fattore 5, anche una riduzione del tempo di ritenzione, a causa di un effetto di competizione con gli analiti.

Una volta selezionata la fase mobile, è stato valutato l'effetto della temperatura sull'efficienza di separazione (Fig. 3). Si è osservato che all'aumentare della temperatura si verificava una diminuzione dei tempi di ritenzione e delle ampiezze dei picchi. Per quanto riguarda gli arsenozuccheri (Fig. 3a) alla temperatura più bassa ($40\text{ }^\circ\text{C}$) tre dei cinque picchi eluivano dalla colonna solo dopo più di 2 h (non mostrato in figura). Viceversa, a $140\text{ }^\circ\text{C}$ tutti gli arsenozuccheri eluivano in breve tempo ma si aveva una

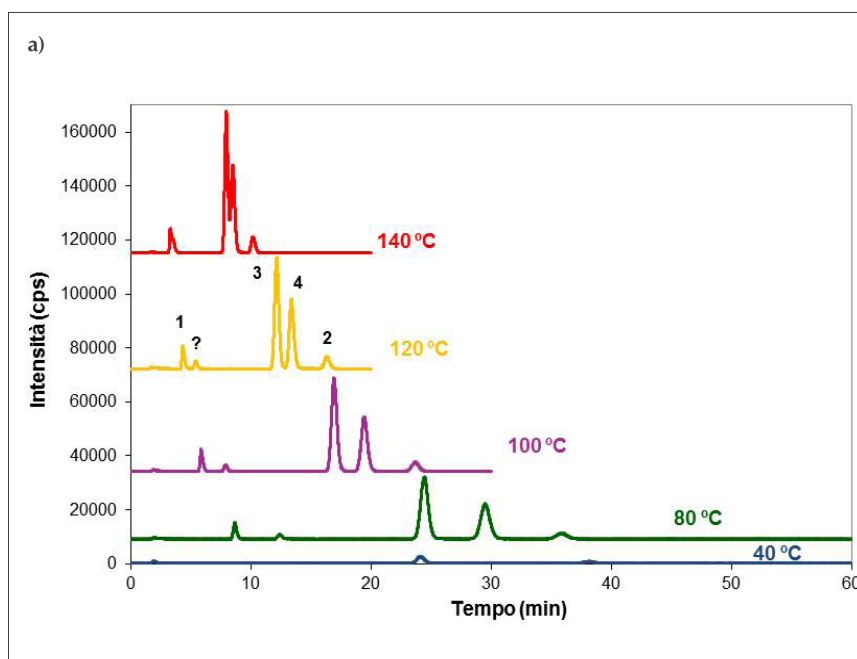
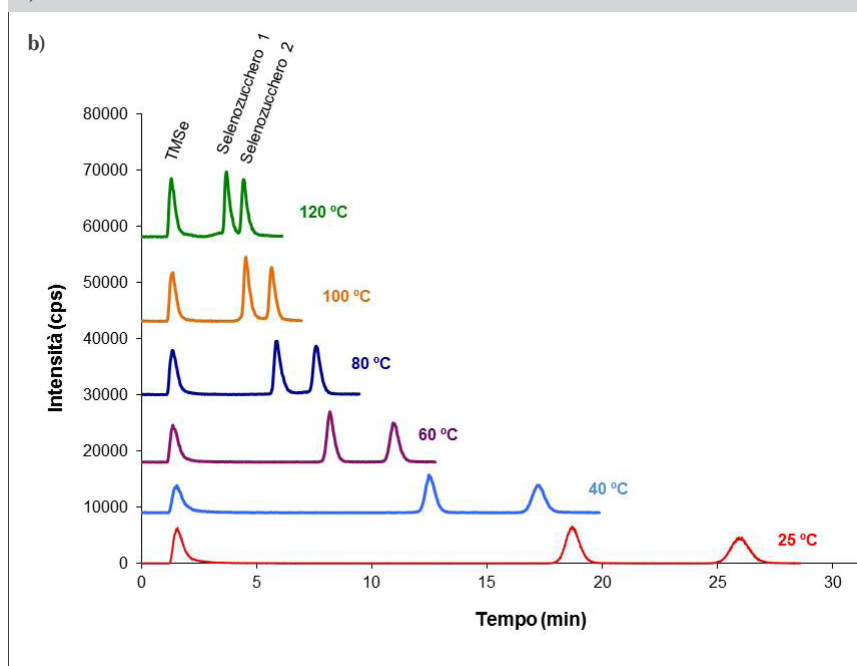


Fig. 3 - Effetto della temperatura sulla separazione cromatografica: a) arsenozuccheri; b) metaboliti del selenio



sovrapposizione tra il picco dell'arsenozucchero **1** e quello di una specie incognita, e tra i picchi degli arsenozuccheri **3** e **4**. La temperatura di 120 °C è stata quella in grado di garantire il minimo tempo di corsa cromatografica senza co-eluzioni dei picchi, ed è stata quindi scelta come temperatura di lavoro. Infine, è da notare che il metodo sviluppato è immune da interferenze dovute ad altre specie dell'arsenico, in quanto in queste condizioni cromatografiche esse

non sono trattenute dalla colonna ed eluiscono tutte al tempo morto. Un analogo andamento è stato osservato per i composti del selenio (Fig. 3b), il cui tempo di ritenzione diminuisce all'aumentare della temperatura; in questo caso la temperatura ottimale per la risoluzione dei picchi (relativi ai selenozuccheri **1** e **2**) è risultata essere 80 °C. La temperatura della colonna ha influito anche sulla sensibilità della determinazione. Infatti, è stato trovato che all'aumentare della temperatura aumentava l'altezza dei picchi, effetto dovuto a una riduzione della dispersione dei composti lungo la colonna. Viceversa, l'area del picco rimaneva costante al variare della temperatura, indicando che l'efficienza di trasporto dell'analita non cambia con la temperatura della fase mobile e che non si sono verificate degradazioni significative degli analiti.

Le metodiche analitiche ottimizzate sono state infine applicate all'analisi di campioni reali, ovvero organismi marini antartici (alghe, molluschi bivalvi e krill) per gli arsenozuccheri e urine per i composti del selenio. In Fig. 4a è riportato il cromatogramma ottenuto per un campione rappresentativo di alga rossa (*Iridaea cordata*).

La maggior parte dell'arsenico estratto è costituito da arsenozuccheri (81-97%), in particolare arsenozucchero **2** (56-94%), in buon accordo con i dati ottenuti con un sistema HPLC-ICP-MS convenzionale. In Fig. 4b è riportato invece un cromatogramma ottenuto dall'analisi di campioni di urine di due volontari dopo l'assunzione di selenio tramite consumo di noci del Brasile. Per entrambi i volontari si è potuto osservare solamente il selenozucchero **1** (in quantità diver-



se a seconda dell'individuo), mentre non sono stati rilevati selenozucchero **2** e TMsSe. Questo risultato è in accordo con studi di letteratura che riportano il selenozucchero **1** come metabolita urinario principale.

Colonne narrow-bore

L'introduzione di grandi quantità di fasi mobili organiche o saline nel plasma può essere mitigata diminuendo il flusso dell'eluente, mediante l'impiego di colonne con diametro interno minore, genericamente indicate con il termine "small-bore". Oltre al minor carico del plasma, i vantaggi derivanti dall'utilizzo di queste colonne includono un minor consumo di fase mobile (e conseguentemente una produzione minore di scarico), separazioni cromatografiche più rapide e un miglioramento di risoluzione e sensibilità.

In particolare, le colonne narrow-bore sono caratterizzate da un diametro interno compreso tra 2,1 e 4 mm, e in caso di un loro utilizzo il flusso di eluente può scendere fino a 0,3 mL/min. [17]. Questo tipo di colonne è stato utilizzato per sviluppare una nuova metodica HPLC-ICP-MS per la speciazione dell'arsenico [13], consentendo la determinazione delle principali specie tossiche dell'arsenico (As(III), As(V), MMA e DMA) in campioni alimentari (prodotti ittici e derivati del riso). La colonna utilizzata funzionava con un meccanismo a scambio anionico, che necessitava di una fase mobile polare; è stata quindi testata una soluzione acquosa di $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (anche in questo caso con un'aggiunta del 2% di MeOH per migliorare la sensibilità), ottimizzandone la concentrazione di sale, pH e flusso di eluente. In Fig. 5 è riportato un cro-

matogramma relativo alla separazione dei quattro composti nelle condizioni ottimali, confrontato con un'analogha separazione mediante cromatografia a scambio anionico convenzionale (flusso di eluente di 1,5 mL/min). Si può osservare come, rispetto al sistema tradizionale, si siano ottenuti un dimezzamento dei tempi di ritenzione e un aumento di sensibilità del 50%.

Possibili interferenze dovute alle co-eluzioni di altre tipiche specie dell'arsenico (come arsenobetaina e arsenozuccheri) sono state valutate iniettando soluzioni di riferimento e misurando il tempo di ritenzione. L'arsenobetaina, essendo una specie cationica, eluiva al tempo morto come atteso, causando una possibile interferenza con l'arsenito; tuttavia, essa è presente in quantità significative solo

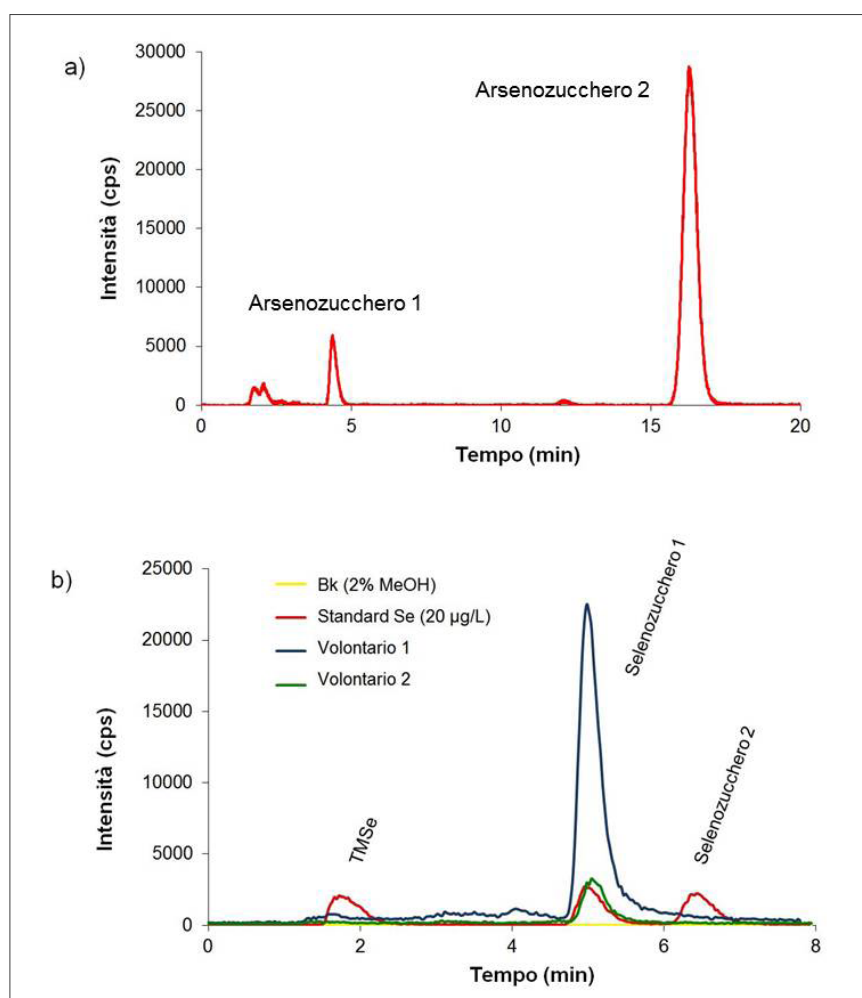


Fig. 4 - Cromatogrammi ottenuti dall'analisi di campioni reali con HTLC-ICP-MS: a) determinazione di arsenozuccheri in un'alga rossa; b) determinazione dei metaboliti del selenio nelle urine di due volontari dopo l'ingestione di noci del Brasile

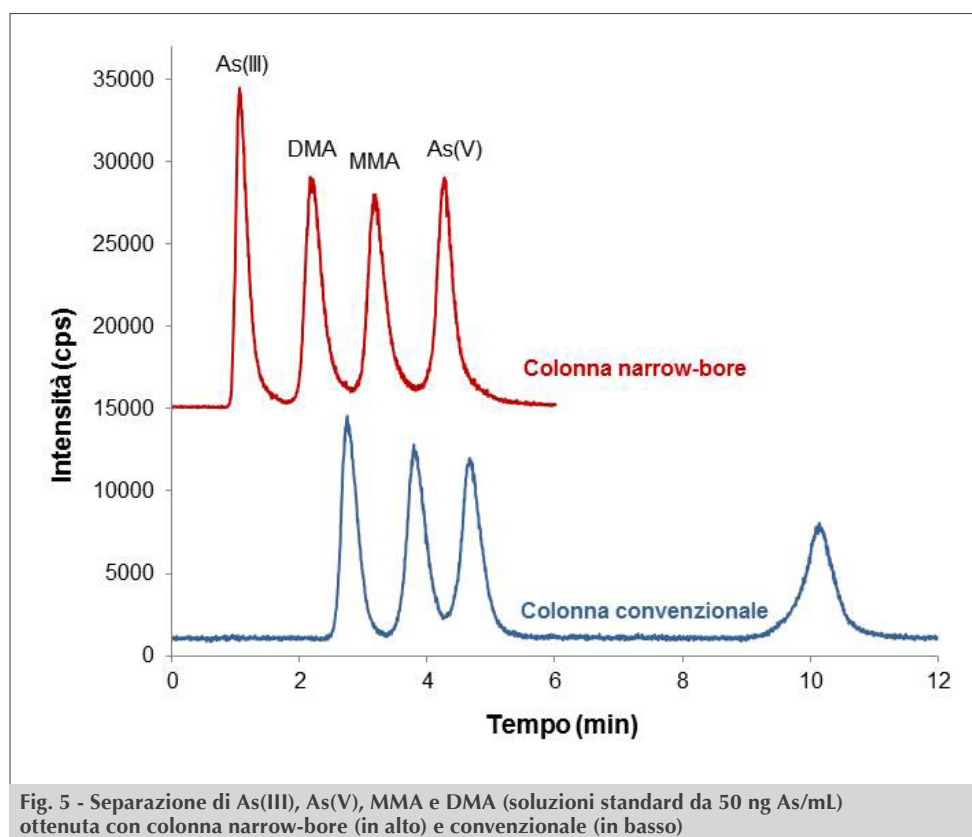


Fig. 5 - Separazione di As(III), As(V), MMA e DMA (soluzioni standard da 50 ng As/mL) ottenuta con colonna narrow-bore (in alto) e convenzionale (in basso)

nei prodotti ittici, e per determinare l'arsenito è sufficiente ossidare l'estratto con H_2O_2 1:10 (v/v) per convertirlo ad arsenato, e ripetere l'analisi. Gli arsenozuccheri, invece, erano ritenuti in maniera diversa a seconda del composto, a tempi di ritenzione in grado di garantirne la quantificazione senza interferire con le altre specie.

L'applicabilità della metodica è stata poi dimostrata tramite l'analisi di diverse matrici alimentari acquistate in negozi locali, ovvero prodotti a base di riso (spaghetti, farina e cracker di riso, riso Arborio e riso Jasmine) e prodotti ittici (mitili, alghe, tonno e gamberi). I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli derivanti dall'analisi con una metodica HPLC-ICP-MS convenzionale, risultando statisticamente non differenti. I prodotti a base di riso contenevano livelli di arsenico inferiori a $0,3 \mu\text{g/g}$, con l'arsenito che costituiva la specie principale di arsenico nella farina (80%), negli spaghetti (67%) e nelle varietà Arborio (66%) e Jasmine (63%) e una delle principali nei cracker (37-48%). L'arsenato era presente in quantità significative solamente nei cracker (23-43%), mentre

l'MMA non era rivelabile in nessun campione. Il DMA era presente in tutte le matrici (eccetto gli spaghetti), rappresentando circa il 20% dell'arsenico estratto totale. Per quanto riguarda i prodotti ittici, il tonno e i gamberi presentavano solamente un abbondante picco al tempo morto corrispondente all'arsenobetaina (specie cationica e quindi non ritenuta). Arsenito e arsenato non erano rivelabili né nelle alghe né nei mitili, che si differenziavano tra di loro per le altre specie presenti: i mitili contenevano piccole quantità di MMA,

DMA e arsenozucchero **2** (circa il 2% dell'arsenico estratto totale), mentre nelle alghe l'82% di arsenico era rappresentato dagli arsenozuccheri.

Conclusioni

Gli svantaggi derivanti dall'accoppiamento HPLC-ICP-MS per la speciazione di arsenico e selenio sono stati affrontati con due approcci, ovvero l'uso della cromatografia liquida ad alta temperatura e l'uso di microflussi di campione per diminuire la quantità di eluente introdotta nel plasma.

Il primo approccio è stato applicato alla determinazione di arsenozuccheri negli organismi marini e dei metaboliti del selenio nelle urine. Utilizzando una colonna di grafite porosa alla temperatura di 120 o 80 °C è stato possibile ottenere una diminuzione dei tempi di ritenzione e un miglioramento della sensibilità (in termini di altezza dei picchi) rispetto all'analisi a temperatura ambiente, senza un aumento del segnale di fondo o degradazione degli analiti. Rispetto ai metodi convenzionali HPLC-ICP-MS, l'utilizzo dell'alta temperatura con-



sente di usare unicamente acqua ultrapura (con 2% di MeOH) come fase mobile, e in questo modo la preparazione dell'eluente risulta più semplice ed economica, il segnale strumentale è più stabile e gli scarichi presentano una tossicità minore.

Il secondo approccio ha previsto l'utilizzo di colonne narrow-bore per la determinazione delle principali specie tossiche dell'arsenico in campioni alimentari (prodotti ittici e derivati del riso); grazie alle minori dimensioni della colonna e i flussi minori di eluente, il metodo ottimizzato ha fornito una sensibilità migliore, tempi di analisi minori, un minor consumo di fase mobile e un minor carico di eluente nel plasma rispetto alla procedura convenzionale.

Questi metodi rappresentano quindi una valida alternativa ai metodi convenzionali per monitorare le diverse specie di arsenico e selenio nell'ambiente, negli alimenti e negli organismi.

Ringraziamenti

L'autore ringrazia il comitato di selezione del Premio Mazzucotelli dell'ISA 2016 per l'assegnazione del premio e tutti i collaboratori del suo gruppo di ricerca con cui ha realizzato questi lavori, in particolare il Prof. Marco Grotti e la Dr.ssa Amanda Terol. I lavori qui descritti sono stati finanziati dall'Università di Genova (progetto D31J11000030005) e dal MIUR (PRIN-2010AXENJ8), e sono stati in parte realizzati in collaborazione con il Dipartimento di Chimica Analitica, Nutrizione e Bromatologia dell'Università di Alicante (Spagna).

BIBLIOGRAFIA

- [1] Y. Shibata, M. Morita, Arsenic and organoarsenicals, in J.W. Kiceniuk, S. Ray (Eds.), *Analysis of contaminants in edible aquatic sources*, VCH, New York, 1994, 159.
- [2] M. Styblo *et al.*, *Environmental Health Perspectives*, 2002, **110**, 767.
- [3] C. Niegel, F.-M. Matysik, *Analytica Chimica Acta*, 2010, **657**, 83.
- [4] A.P. Vonderheide *et al.*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 5722.
- [5] M. Navarro-Alarcon, C. Cabrera-Vique, *Science of the Total Environment*, 2008, **400**, 115.
- [6] Y. Kobayashi *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, **99**, 15932.
- [7] K.A. Francesconi, F. Pannier, *Clinical Chemistry*, 2004, **50**, 2240.
- [8] D.M. Templeton *et al.*, *Pure and Applied Chemistry*, 2000, **72**, 1453.
- [9] C. B'Hymer, J.A. Caruso, *Journal of Chromatography A*, 2004, **1045**, 1.
- [10] C. B'Hymer, J.A. Caruso, *Journal of Chromatography A*, 2006, **1114**, 1.
- [11] A. Terol *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 2012, **1262**, 70.
- [12] A. Terol *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 2015, **1380**, 112.
- [13] A. Terol *et al.*, *Analytical Sciences*, 2016, **32**, 911.
- [14] A.D. Madsen *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000, **15**, 657.
- [15] T. Teutenberg, *High-Temperature Liquid Chromatography: A User's Guide for Method Development*, RSC Publishing, Cambridge, UK, 2010.
- [16] P. Allain *et al.*, *Analytical Chemistry*, 1991, **63**, 1497.
- [17] M. Grotti *et al.*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014, **61**, 92.

Innovative Analytical Techniques in the Speciation of Arsenic and Selenium

The toxicity of arsenic and selenium is strongly dependent on their chemical form. In order to discriminate and quantify the various species of these two elements in different fields (environmental, biological, clinical and food-related), innovative analytical methods based on liquid chromatography coupled to inorganic mass spectrometry have been developed.