

Arsen i arsenove specije u hrani - naglasak na anorganski arsen



Marija Sedak*, Bruno Čalopek, Maja Đokić i Nina Bilandžić

Uvod

Specijacija metala ima važnu ulogu prilikom istraživanja toksičnosti i bioraspoloživosti elemenata kada informacija o ukupnoj koncentraciji elementa nije dovoljna. S toksikološkog stajališta, specijacija igra važnu ulogu u slučaju arsena. Među vrstama arsena koje se nalaze u hrani, anorganske (As (III) i As (V)) su toksičnije za ljude nego organske vrste. Apsorpcija i izlučivanje arsena ovisi o vrsti arsenovih spojeva. Anorganski arsen (iAs) se lakše apsorbira od organskog arsena, As (V) se izlučuje brže od As (III), a organski spojevi uneseni u organizam izlučuju se brže od anorganskih (Hughes i sur., 2011.).

Najviše koncentracije ukupnog arsena izmjerene su u sljedećim prehrambenim proizvodima: riba i plodovi mora, proizvodi ili dodatci prehrani na bazi alga (osobito hijiki, *Hizikia fusiformis*), žitarice i proizvodi od žitarica, proizvodi od riže, mekinje i klice. Međutim, u nekim od ovih skupina hrane, razina anorganskog arsena je niska (npr. riba i plodovi mora), jer se u morskim vrstama arsen nalazi u obliku stabilnih, netoksičnih organskih spojeva

kao što su arsenošećeri i arsenobetain (De La Calle i sur., 2012.).

Svojstva i kemija arsena

Među elementima Zemljine kore arsen se nalazi na 20. mjestu, a njegova se koncentracija, ovisno o vrsti stijena kreće u rasponu od 0,1 do nekoliko stotina mg/kg u Zemljinoj kori (Cullen i Reimer, 1989.). Arsenova rasprostranjenost u zemlji, sedimentu, tlu, zraku, vodi i živim organizmima postoji daleko prije čovjekovih aktivnosti. U današnje vrijeme arsen ulazi u okoliš putem antropogenih, a i prirodnih izvora. Antropogeni izvori arsena uključuju industrijske emisije kao što su ne-željezni rudnici i industrija koja koristi metale, a i proizvodnjom energije iz fosilnih goriva (WHO, 2001.).

Arsen je toksični element rasprostranjen u okolišu. Iako može biti esencijalan, jer ga neki mikroorganizmi koriste za proizvodnju energije, nema čvrstih podataka o važnosti za biološki sustav. Dobro se apsorbira iz dišnog i probavnog sustava. Djeluje na mitohondrijske enzime i zaustavlja

Dr. sc. Marija SEDAK* (dopisni autor, e-mail: sedak@veinst.hr), dipl. ing. prehr. tehnol., Bruno ČALOPEK, dipl. ing. prehr. tehnol., dr. sc. Maja ĐOKIĆ, dipl. ing. kem. tehnol., dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

mehanizam staničnog disanja. Unesen ingestijom odstranjuje se prosječno za 2 - 15 dana. Otrovanje može nastati perakutno, akutno i kronično arsenovodikom i/ili arsenom, koji je jedan od najotrovnijih plinova, kao i jedno od najjačih hemolitičkih sredstava u industriji (Duraković i Labar, 2000.), a postoji u anorganskom i organskom obliku i u različitim oksidacijskim stanjima (-3, 0, +3 i +5).

Toksičnost arsena

Za razliku od njegove moguće bitnosti u organizmima, mnoge studije su usmjerene na visoku toksičnost koja je dobro poznata iz različitih slučajeva trovanja tijekom godina (Nriagu, 2002.). Arsen je postao nepopularan u javnosti kao moćan otrov na kojega su upozorili brojni romani Agathe Christie. Ovakva reputacija proizlazi od arsen trioksida koji se upotrebljavao za samoubojstva, ali i kao najčešći kriminalni otrov ubijanja u borbi za vlast. To je bio bijeli prah bez mirisa i okusa koji nije umanjivao apetit, bio je smrtonosan u malim dozama i vrlo lako se mogao pomiješati sa šećerom.

Redosljed toksičnosti arsenovih spojeva u čovjeka (Benramdane i sur., 1999.) je:

MMA (III) > Arsenit (III) > Arsenat (V) > MMA (V) = DMA (V); gdje je MMA monometilarsen, a DMA dimetilarsen.

Toksičnost arsena ovisi o njegovom kemijskom obliku i oksidacijskom stanju. Anorganski arsenovi spojevi (arsin, arsenit, arsenat) vrlo su toksični. Akutna toksičnost općenito se smanjuje s povećanjem stupnja metiliranja (Leermakers i sur., 2006.). Arsenobetain i arsenokolin se smatraju netoksičnima. Općenito, trovalentne vrste arsena su otrovnije od peterovalentnih. Akutna toksičnost trovalentnog arsena nastaje zbog vezanja na tiolne skupine biološki aktivnih proteina čime se inhibiraju funkcije raznih metaboličkih enzima (Liebl i sur., 1995.).

U slučaju izloženosti iz okoliša toksikolozi se ponajprije bave arsenom u trovalentnom i peterovalentnom oksidacijskom stanju (Hughes, 2002.). Toksičnost je posebno visoka kod anorganskog arsena. Trovalentni anorganski arsen (arsenit) se veže za sulfhidrilne skupine enzima dovodeći do njihove inhibicije, dok peterovalentni anorganski arsen (arsenat), strukturno sličan fosfatu, može poremetiti metaboličke reakcije koje zahtijevaju fosforilaciju (Cox, 1995.). Simptomi akutnog trovanja osoba anorganskim arsenom su teški gastrointestinalni poremećaji, zatajenje jetre i bubrega i kardiovaskularni poremećaji. Kronična izloženost može prouzročiti: pigmentaciju kože,

Tabela 1. Posljedice kronične toksičnosti arsena u ljudi (Hughes, 2002.).

Organ	Djelovanje
Koža	Kožne lezije
Kardiovaskularni sustav	Bolest crnih stopala
Živčani sustav	Periferna neuropatija, encefalopatija
Jetra	Povećanje jetre, ciroza
Hematološki sustav	Depresija koštane srži
Endokrini sustav	Dijabetes
Bubrezi	Proksimalna tubularna degeneracija, papilarne i kortikalne nekroze

hiperkeratozu, karcinom pluća, mje-hura, jetre i bubrega, kao i kože (Kunito i sur., 2008.). Posljedice kronične toksičnosti arsena u čovjeka navedene su u Tabeli 1.

Za razliku od negativnih svojstva, arsen je koristan u medicini. Arsen trioksid (As_2O_3) privukao je veliku pozornost kao terapeutsko sredstvo za liječenje akutne promijelocitne leukemije i drugih vrsta karcinoma, iako točan mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen (Zhu i sur., 2002.).

Anorganske vrste arsena

U morskoj i slatkovodnoj vodi As (V) je glavna vrsta arsena, dok je u vodi za piće u obliku arsenata. Namirnice i proizvodi kopnenog podrijetla uglavnom su niskih koncentracija ukupnog arsena, a time i anorganskog arsena. Iznimka je riža koja sadrži znatne količine anorganskog arsena, često između 0,05 do 0,4 mg/kg suhe mase (Meharg, 2009.). Riba i drugi plodovi mora imaju visoke koncentracije ukupnog arsena i to u rasponu od 5-100 mg/kg suhe mase (Lorenzana i sur., 2009.), ali s mnogo nižim razinama anorganskog arsena, obično < 0,2 mg/kg suhe mase (Edmonds i sur., 1993.). Većina plodova mora sadrži anorganski arsen samo u tragovima, a plodovi s visokim koncentracijama su iznimke, kao na primjer jestiva alga hijiki koja ima visoku razine anorganskog arsena čak od 66 mg/kg i više. Za odrasle osobe, plodovi mora doprinose 74-96% od ukupnog dnevnog unosa arsena, dok riža i rižine žitarice većinu ostatka.

Organske vrste arsena

Arsenobetain

Arsenobetain su prvi put identificirali Edmonds i sur. (1977.) u jastogu. Predstavlja veliku većinu ukupnog arsena u morskim životinjama. Nije de-

tektiran u morskoj vodi, iako se smatra da se nalazi u tragovima. Prisutan je u morskim algama pri niskim koncentracijama, ali uz prisutnosti velikih količina arsenošećera, glavnih vrsta arsena u algama. Razlog prisustva arsenobetaina u mnogo višim koncentracijama u morskih životinja u odnosu na slatkovodne i kopnene životinje nije poznat, a pretpostavlja se da je to povezano sa salinitetom, odnosno, arsenobetain je strukturno sličan glicinskom betainu koji služi kao osmolit (Greenwood i Earnshaw, 1997.).

Metilirani arsenovi spojevi

U ovu grupu spadaju metilarsonat (MA), dimetilarsinat (DMA), trimetilarsin oksid (TMAO) i tetrametilarsonium ion (TETRA). MA i DMA se nalaze u niskom koncentracijama (<0,5 mg/kg) u organizmima, dio su metabolizma arsena i često se pojavljuju zajedno. TMAO i TETRA se također nalaze u niskim koncentracijama u organizmima i morskim uzorcima (EFSA, 2009.).

Arsenošećeri

Identificirano je više od 20 prirodnih arsenošećera. Arsenošećeri su najprisutniji u morskim algama, a znatne koncentracije nalaze se u životinja koje se hrane algama. Nalaze se u tragovima u kopnenih organizama, ali postoje iznimke (EFSA, 2009.).

Arsenolipidi

Arsenolipidi su široki pojam za sve prirodne spojeve topive u mastima koje sadrže arsen. Pojavljuju se u raznim biološkim uzorcima i mogu doseći koncentracije preko 90% ukupne koncentracije arsena. Malo je poznato o njihovoj kemijskoj strukturi, kemijskim svojstvima i toksičnosti. Prisutnost arsenovih spojeva topljivih u mastima prvo je zabilježeno u ribi u kasnim 1960.-ima (Lunde, 1968.).

Jesmo li u opasnosti od arsena u hrani?

Dok pitanja i rasprave o kontaminaciji pitke vode s arsenovim spojevima traje već 30 godina, svijest o rizicima povezanim s arsenovim spojevima u prehrambenim proizvodima novijeg je datuma. Prvi rad koji ukazuje da je riža (kao i brašno, sok od grožđa i kuhani špinat) sadržavala dovoljno visoke koncentracije anorganskog arsena da bi ju opisali kao "znatni doprinos unosu hrane" u SAD-u se pojavio tek 1999. (Schoof i sur., 1999.). Riža predstavlja glavnu namirnicu za više od polovice svjetske populacije zbog svojih nutritivnih svojstava i relativno niske cijene. Procjenjuje se da u mnogim zemljama riža može doprinijeti i do 50% dnevnog unosa proteina. Štoviše, riža se opsežno proizvodi i konzumira u Europi i SAD-u (Frazzoli i sur., 2007.). Kad je zdravlje u pitanju riža može sadržavati visoki sadržaj ukupnog arsena u odnosu na ostale kopnene organizme te se time smatra da je važan čimbenik u doprinosu cjelokupnom unosu arsena u mnogim dijelovima svijeta gdje se prehrana uglavnom temelji na riži (FAO, 2002.). Nadalje, procjenjuje se da je sadržaj arsena preko 10 puta veći u riži u odnosu na druge žitarice (Duxbury i Panaullah, 2007., Williams i sur., 2007.).

Arsen u morskom okolišu

Kako arsen dospijeva u morske organizme vjerojatno leži u sličnostima između kemije arsena i njegovih "kolega" iz grupe 15 (V A), fosfora i dušika. U morskoj vodi pri pH 8, arsen se nalazi uglavnom kao arsenat, ili, preciznije, kao diprotonirani okso-anion $[H_2AsO_4]^-$ ($pK_{2a} = 6,8$, ionski radijus 0,248 nm) (Marcus, 1997.). Glavni nutrijent morske vode je fosfat, koji na pH 8,1 postoji i kao diprotonirani okso-anion $[H_2PO_4]^-$ ($pK_{2a} = 7,2$, ionski radijus 0,238 nm). Morske alge imaju membranske transportne sustave koji uzimaju fosfat

iz morske vode. Međutim, sustavi nisu dovoljno selektivni da bi diskriminirali strukturno slične arsenove vrste. Rezultat je jednostavan pristup arsena stanicama alga. Unutar stanice, arsenat je ponovo pogrešno zamijenjen za fosfat što dovodi do poremećaja (odvajanja) oksidacijskih fosforilacijskih procesa s posljedičnim toksičnim učincima (Dixon, 1997.).

Da bi ublažile potencijalnu toksičnost arsenata, alge su razvile postupak pretvaranja u arsenošćere sukcesivnim koracima oksidacijske alkilacije. Arsenobetain se često naziva "arsen morskih plodova" jer je glavni spoj arsena identificiran u morskim organizmima koje ljudi konzumiraju kao plodovi mora. Većina studija ukazuje da arsenobetain u morskom okolišu formiraju organizmi na niskim trofičkim razinama (Francesconi, 2010.). Glavna hipoteza koja se često spominje za formiranje arsenobetaina u morskom okolišu započinje biotransformacijom arsena u morskim algama koje pretvaraju anorganski arsen u arsenošćere putem stupnjeva metiliranja i adenozilacije. Arsenošćeri se potom djelomično degradiraju te daljnjim stupnjevima metilacije/oksidacije rezultiraju stvaranjem arsenobetaina (Edmonds i Francesconi, 1987.).

Dominantnost arsenobetaina u morskim životinjama vjerojatno je povezana sa sličnom kemijom arsena i dušika. Arsenobetain je arseno-analog betainskog spoja koji sadrži dušik, poznat i kao glicin betain, koji je jedan od najpoželjnijih osmolita u morskim životinjama koje obitavaju u plitkim vodama. U slučaju dušika, biološki važan betain je glicin betain koji služi kao osmolitički zaštitnik osmokonformnih organizama od promjena u slanosti njihove okolne vode (Yancey i sur., 1982.). Stoga, kada je salinitet visok, stanica aktivno uzima male nabijene organske molekule, uključujući glicin betain, kako bi se neutralizirale ra-

zlike u osmotskom tlaku unutar i izvan stanice. Ovi spojevi su favoriziraniji od anorganskih iona, jer su pri visokim koncentracijama manje štetni za proteine u stanici. Arsenobetain je strukturno vrlo sličan glicin betainu pa se pretpostavlja da stanica ne može razlikovati ova dva iona pa uzima arsenobetain istim transportnim sustavom (Clowes i Francesconi, 2004.).

Analitičke metode i tehnike mjerenja ukupnog arsena i spojeva arsena

Načelno ne bi trebalo biti nikakvih problema s detekcijskim limitima pri određivanju arsena. Spektrometri masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) mogu detektirati koncentracije niže od 0,0006 µg/L u otopini koja se neprekidno uvodi brzinom od 1 mL/min uobičajenim uzimanjem uzoraka pomoću raspršivača i komore za raspršivanje (PE, 2012.). Čak i kod starijih instrumenata s uzorcima predobrade koji sadrže razrjeđenje od 100 puta, još uvijek je moguće detektirati arsen u koncentracijama manjim od 10 µg/kg u čvrstom uzorku. Međutim, ako je ukupni sadržaj podijeljen između nekoliko vrsta, sposobnost detekcije pojedine vrste bit će slabija.

Određivanje ukupnog arsena

Glavne tehnike koje se koriste za određivanje arsena u biološkim uzorcima su grafitna tehnika atomske apsorpcijske spektrometrije (GF-AAS), induktivno spregnuta optička emisijska spektrometrija (ICP-OES), spektrometrija masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) i atomska apsorpcijska spektrometrija-hidridna tehnika (HG-AAS). Vrlo je bitna prikladna selekcija pripreme uzoraka u analizi metala. Najviše korištena metoda u pripremi uzoraka je tehnika suhog spaljivanja i mikrovalne digestije (Lehmann i sur., 2013.).

Prisutnost arsenobetaina u ribi i morskim plodovima može predstavljati problem kod determinacije ukupnog arsena gore navedenim tehnikama. Ovaj spoj se smatra stabilnim i njegova kemijska razgradnja je vrlo zahtjevna. Za kompletnu degradaciju arsenobetaina potrebno je mikrovalno spaljivanje pomoću jakih oksidacijskih tvari u kombinaciji s jakim kiselinama pri visokoj temperaturi (280 °C). U nekim slučajevima unatoč uporabi navedenih reagensa i visoke temperature razgradnje arsenobetain se ne degradira u potpunosti pa ukupni arsen može pokazivati niže vrijednosti (Matoušek i sur., 2013.).

Tabela 2. Postupci u određivanju arsenovih specija pomoću HPLC-ICP-MS

Postupak	Evaluacija
Ekstrakcija	Selekcija ekstrakanta Očuvanje integriteta specija Kvantitativna ekstrakcija
Separacija (HPLC)	Selekcija mobilne faze Interakcija specije s kolonom Dostupnost standarda Način elucija
Mjerenje i kvantifikacija (ICP-MS)	Raspršivanje Praćene mase Interferencije

Određivanje arsenovih specija

U analitici određivanja metalnih specija ključno je osigurati nepromjenjivost arsenovih vrsta u cjelokupnom analitičkom procesu, uključujući uzorkovanje. Specijacija arsenovih spojeva je i dalje izazovna, osobito u analizi hrane s kompleksnim organskim matricama. Glavni cilj specijacije je kvantitativna ekstrakcija svih arsenovih vrsta bez promjene njihovih početnih karakteristika. Osnovni postupci specijacije su: ekstrakcija, separacija te mjerenje i kvantificiranje specija (Tabela 2).

Metaloidne specije se mogu klasificirati kao specije koje se lako ekstrahiraju i specije koje je teško ekstrahirati (Dados i sur., 2014.). U slučaju arsena, specije topljive u vodi i lipidima su klasificirane u prvu skupinu, dok se arsen-fitokelatin iz biljaka nalazi u drugoj skupini. Odabir prikladnog ekstrakcijskog otapala je vrlo važan u analizi arsenovih specija. Uvjeti ekstrakcije mogu varirati ovisno o ekstraktantu: omjer uzorka i ekstrakcijskog otapala, raspon vremena i temperature ekstrakcije i sl. Ekstrakcijski uvjeti ne ovise samo o efikasnosti ekstrakcije već i o integritetu izvornih arsenovih spojeva tijekom ekstrakcije. Bitno je obratiti pozornost i na stabilnost arsenovih spojeva u ekstraktu kao i u fazi skladištenja uzoraka. Vrste ekstrakcija mogu biti ultrazvučne, enzimatske, grijanje u vodenoj kupelji, mikrovalna ekstrakcija (Tuzen i sur., 2010.).

Ključni metodološki parametri koji utječu na ekstrakciju i stabilnost specija su: tip otapala, omjer krutina/tekućina, ekstrakcijsko vrijeme i temperatura, tehnika ekstrakcije. Metanol, voda ili mješavina metanola i vode koriste se kod ekstrakcije arsenovih specija topljivih u vodi kod morskih algi i životinja, međutim, kod ekstrakcije anorganskog arsena iz kopnenih životinja nemaju zadovoljavajući učinak. Za takve uzorke preporučuje se sekvencijalna ekstrakcija,

odnosno, ekstrakcija pomoću metanola i vode nakon čega slijedi ekstrakcija razrijeđenom kiselinom. Time se povećava učinkovitost ekstrakcije teško ekstrahirajućih arsenovih specija. Sve se više upotrebljava ekstrakcija mikrovalnom pećnicom, jer daje bolju iskoristivost u odnosu na mehaničku i ultrazvučnu ekstrakciju (Carignan i sur., 2015.).

Arsenove specije poput arsenobetaina i arsenošećera su relativno stabilne za razliku od As(III), As(V), MA(III), DMA(III), As-PC. Postoje primjeri vezani uz problematiku niskog iskorištenja arsenovih spojeva, oksidacije i redukcije između As(III) i As(V) te konverzije organskih specija u anorganske (Tuzen i sur., 2010.). Specijacija arsena u uzorcima hrane iziskuje ekstrakciju pod blagim uvjetima zbog očuvanja integriteta svih arsenovih spojeva.

Brojni su primjeri određivanja arsenovih specija kombinirajućim tehnikama koje osiguravaju učinkovito razdvajanje vrsta s odgovarajućom detekcijom i kvantifikacijom. Ovakve povezane tehnike pružaju visoki stupanj automatizacije, dobru reproducibilnost te nude primjenu u različitim područjima. Većina primjera kombinirajućih tehnika koriste HPLC za odvajanje vrsta, odnosno kombinaciju tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom (HPLC-ICP-MS). Veliki broj studija upotrebljava kolone jakih anionskih izmjena (SAX) i $\text{NH}_4\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, NH_4NO_3 ili NaHCO_3 kao mobilne faze. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s masenom spektrometrijom (HPLC-MS) ili tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s tandem masenom spektrometrijom (HPLC-MS/MS), pogodne su za određivanje arsenovih spojeva u uzorcima koji sadrže složenije spojeve od spojeva anorganskog arsena. Međutim, pokazalo se da nisu prikladne za male molekule kao što su: arsenat, arsenit i njihovi metilirani spojevi.

HPLC-ICP-MS tehnika je najmoćnija metoda za određivanje specijacije arsena s granicama detekcije 0,5 µg/L (B'Hymer i Caruso, 2004.). Prednosti HPLC-ICP-MS tehnike su visoka elementarna specifičnost, mogućnost snimanja real-time kromatograma, sposobnost razdvajanja signala interferencija od određivanog pika, visoki linearni raspon. Međutim, uporaba ICP-MS kao detektora za HPLC dovodi do nekih ograničenja u izboru kromatografskih uvjeta koji se odnose na prirodu i koncentraciju puferских soli mobilne faze i prisutnost organskih otapala. Zbog svoje visoke osjetljivosti ICP-MS može patiti od mnogih izobarnih interferencija prouzročenih pojavama u plazmi ili u uređajima za ekstrakciju iona. Na primjer, prisutnost klora u uzorku može dovesti do stvaranja $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ koji snažno ometa monoizotopni $^{75}\text{As}^+$ (Gray, 1986., Hywel Evans i Giglio, 1993.).

Europska legislativa

Na temelju preporuka Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) Europska Unija definirala je najviši dopušteni iznos od 10 µg/L arsena u vodi namijenjenoj za ljudsku uporabu (WHO, 2011.). Direktiva 2002/32/EC o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje postavila je maksimalnu koncentraciju ukupnog arsena u velikom broju raznih vrsta hrana za životinje (odnosi se na hranu za životinje sa sadržajem vlage od 12%). U Direktivi postoji preporuka kojom koncentracija anorganskog arsena u hrani za životinje ne bi smjele prelaziti granicu od 2 mg/kg, posebno u onoj koja sadrži *Hizikia fusiforme* (European Commission, 2002.). U 2015. godini ažurirana je Uredba 1881/2006 koja se odnosi na najviše dopuštene granice anorganskog arsena u riži i proizvodima na bazi riže i one se kreću u rasponu od 0,10-0,30 mg/kg, ovisno o proizvodu (European

Commission, 2006.). Europska Unija je izdala i preporuke za članice o praćenju arsena u hrani tijekom 2016., 2017. i 2018. godine (European Commission, 2015.). Monitoring bi trebao uključivati širok izbor prehrambenih proizvoda koji odražavaju potrošačke navike uključujući hranu kao što su: žitarice i proizvodi od žitarica, voće, sokove od povrća, vodu za piće, kavu, čaj, pivo, ribu i morsku hranu, proizvode na bazi alga, mlijeko i mliječne proizvode, hranu za dojenčad i djecu i suplemente u cilju omogućavanja precizne procjene rizika.

Ministarstvo zdravstva Kine 2012. godine odredilo je maksimalnu razinu anorganskog arsena u prehrambenim proizvodima, ovisno o vrsti hrane (MOH, 2012.). Standardni kodeks hrane Australije i Novog Zelanda (FSANZ) 2015. godine utvrdio je granicu od 1 mg/kg anorganskog arsena za alge i mekušce dok je za rakove i ribu ne smije prelaziti 2 mg/kg (FSC 96, 2015.).

Posebne uredbe za najviše dopuštene razine anorganskog arsena utvrđene su u pojedinim zemljama; u jestivoj algi 3 mg/kg suhe mase u SAD-u (FDA, 2015.) i Francuskoj (CEVA, 2014.); FDA preporučuje 10 µg/kg anorganskog arsena u pitkoj vodi. Kanadska vlada, putem Health Canade, utvrdila je granicu od 0,1 mg/kg kao maksimalno dopuštenu granicu za arsen u voćnim sokovima i voćnom nektaru (Health Canada, 2014.). Nekoliko nacionalnih inicijativa i vlasti nisu savjetovala konzumaciju rižinih napitaka za novorođenčad i malu djecu jer mogu povećati unos anorganskog arsena. Food Standards Agency Velike Britanije ne preporučuje zamjenu majčinog mlijeka, hrane za dojenčad ili kravljeg mlijeka rižinim napitcima djeci do 4,5 godina starosti (FSA, 2015.), dok Švedska nacionalna agencija za hranu ne preporučuje piće na bazi riže djeci mlađoj od šest godina. U Danskoj djeci

savjetuju ne konzumirati rižine napitke i kekse (Hojsak i sur., 2015.).

Prehrambena izloženost arsena i procjena rizika

Zbog toksičnih učinaka anorganskog oblika arsena 1989. zajednička komisija Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda i Svjetske zdravstvene organizacije (FAO/WHO) postavila je privremeno dopuštenu količinu tjednog unosa (PTWI) za anorganski arsen od 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne mase na dan (European Commission, 2006.). U 2009. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) je napravila procjenu rizika arsena populacije EU u hrani na temelju 100 000 podataka (98% podataka se odnosilo na ukupni arsen). Najviše vrijednosti izmjerene su u ribi i morskim plodovima, suplementima na bazi algi te žitaricama i njezinim proizvodima. Za prosječnog konzumenta izloženost anorganskom arsenu iz hrane i vode procijenjena je na 0,13-0,56 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne mase na dan. Zaključeno je da je i izloženost anorganskom arsenu putem hrane u djece do 3 godine 2-3 puta više nego u odraslih (EFSA, 2009.). U 2014. godini EFSA je evaluirala prehrambenu izloženost anorganskom arsenu u europskoj populaciji i prezentirala podatke o razinama arsena, ukupnog i anorganskog, u hrani europskog tržišta. Baza podataka sastojala se od 103 773 analitičkih rezultata (92,5% odnose se na ukupni arsen) prikupljenih od 21 članice EU. Zaključeno je da je za sve uzraste, osim za dojenčad i malu djecu, glavni doprinos izloženosti hrani pripada skupini prerađenih proizvoda na bazi žitarica (bez riže). Ostale skupine hrane koje su znatno pridonijele izloženosti anorganskom arsenu bile su riža, mlijeko i mliječni proizvodi (glavni doprinos u dojenčadi i male djece) i pitka voda. Srednja prehrambena izloženost među dojenčadi i ostale djece kretala se u

rasponu od 0,20 do 1,37 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne mase na dan. Srednja prehrambena izloženost među odraslom populacijom bila je u rasponu od 0,09 do 0,38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne mase na dan (EFSA, 2014.).

Sažetak

Specijacija metala je važna prilikom istraživanja toksičnosti i bioraspoloživosti elemenata kada je informacija o ukupnoj koncentraciji elementa nedovoljna. Najviše koncentracije ukupnog arsena izmjerene su u sljedećim prehrambenim proizvodima: riba i plodovi mora, proizvodi ili dodaci prehrani na bazi alga (osobito hijiki, *Hizikia fusiformis*), žitarice i proizvodi od žitarica, proizvodi od riže, mekinje i klice. Nisu svi arsenovi spojevi pronađeni u hrani jednako toksični i stoga mjerenje ukupnog sadržaja arsena u hrani ne znači nužno i mogući zdravstveni rizik. Plodovi mora (riba i školjke) sadrže visoke koncentracije ukupnog arsena (do 6 mg/kg mokre mase), no mogu sadržavati gotovo nedetektibilne koncentracije (manje od 0,001 mg/kg mokre mase) anorganskog arsena. U takvima slučajevima je sav arsen prisutan u oblicima arsenobetaina i arsenokolina koji se smatraju netoksičnim. Glavne tehnike koje se koriste za određivanje arsena u biološkim uzorcima su grafitna tehnika atomske apsorpcijske spektrometrije (GF-AAS), induktivno spregnuta optička emisijska spektrometrija (ICP-OES), spektrometrija masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) i atomska apsorpcijska spektrometrija-hidridna tehnika (HG-AAS). Kombinirana tehnika tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom (HPLC-ICP-MS) je najmoćnija metoda za određivanje specijacije arsena u granicama detekcije od 0,5 $\mu\text{g}/\text{L}$. Zbog toksičnih učinaka anorganskog oblika arsena 1989. zajednička komisija Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda i Svjetske zdravstvene organizacije (FAO/WHO) je postavila privremeno dopuštenu količinu tjednog unosa (PTWI) za anorganski arsen od 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m/dan. U 2014. godini EFSA je evaluirala prehrambenu izloženost anorganskom arsenu u europskoj populaciji

i podastrijela informacije o razinama arsena (ukupnog i anorganskog) u hrani europskog tržišta. Zaključeno je da je za sve uzraste, osim za dojenčadi i ostalu djecu, glavni doprinos izloženosti hrani pripada skupini prerađenih proizvoda na bazi žitarica (bez riže). Ostale skupine hrane koje su znatno pridonijele izloženosti iAs bili su: riža, mlijeko i mliječni proizvodi (glavni doprinos u dojenčadi i ostale djece) i pitka voda.

Ključne riječi: arsen, anorganski arsen, specijacija, bioraspoloživost, toksičnost

Literatura

- BENRAMDANE, L., M. ACCOMINOTTI, L. FANTON, D. MALICIER and J. J. VALLON (1999): Arsenic speciation in human organs following fatal arsenic trioxide poisoning - a case report. *Clin. Chem.* 45, 301-306.
- B'HYMER, C. and J. A. CARUSO (2004): Arsenic and its speciation analysis using high performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1045, 1-13.
- CARIGNAN, C. C., K. L. COTTINGHAM and B. P. JACKSON (2015): Estimated exposure to arsenic in breastfed and formula-fed infants in a United States cohort. *Environ Health Perspect.* 123, 500-506.
- CEVA (2014) Centre d'Etude et de Valorisation des Algues. CEVA. "Re'glementation Algues Alimentaires." Pleubian, France: Synthese.
- CLOWES, L. A. and K. FRANCESCONI (2004): Uptake and elimination of arsenobetaine by the mussel *Mytilus edulis* is related to salinity. *A. Comp. Biochem. Phys. C* 137, 35-42.
- COX, P. A. (1995): *The Elements on Earth: Inorganic Chemistry in the Environment.* Oxford: Oxford University Press.
- CULLEN, W. R. and K. J. REIMER (1989): Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.* 89, 713-764.
- PE (2012): Detection limits, Atomic Spectroscopy, A Guide to Selecting the Appropriate Technique and System, Perkin Elmer. Dostupno na: http://www.perkinelmer.com/Technologies/Atomic-Spectroscopy/cat1/NAV_04_TCH_Technologies_001/cat2/NAV_TCH_Atomic%20Spectroscopy_001. Pristupljeno 28.05.2018.
- DE LA CALLE, M. B. BAER, P. ROBOUCH, F. CORDEIRO, H. EMTEBORG, M. J. BAXTER, N. BRERETON, G. RABER, D. VELEZ, V. DEVESA, R. RUBIO, T. LLORENTE-MIRANDES, A. RAAB, J. FELDMANN, J. J. SLOTH, R. R. RASMUSSEN, M. D'AMATO and F. CUBADDA (2012): Is It Possible to Agree on a Value for Inorganic Arsenic in Food? The Outcome of IMEP12. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 2475-2488.
- DADOS, A., E. KARTSIOLU, T. CHATZIMITAKOS, C. PASTEPHANOU and C. D. STALIKAS (2014): In situ trapping of As, Sb and Se hydrides on nanometer-sized ceria-coated iron oxide-silica and slurry suspension introduction to ICP-OES. *Talanta* 130, 142-147.
- DIXON, H. (1997): The Biochemical Action of Arsonic Acids Especially As Phosphate Analogues. *Adv. Inorg. Chem.* 44, 191-227.
- DURAKOVIĆ, Z. i B. LABAR (2000): Hematološke promjene kao posljedice otrovanja. U: *Klinička toksikologija.* Zagreb: Grafos, 83-87.
- DUXBURY, J. M. and G. PANAULLAH (2007):, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, FAO Water Working Paper (28).
- EDMONDS, J. S., K. A. FRANCESCONI and R. V. STICK (1993): Arsenic compounds from marine organisms. *Nat. Prod. Rep.* 10, 421-428.
- EDMONDS, J. and K. FRANCESCONI (1987): Transformations of arsenic in the marine environment. *Cell. Mol. Life Sci.* 43, 553-557.
- EDMONDS, J. S., K. A. FRANCESCONI, J. R. CANNON, C. L. RASTON, B. W. SKELTON and A. H. WHITE (1977): Isolation, crystal structure and synthesis of arsenobetaine, the arsenical constituent of the western rock lobster *Panulirus longipes* cygnus George. *Tetrahedron Lett.* 18, 1543-1546.
- European Commission (2002): Directive (EC) 32/2002 of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on Undesirable Substances in Animal Feed. *OJ EU L140*, 10-22.
- European Commission (2006): Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. *OJ EU L364*, 5-24.
- European Commission (2015): Commission Recommendation (EU) 2015/1381 of 10 August 2015 on the monitoring of arsenic in food. *OJ EU L213*, 9-10.
- EFSA (2009): Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA J.* 7, 1351.
- EFSA (2014): Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA J.* 12, 3597.
- FAO (2002): Food and Agricultural Organization of the United Nations (Ed.). *FAO Rice Information.* Rome.3.
- FDA (2015): U.S. Food and Drug Administration. CFR. Code of Federal Regulations: Title 21 CFR. Volume 3, subchapter B: Food for Human Consumption. Silver Spring, MD, USA: FDA, 2015.
- FRANCESCONI, K. A. (2010): Arsenic species in seafood: origin and human health implications. *Pure Appl. Chem.* 82, 373-381.
- FRAZZOLI, C., M. D'AMATO and S. CAROLI (2007): The determination of chemical elements in food. S. Caroli (Ed.). John Wiley, Hoboken, NJ (383-400).
- FSC 96 (2015): Food Standards. Commonwealth of Australia Gazette. AMENDMENT NO. 154. Australia New Zealand Food Standards Code - Schedule 19 - Maximum levels of contaminants and natural toxicants. Canberra, Australia: Commonwealth of Australia.
- GRAY, A. L. (1986): Mass spectrometry with an inductively coupled plasma as an ion source: the

- influence on ultratrace analysis of background and matrix response. *Spectrochim. Acta.* 41B, 151-167.
28. GREENWOOD, N. N. and A. EARNSHAW (1997): *Chemistry of the Elements*, 2nd ed. Butterworth, Oxford, UK, 548-596 ISBN:0750633654.
 29. Health Canada (2014): Proposed Changes to the Tolerances for Arsenic and Lead in Fruit Juice, Fruit Nectar, Beverages When Ready-To-Serve, and Water in Sealed Containers. Bureau of Chemical Safety. Ottawa, Canada.
 30. HOJSAK, I., CH. BRAEGGER, J. BRONSKY, C. CAMPOY, V. COLOMB, T. DECSI, M. DOMELLO, M. FEWTRELL, N. F. MIS, W. MIHATSCH, CH. MOLGAARD and J. VAN GOUDOEVER (2015): Arsenic in Rice: A Cause for Concern. *JPGN* 60, 142-145.
 31. HYWEL EVANS, E. and J. J. GIGLIO (1993): Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry, a review. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 8, 1-18.
 32. HUGHES, M. F. B. D. BECK, Y. CHEN, A. S. LEWIS and D. J. THOMAS (2011): Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol. Sci.* 123, 305-332.
 33. HUGHES, M. F. (2002): Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 133, 1-16.
 34. KUNITO, T., R. KUBOTA, J. FUJIHARA, T. AGUSA and S. TANABE (2008): Arsenic in marine mammals, seabirds, and sea turtles. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 195, 31-69.
 35. LEERMAKERS, M., W. BAEYENS, M. DE GIETER, B. SMEDTS, C. MEERT, H. C. DE BISSCHOP and R. MORABITO (2006): Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation anvalidation. *Trends Anal. Chem.* 25, 1-10.
 36. LEHMANN, E., A. FOSTIER and M. ARRUDA (2013): Hydride generation using a metallic atomizer after microwave-assisted extraction for inorganic arsenic speciation in biological samples. *Talanta* 104, 187-192.
 37. LIEBL, B., H. MUCKTER, P. T. NGUYEN, E. DOKLEA, S. ISLAMBOULI, B. FICHTL and W. FORTH (1995): Differential-effects of various trivalent and pentavalent organic and inorganic arsenic - Species onglucose-metabolism in isolated kidney-cells. *Appl. Organom. Chem.* 9, 531-540.
 38. LORENZANA, R. M., A. Y. YEOW, J. T. COLMAN, L. L. CHAPPELL and H. CHOUDHURY (2009): Arsenic in Seafood. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15, 185-200.
 39. LUNDE, G. (1968): Analysis of arsenic in marine oils by neutron activation. Evidence of arseno organic compounds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45, 331-332.
 40. MARCUS, Y. (1997): *Ion properties*. Marcel Dekker, New York. pp. 212-219.
 41. MATOUŠEK, T., J. M. CURRIER, N. TROJÁNKOVÁ, R. J. SAUNDERS, M. C. ISHIDA, C. GONZÁLEZ-HORTA, S. MUSIL, Z. MESTER, M. STYBLO and J. DĚDINA (2013): Selective hydride generation-cryotrapping-ICP-MS for arsenic speciation analysis at picogram levels: analysis of river and sea water reference materials and human bladder epithelial cells. *J. Anal. At. Spectrom.* 28, 1456-1465.
 42. MEHARG, A. A., P. N. WILLIAMS, E. ADOMAKO, Y. Y. LAWGALI, C. DEACON, A. VILLADA, R. C. J. CABELL, G. SUN, Y. G. ZHU, J. FELDMANN, A. RAAB, R. ZHAO, S. HOSSAIN and J. YANAI (2009): Geographical variation in total and inorganic arsenic content of polished (white) rice. *Environ. Sci. Technol.* 43, 1612-1617.
 43. MOH (2012): Maximum Levels of Contaminants in Food. Ministry of Health of the People's Republic of China. National Food Safety Standard. GB 2762-2012.
 44. NRIAGU, J. O. (2002): Arsenic poisoning through the ages. In: *Environmental Chemistry of Arsenic* (Frankenberger, W. T. Jr., (Ed.). New York: Marcel Dekker Inc. (1-26).
 45. SCHOOF, R. A., L. J. YOST and J.EICKHOFFETAL (1999): A market basket survey of inorganic arsenic in food. *Food. Chem. Toxicol.* 37, 839-846.
 46. TUZEN, M., K. O. SAYGI KARAMAN and M. SOYLAK (2010): Determination of As(III) and As(V) species in some natural water and food samples by solid-phase extraction on *Streptococcus pyogenes* immobilized on Sepabeads SP 70 and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1393-1398.
 47. WILLIAMS, P. N, A. VILLADA, C. DEACON, A. RAAB, J. FIGUEROLA, A. J. GREEN and J. FELDMANN (2007): Greatly enhanced arsenic shoot assimilation in rice leads to elevated grain levels compared to wheat and barley. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6854-6859.
 48. WHO (2001): Arsenic and arsenic compounds. *Environmental Health Criteria* 224. Geneva, Switzerland.
 49. WHO (2011): Arsenic in Drinking-Water. Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. WHO/SDE/WSH/03.04/75/Rev/1 Geneva, Switzerland.
 50. YANCEY, P. H., M. E. CLARK, S. C. HAND, R. D. BOWLUS and G. N. SOMERO (1982): Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* 217, 1214-1222.
 51. ZHU, J., Z. CHEN, V. LALLEMAND-BREITENBACH and H. THÉ (2002): How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic. *Nat. Rev. Cancer* 2, 705-713.

Arsenic and arsenic speciation in foods, with an accent on inorganic arsenic

Marija SEDAK, PhD, Grad. Food Technology Eng., Bruno ČALOPEK, Grad. Food Technology Eng., Maja ĐOKIĆ, PhD, Grad. Chem. Technology Eng., Nina BILANDŽIĆ, PhD, Grad. Biotechnology Eng., Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute Zagreb, Croatia

Metal speciation is important in the study of element toxicity and bioavailability when information on the total concentration of the element is lacking. The highest total arsenic levels have been measured in the following foods: fish and seafood, products or supplements based on algae (especially hijiki, *Hizikia fusiformis*) and cereals and cereal products, with particularly high concentrations in rice grains, rice-based products, bran and germ. Not all arsenic compounds found in foods are equally toxic, and therefore measuring the total amount of arsenic in food does not necessarily imply a possible health risk. Seafood (fish and shellfish) containing high concentrations of total arsenic (up to 6 mg/kg of wet weight) may contain almost undetectable concentrations (less than 0.001 mg/kg of wet weight) of inorganic arsenic. In such cases, all arsenic compounds presented as arsenobetaine and arsenocholine forms are considered non-toxic. The main techniques used for the determination of arsenic in biological samples are graphite furnace atomic absorption spectroscopy (GF-AAS), inductively coupled optical emission spectrometry (ICP-OES), inductively coupled plasma optical emission

spectrometry (ICP-MS) and hydride technique of atomic absorption spectrometry (HG-AAS). The combined technique of high performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) is the most powerful technique for the determination of arsenic speciation, and has a detection limit of 0.5 µg/L. In 1989, the toxic effects of inorganic arsenic forms led the Joint Commission of Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (FAO/WHO) to set a provisional tolerable weekly intake (PTWI) for inorganic arsenic of 15 µg/kg of body weight per day. In 2014, EFSA evaluated the dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. It concluded that for all age groups except infants and toddlers, the main contributor to dietary exposure to inorganic arsenic is the food group of grain-based processed products (non-rice-based). Other food groups that were important contributors to inorganic arsenic exposure were rice, milk, and dairy products (the main contributor in infants and toddlers), and drinking water.

Key words: *arsenic, inorganic arsenic, speciation, bioavailability, toxicity*