

Arsen – på den fede måde

Arsenolipider – en ny gruppe arsenholdige naturstoffer

Grundstoffet arsen findes i relativt høje koncentrationer i biota fra det marine miljø. I havvand findes arsen primært som uorganisk arsen, der kan optages i fødekæden og biotransformeres til en lang række forskellige kemiske forbindelser

Af Jens J. Sloth^{1,2}, Heidi Amlund², Birgitte K. Herbst¹, Anne-Katrine Lundebye² og Erik H. Larsen¹

¹ Fødevareinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet, Søborg

² Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning (NIFES), Bergen, Norge

I dag er der identificeret mere end 40 forskellige naturligt forekommende vandopløselige arsenforbindelser i det marine miljø. Der kan også findes relativt høje koncentrationer af arsen i fiskeolie, men vores viden om disse arsenholdige lipidforbindelser (arsenolipider) er p.t. begrænset. Det skyldes bl.a., at analysen af arsenolipider er en analytisk udfordring, som der først for nylig er fundet en løsning på. Anvendelse af det nye analytiske værktøj til analyse af arsenolipider i marine olier vil kunne hjælpe os nærmere en opklaring af struktur og kemiske egenskaber for disse nye arsenforbindelser.

Arsen er et grundstof, som introduceres til miljøet fra naturlige kilder som udvaskning af arsenholdige mineraler og vulkansk aktivitet, mens antropogene kilder er ansvarlige for en mindre andel af tilførslen af arsen til naturen. Arsen kan forekomme

i høje koncentrationer i biota fra det marine miljø. I havvand er koncentrationen ca. 1-2 µg As/l, men i marine organismer bioakkumuleres arsen og koncentrationer på over 200 mg As/kg er fundet i visse fiskearter [1]. Der er dog stor variation i arsenkoncentrationerne for forskellige fiskearter som illustreret i tabel 1. Arsen undergår biotransformering i naturen, og det har ført til eksistensen af en lang række naturligt forekommende arsenforbindelser. I dag er mere end 40 forskellige uorganiske og organiske arsenforbindelser blevet identificeret i marine prøver og regelmæssigt rapporteres om fund af nye forbindelser i den videnskabelige litteratur [2]. Disse arsenforbindelser er typisk ekstraheret ud af prøven med vandige ekstraktionsmedier, og det er således vandopløselige forbindelser, forskningen især har fokuseret på. Der kan dog også forekomme relativt høje

koncentrationer af arsen i lipidfasen, men vores viden om til disse fedtopløselige arsenforbindelsers kemiske strukturer og egenskaber, er stærkt begrænset [3].

Hvorfor er mere viden om arsenolipider vigtig?

Det høje koncentrationsniveau af arsen i marine olier kan udgøre et betydeligt bidrag til den totale arsenkoncentration i marine organismer. I fede fisk kan op til en tredjedel af den totale arsenmængde således forefindes som lipidbundne arsenforbindelser. Det er endnu uvist, om disse udgør et fødevaresikkerhedsproblem. Det kan ikke besvares, før man får mere viden om forbindelsernes udbredelse, kemiske strukturer og toksicitet. Hverken nationalt eller på EU-plan er der fastsat grænseværdier for indholdet af arsen i

Prøvetype	Art	Koncentration (mg kg ⁻¹ vv)
Fisk	Laks	0,6 - 4,8
	Torsk	0,4 - 52,4
	Makrel	2,1 - 6,1
	Sild	0,9 - 2,6
	Rokke	118 - 257
Skaldyr	Rejer	13 - 96
	Hummer	36 - 69
	Blåmusling	1,3 - 2,8
	Østers	4,1 - 9,2
	Kammusling	2,1 - 9,4
Alger	Brune	2 - 179
	Røde	0,4 - 45
	Grønne	0,1 - 23

Tabel 1. Arsenkoncentrationer i forskellige marine organismer [1,14].

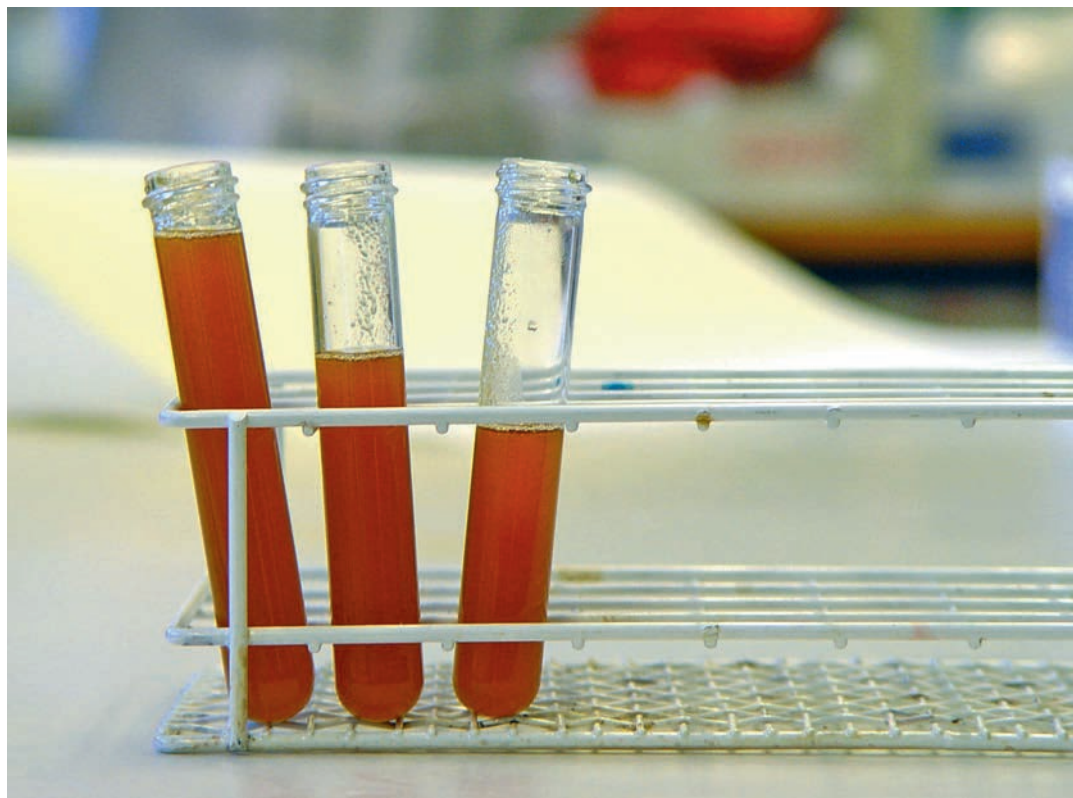
fødevarer. Men for foderstoffer og foderstofingredienser har EU indført maksimalgrænseværdier for total arsen [4]. Hvis et parti overskrider disse maksimalgrænseværdier, kan det ikke omsættes. Der findes tilfælde, hvor fiskeolier til anvendelse i foderstofindustrien har haft arsenkoncentrationer over EU's grænseværdi på 15 mg As/kg [5]. Men eftersom man ikke kender hverken de kemiske strukturer eller toksiciteten af disse forbindelser, er det et spørgsmål, om denne maksimalgrænseværdi er relevant eller ej. Der er derfor stor interesse fra foderstofindustriens side for at få afklaret, om disse arsenolipider er toksiske eller ikke, så grænseværdien kan fastsættes ud fra et bedre og mere velfunderet videnskabeligt grundlag. Hvis det viser sig, at arsenolipiderne ikke er toksiske, bør den eksisterende grænseværdi revurderes, så man undgår uretmæssig tilbageholdelse af industrielle fiskeolier fra foderstofmarkedet.

Fra et biologisk synspunkt er spørgsmålet, hvordan arsenolipiderne dannes i naturen, naturligvis også interessant. I havvand findes arsen primært som uorganisk arsen, der optages af marine planter og dyr og omdannes til organiske former. Der har været flere bud på arsens biotransformationsrute(r) i naturen [6,7], men her har fokus udelukkende været på de vandopløselige forbindelser. Dannelsen af forbindelsen arsenobetain, som typisk udgør >80% af det totale vandopløselige arsen, er specielt interessant. Men hvorledes arsenolipiderne indgår i arsens naturlige biotransformation er endnu uklart. Endvidere dukker spørgsmålet op, hvorfor arsen bliver inkorporeret i lipiderne, og om disse forbindelser har en aktiv biologisk funktion i dyrene?

Men igen, før man kan begynde at forsøge at svare på disse spørgsmål, kræves større viden om udbredelsen og identificering af de kemiske former af arsenolipider. Det bringer derfor i første omgang bolden videre til analysekemikeren for udvikling af analysemetoder til løsning af dette spørgsmål.

Et kort historisk tilbageblik

Arsen blev første gang bestemt i marine organismer i 1890'erne [8], og i perioden 1920-40 blev det klart, at arsen kunne forekomme som organiske forbindelser, såkaldt *fish arsenic* [9]. Lidt senere blev det også klart, at arsen kunne optræde både som vand- og lipidopløselige forbindelser, og det blev rapporteret, at arsenolipiderne i højere grad findes blandt phosphorlipider end blandt de neutrale lipider [10]. I slutningen af 1960'erne og begyndelsen af 1970'erne skrev den norske forsker Gulbrand Lunde en doktorafhandling om bl.a. arsenolipider [11]. Han rapporterede arsenkoncentrationer i fiskeolier på 8-20 mg As/kg og fandt, at der findes flere forskellige arsenolipidforbindelser. Et forsæbningsforsøg viste, at visse arsenolipider følger fedtsyrerne under forsæbningen, mens andre omdannes til vandopløselige forbindelser. Hans arbejde nåede desværre ikke frem til egentlige kemiske strukturer, men blev afbrudt af hans tidlige



Figur 1. Fiskeolier klar til analyse i laboratoriet.
Foto: NIFES.

død i midten af 70'erne. Siden da er der kun udgivet ganske få videnskabelige publikationer om arsenolipider, mens antallet af artikler, som omhandler vandopløselige arsenforbindelser findes i hundredvis.

Analyse af arsenolipider med HPLC-ICPMS

Analyse af vandopløselige arsenforbindelser (specieringsanalyse af arsen) gøres som regel ved brug af HPLC koblet til ICPMS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) som ar-sensspecifik detektor. Typisk anvendes ionbytning eller omvendt fase-kromatografi med vandige mobilfaser til separation af arsenforbindelserne før detektion med ICPMS. F.eks. blev mere end 20 forskellige vandopløselige arsenforbindelser i et ekstrakt fra en kammusling-nyre separeret ved samme metode baseret på gradient eluering i kationbytningskromatografi koblet til ICPMS [12]. Men for at kunne separere de non-polare fedtopløselige arsenlipidforbindelser må man benytte normalfase (NP)-kromatografi, hvor organiske solventer anvendes som mobilfaser. I sin standardopsætning kan ICPMS ikke håndtere disse organiske solventer. Ved for høj belastning med organisk solvent bliver argonplasmaet ustabil og carbon aflejres i instrumentets interface. For nylig publiceredes en metode, som muliggør analyse af arsenolipider ved brug af NP-HPLC-ICPMS [13]. De ændringer, der er nødvendige i forhold til standardopsætningen, er:

- Reduceret prøveflow (40-80 µl/min).
- Anvendelse af udstyr som er kompatibelt med organiske solventer.
- Kontrol af damptrykket vha. køling af spraychamber til -5°C.
- Reduktion af carbon-aflejring på ICP-conerne ved tilsætning af oxygen til carrier gas.
- Anvendelse af torch med lille indre diameter (1,0 mm mod normalt 2,5 mm til vandige prøver).

Før analyse fortyndes olierne med et organisk solvent. Arsenolipidforbindelserne separeres ved brug af normalfase-kromatografi med isokratisk eluering. Udløbet fra den analytiske ►

kolonne kobles med nebuliseren på ICPMS-instrumentet vha. et kort stykke PEEK-slange. ICPMS tunes til m/z 75, som er massen af det monoisotopiske arsen, og et kromatogram optages, hvor hver top svarer til en arsenolipidforbindelse. Figur 2 viser to kromatogrammer af hhv. en blandingsfiskeolie til anvendelse i den marine foderindustri og en hvalolie, som er blevet analyseret ved Fødevareinstituttet i samarbejde med NIFES. Kromatogrammerne antyder tilstedeværelsen af mindst 4 forskellige arsenolipidforbindelser, og at der tydeligvis er forskel på fiskeolien og hvalolien. Analyse med HPLC-ICPMS alene kan ikke give nogen strukturel information, da molekylerne atomiseres i den over 6000K varme argonplasma i ICPMS'en, og derved registrerer detektoren kun tilstedeværelsen af arsen i molekylerne. Således opnås i første omgang kun information om antallet af arsenolipidforbindelser samt delvis også information om forbindelsernes polaritet, hvor de mest polære lipider eluerer senest i kromatogrammet. Der ligger således flere analytiske udfordringer og venter, før de kemiske strukturer af arsenolipidforbindelserne er endelig fastlagt.

Perspektiver for fremtidig forskning i arsenolipider

HPLC-ICPMS-metoder til bestemmelse af arsenolipider er et vigtigt værktøj for at finde frem til antallet af arsenolipidforbindelser, der findes i marine olier. Men det helt store gennembrud i forskningen i arsenolipider kommer imidlertid først, når de kemiske strukturer klarlægges. Her må alternative analysemetoder som kan give information om molekylmasse i brug, f.eks. elektro-spray ionisering tandem masse spektrometri (ESI MS/MS). Når de kemiske strukturer er klarlagt, vil man for alvor kunne videreudvikle de analytiske metoder og indlede kortlægningen af udbredelse og koncentrationsniveauer. Endvidere vil man kunne igangsætte studier af toksiciteten og metabolismen af arsenolipider og øge vores viden om disse forbindelsers rolle i biotransformationen af arsen i naturen. Først da vil man kunne svare på, om tilstedeværelsen af arsenolipider er noget man bør bekymre sig om, når det gælder fødevarer sikkerhed.

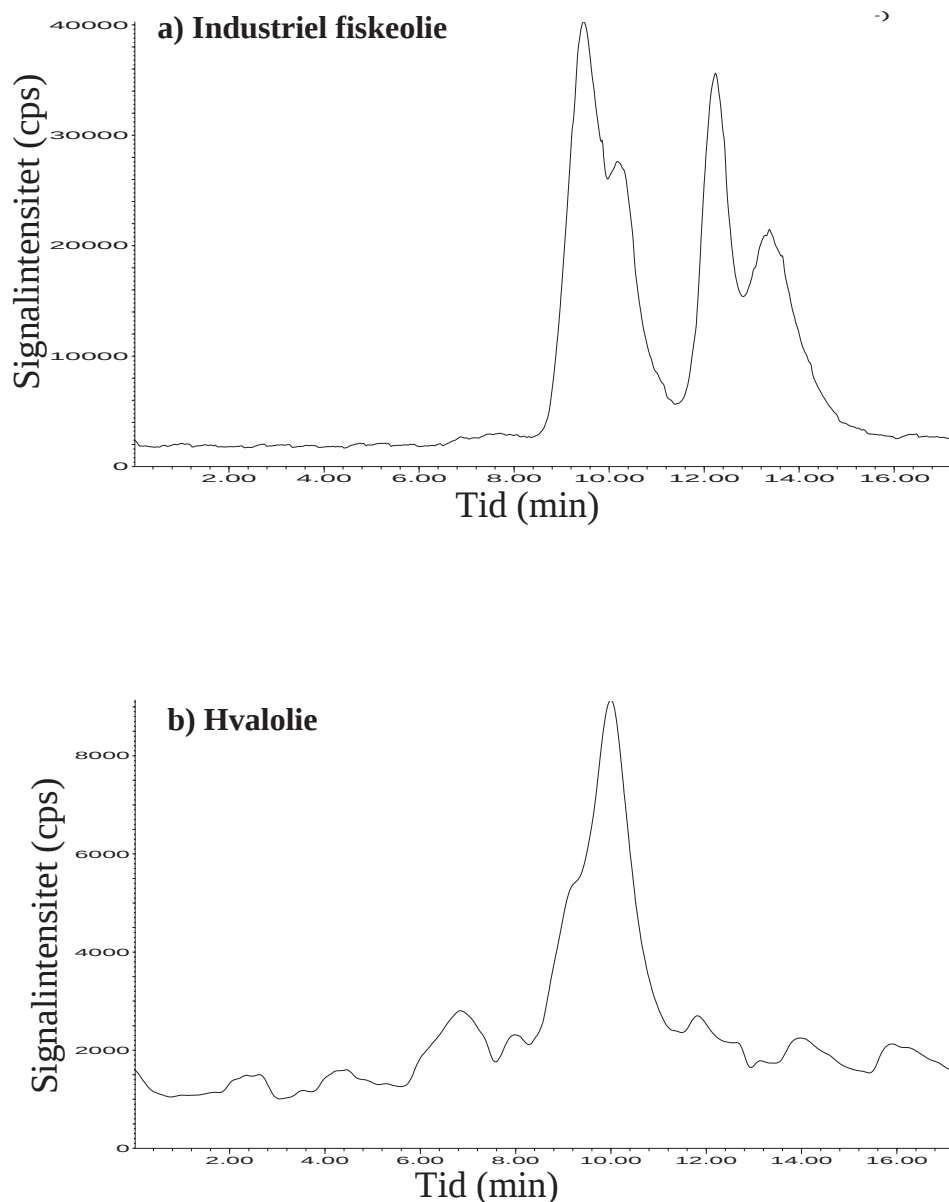
E-mail-adresser:

Jens J. Sloth: jjs@food.dtu.dk

Heidi Amlund: heidi.amlund@nifes.no

Referencer

1. Rokkjær I. and Sloth, J. J., Sporelementer i fisk og fiskevarer, Rapport fra Fødevarestyrelsens overvågningsprogram., 2005. Internet: www.foedevarestyrelsen.dk/Kontrol/Kontrolresultater/CKL-projekter/Sporelementer_tungmetaller/forside.htm



Figur 2. Kromatogrammer fra analyse af fiskeolier. a) Industriel fiskeolie, arsenkoncentration = 10,8 mg As/kg; b) Hvalolie, arsenkoncentration = 2,2 mg As/kg.

2. Francesconi, K. A. and Kuehnelt, D., *Analyst*, 2004, 129, 373-395.
3. Sloth, J. J., Julshamn, K., and Lundebye, A. K., *Aquaculture Nutr.*, 2005, 11, 61-66.
4. EU-direktiv 2003/100/EC af 31. oktober 2003 om uønskede stoffer i dyrefoder.
5. Amlund, H., Sloth, J. J., Berntssen, M. H. G., Haldorsen, A.-K. L., and Julshamn, K., *Norsk Fiskeoppdrett*, 2006, 4, 55-56.
6. Edmonds, J. S. and Francesconi, K. A., *Experientia*, 1987, 43, 553-557.
7. McSheehy, S., Szpunar, J., Lobinski, R., Haldys, V., Tortajada, J., and Edmonds, J. S., *Anal. Chem.*, 2002, 74, 2370-2378.
8. Thiergardt, A., *Über Aufnahme und Ansammlung von Arsen und Blei im Körper der Fische*, Dissertation, 1897. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Germany.
9. Chapman, A. C., *Analyst*, 1926, 51, 548-563.
10. Sadolin, E., *Biochem. Z.*, 1928, 201, 323.
11. Lunde, G., *The Analysis and Characterization of Trace Elements, in Particular Bromine, Selenium and Arsenic in Marine Organisms*, Dissertation., 1973. Central Institute for Industrial Research, Oslo, Norway.
12. Sloth, J. J., Larsen, E. H., and Julshamn, K., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, 18, 452-459.
13. Schmeisser, E., Goessler, W., Kienzl, N., and Francesconi, K., *Analyst*, 2005, 130, 948-955.
14. Sloth, J. J., *Arsenic Speciation Analysis – Development of selective methodologies for the assessment of seafood safety*, Dissertation, 2005. University of Bergen, Norway.