



Gimnazija Novo mesto
Seidlova cesta 9
8000 Novo mesto



IJS Odsek za znanosti o okolju O2
Jamova cesta 39
1000 Ljubljana

ARZEN IN KADMIJ V ŽITNIH PRIPRAVKIH ZA OTROKE OD 6. MESECA DALJE

Raziskovalna naloga s področja kemije in kemijske tehnologije

Avtorica:

Nika Kadunc

Mentorica: dr. Zdenka Šlejkovec

Somentorica: dr. Ingrid Falnoga

Somentorica: mag. Branka Klemenčič

Novo mesto, marec 2023

Izjava

Spodaj podpisana avtorica Nika Kadunc, dijakinja 4. letnika Gimnazije Novo mesto, potrjujem, da je raziskovalna naloga z naslovom

Arzen in kadmij v žitnih pripravkih za otroke od 6. meseca dalje

nastala na podlagi lastnih raziskav pod mentorstvom dr. Zdenke Šlejkovec z Inštituta Jožef Stefan ter somentorstvom dr. Ingrid Falnoga, prav tako z IJS, ter mag. Branke Klemenčič z Gimnazije Novo mesto. Pri tem niso bile kršene avtorske pravice in intelektualne lastnine drugih.

Nika Kadunc

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Nika K.', is placed over a faint, light blue rectangular stamp.

Povzetek

Arzen in kadmij sta dva izmed okoljskih in industrijskih onesnaževal. Ob dolgotrajni previsoki izpostavitvi povzročata številne zdravju škodljive posledice. V naši prehrani so pogost vir teh elementov žitarice, ki jih med procesom rasti absorbirajo v svoj sistem. Med temi še posebej izstopa riž, ki privzema arzen iz prsti v višji meri kot druge žitarice. Pri odraslih je vnos As in Cd le redko problematičen, saj imamo veliko razmerje med telesno maso in količino zaužite hrane. Bolj pa je zaskrbljujoča ta tematika pri dojenčkih in malčkih, ki se šele uvajajo v običajno prehrano. Za normalen razvoj je zelo pomembna zadostna in ustrezna prehrana. Ker otroci na začetku še nimajo dobro razvitega sistema za goltanje, so žitne kaše njihov glavni vir ogljikovih hidratov. Zato je Komisija EU izdala Uredbo Komisije o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih. Količino anorganskega arzena je omejila na 100 ng g^{-1} za »riž za proizvodnjo živil za dojenčke in majhne otroke«, količino kadmija pa na 40 ng g^{-1} za »žitne kašice ter otroško hrano za dojenčke in majhne otroke«.

Naš namen je bil opraviti analizo žitnih pripravkov za otroke od 6. meseca dalje, ki so ponujeni na slovenskem trgu. Celokupni vrednosti arzena in kadmija smo določili z induktivno sklopljeno plazmo z masno spektrometrijo (ICP-MS). Vzorce z največ arzena pa smo nato še analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti s hidridnim generatorjem in atomsko fluorescentno spektrometrijo (HPLC-HG-AFS). S tem smo določili še koncentracije anorganskega arzena (arzenata in arzenita), dimetilarzenove kisline (DMA) in monometilarzenove kisline (MMA). Anorganske arzenove spojine imajo namreč višjo stopnjo toksičnosti, pa tudi Uredba Komisije EU omejuje le koncentracijo anorganskega arzena. Analizirali smo 24 vzorcev, ki so temeljili na različnih žitih (riž, oves, pira, koruza, ječmen, ajda, pšenica, rž, proso ali mešanica teh). Vsi so bili skladni z Uredbo Komisije za anorganski arzen in kadmij. Primerjali smo tudi količine As in Cd glede na vrsto žita in na polnozrnatost izdelka. Pri speciaciji smo opazovali še, katere arzenove spojine so v vzorcih z rižem in brez njega.

Glede na skladnost žitnih izdelkov z Uredbo Komisije EU ti izdelki ne predstavljajo nevarnosti za otroke. Vseeno pa se je smiselno držati smernic za uravnoteženo prehrano, saj z uživanjem raznolike hrane nivo vnosa onesnaževal še zmanjšamo.

Ključne besede: žitni izdelki, dojenčki in majhni otroci, arzen, kadmij, ICP-MS, HPLC-HG-AFS

Abstract

Arsenic and cadmium are two of the environmental and industrial pollutants. With long-term excessive exposure, they cause many adverse health effects. Cereals are a common source of these elements in our diet, which are absorbed into the system during the growth process. Among these, rice stands out in particular, as it absorbs arsenic from the soil to a higher extent than other cereals. In adults, the intake of As and Cd is rarely problematic, since we have a large ratio between body weight and the amount of food consumed. However, this topic is more worrying for babies and toddlers who are just being introduced to a normal diet. Adequate nutrition is very important for normal development. Since they do not have a well-developed swallowing system at the beginning, cereals are their main source of carbohydrates. That is why the EU Commission issued a Commission Regulation on the determination of limit values for certain contaminants in foodstuffs. It limited the amount of inorganic arsenic to 100 ng g^{-1} for “rice for the production of food for infants and young children” and the amount of cadmium to 40 ng g^{-1} for “cereals and baby food for infants and young children”.

Our aim was to analyze cereal preparations for children from 6 months of age, which are offered on the Slovenian market. Total arsenic and cadmium values were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The samples with the most arsenic were then analyzed by high-performance liquid chromatography with a hydride generator and atomic fluorescence spectrometry (HPLC-HG-AFS). We also determined the concentrations of inorganic arsenic (arsenate and arsenite), dimethylarsenic acid (DMA) and monomethylarsenic acid (MMA). Inorganic arsenic compounds have a higher level of toxicity, and the EU Commission Regulation only limits the concentration of inorganic arsenic. We analyzed 24 samples based on different grains (rice, oats, spelled, corn, barley, buckwheat, wheat, rye, millet or a mixture of these). All were compliant with the Commission Regulation for inorganic arsenic and for cadmium. We also compared the amounts of As and Cd depending on the type of grain and the whole grain of the product. During speciation, we also observed which arsenic compounds are present in the samples with and without rice.

Given the compliance of cereal products with the EU Commission Regulation, these products do not pose a risk to children. Nevertheless, it makes sense to adhere to the guidelines for a balanced diet, because by eating a variety of foods, the level of pollutant intake is further reduced.

Key words: cereal products, infants and small children, arsenic, cadmium, ICP-MS, HPLC-HG-AFS

Zahvala

Z izvedbo in pisanjem raziskovalne naloge sem se naučila ogromno novega in dobila neprecenljive izkušnje, ki jih med običajnim srednješolskim poukom ne bi. Zato bi se rada iskreno zahvalila vsem, ki so mi med nastajanjem dela kakorkoli pomagali in mi stali ob strani. Zahvaljujem se:

- mentorici **dr. Zdenki Šlejkovec** – za ponujeno možnost raziskovanja v laboratoriju IJS, za mentorstvo pri laboratorijskem delu in pisanju naloge ter za vzpodbudo in odgovore na vsa moja vprašanja;
- somentorici **dr. Ingrid Falnoga** – za svetovanje pri izvedbi raziskovalnega dela ter za pomoč pri pisanju naloge in analizi meritev;
- somentorici **mag. Branki Klemenčič** – za podporo in vzpodbudo pri delu ter za pomoč pri pisanju naloge;
- **dr. Darji Mazej** – za predstavitev dela z napravo ICP-MS in za pomoč pri izvedbi analize z ICP-MS;
- profesorici **Suzani Krvavica** – za lektoriranje naloge;
- sošolki **Larisi Rataj** – za pomoč pri slogovnem oblikovanju;
- profesorju **Janezu Gorencu** – za lektoriranje angleškega povzetka;
- **Odseku za znanosti o okolju O2 Inštituta Jožef Stefan** – za omogočeno izvedbo eksperimentalnega dela v njihovih laboratorijih;
- **Gimnaziji Novo mesto** in ravnateljici **Mojci Lukšič** – za odobritev raziskovalnega dela.

Ob koncu bi se zahvalila tudi vsem domačim in bližnjim za razumevanje ter podporo med pisanjem naloge.

Kazalo vsebine

Izjava	2
Povzetek	3
Abstract	4
Zahvala	5
Kazalo slik.....	8
Kazalo tabel.....	8
Kazalo grafov	9
Slovar kratic in izrazov	9
1 UVOD	12
2 TEORETIČNI DEL.....	14
2.1 PREHRANA IN POSEBNE POTREBE DOJENČKOV IN MALČKOV	14
2.1.1 Potrebe po energiji in hranilih	14
2.1.2 Prehrana otroka glede na starost.....	16
2.1.2.1 Prehrana do 6. meseca	17
2.1.2.2 Prehrana med 6. in 24. mesecem	17
2.2 POTENCIALNO TOKSIČNI ELEMENTI V PREHRANI	18
2.2.1 Arzen	19
2.2.1.1 Arzen v človeškem telesu.....	19
2.2.1.2 Toksičnost arzena	21
2.2.1.3 Arzen v hrani	23
2.2.2 Kadmij.....	24
2.2.2.1 Kadmij v človeškem telesu.....	25
2.2.2.2 Toksičnost kadmija	26
2.2.2.3 Kadmij v hrani.....	27
2.3 ŽITARICE.....	27
2.3.1 Žitarice kot vir hranil v prehrani	27

2.3.2 Žitarice v obdobju postopnega uvajanja hrane.....	28
3 NAMEN DELA.....	29
3.1 Cilji.....	29
3.2 Hipoteze	29
4 ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI ELEMENTOV IN SPOJIN	30
4.1 Induktivno sklopljena plazma – masna spektrometrija (ICP-MS).....	30
4.2 Speciacija arzena s HPLC-HG-AFS	31
4 EKSPERIMENTALNO DELO.....	33
4.1 Vzorci.....	33
4.2 Pripomočki, reagenti in standardi.....	37
4.2.1 Pripomočki in naprave	37
4.2.2 Kemikalije	37
4.3 Postopek analize vzorcev	38
4.3.1 Priprava vzorcev in mikrovalovni razkroj.....	38
4.3.2 Določitev celokupne koncentracije arzena in kadmija v razkrojenih vzorcih z ICP-MS	40
4.3.3 Določitev arzenovih spojin (speciacija) z uporabo HPLC-HG-AFS	41
5 REZULTATI.....	44
5.1 Standardni referenčni material	44
5.2 Rezultati določitve arzena in kadmija z ICP-MS	45
5.3 Rezultati speciacije arzena s HPLC-HG-AFS.....	49
6 RAZPRAVA	51
7 ZAKLJUČEK.....	54
Literatura	55

Kazalo slik

<i>Slika 1: Časovni trak začetka uvajanja hrane</i>	16
<i>Slika 2: Absorpcija arzenovih spojin v prebavilih</i>	20
<i>Slika 3: Biotransformacija arzenovih spojin v telesu</i>	21
<i>Slika 4: Prenos kadmija po telesu</i>	25
<i>Slika 5: Shema ICP-MS</i>	31
<i>Slika 6: Shema HPLC-HG-AFS</i>	32
<i>Slika 7: Kaša na osnovi riža (vzorec št. 2)</i>	36
<i>Slika 8: Prigrizek na osnovi enega žita – pire (vzorec št. 19)</i>	36
<i>Slika 9: Kaša na osnovi mešanice žit (vzorec št. 7)</i>	36
<i>Slika 10: Prigrizek na osnovi enega žita – koruze (vzorec št. 21)</i>	36
<i>Slika 11: Shema poteka dela</i>	38
<i>Slika 12: Homogeni vzorci pred mikrovalovnim razkrojem</i>	39
<i>Slika 13: UltraWave mikrovalovna pečica s pripravljenimi vzorci</i>	40
<i>Slika 14: Razkrojeni in razredčeni vzorci, pripravljeni za ICP-MS</i>	41
<i>Slika 15: Vzorec po ekstrakciji, centrifugiranju in filtraciji</i>	42
<i>Slika 16: HPLC-HG-AFS za speciacijo arzena</i>	43
<i>Slika 17: Injektor in brizga za injiciranje vzorcev</i>	43

Kazalo tabel

<i>Tabela 1: Količina makrohranil v prehrani otroka</i>	15
<i>Tabela 2: Stopnje minimalnega tveganja za nekatere bolj toksične arzenove spojine</i>	22
<i>Tabela 3: Stopnje minimalnega tveganja za Cd(II)</i>	26
<i>Tabela 4: Osnovni podatki o sestavi žitnih izdelkov **</i>	33
<i>Tabela 5: Referenčne vrednosti v SRM in naše meritve</i>	44
<i>Tabela 6: Rezultati meritev ICP-MS</i>	46

Kazalo grafov

Graf 1: Kromatogram ekstrakta standardnega referenčnega materiala NIST SRM Rice Flour 1568b	45
Graf 2: Količina As in Cd v vzorcih glede na žitno sestavo teh	47
Graf 3: Primerjava količine arzena glede na prisotnost polnozrnatih žit in riža	48
Graf 4: Primerjava količine kadmija glede na prisotnost polnozrnatih žit in riža	48
Graf 5: Primerjava količine arzenovih spojin glede na žitno sestavo vzorca	50
Graf 6: Primerjava deleža anorganskih in organskih arzenovih spojin v izboru vzorcev	50

Slovar kratic in izrazov

- **CDC** (iz ang. »Centers for Disease Control and Prevention«) – ameriški Center za nadzor in preprečitev bolezni
- **ATSDR** (iz ang. »Agency for Toxic Substances and Disease Registry«) – ameriška Agencija za strupene snovi in register bolezni
- **IARC** (iz ang. »International Agency for Research on Cancer«) – Mednarodna agencija za raziskave raka
- **kancerogen I. stopnje** – spojina z dokazano kancerogenostjo za ljudi
- **klasifikacija živil NOVA** – klasifikacijski sistem živil glede na naravo, obseg in namene industrijskih procesov, katerim so ta podvržena
- **PubMed** – iskalni sistem z dostopom do izvlečkov biomedicinskih znanstvenih člankov
- **dojenček** – otrok, star 0–12 mesecev
- **majhen otrok/malček** – otrok, star 1–3 leta
- **OEP** – ocenjena energijska potreba (iz ang. »estimated energy requirement« oz. EER)
- **CEP** – celotne energijske porabe (iz ang. »total energy expenditure« oz. TEE)
- **makrohranilo** – makromolekule, ki jih telo potrebuje v večjih količinah
- **mikrohranilo** – molekule in elementi, ki jih telo potrebuje v manjših količinah
- **ATP in ADP** – adenzin trifosfat in adenzin difosfat
- **ALA, DHA, EPA in LA** – α -linolenska kislina, dokozaheksaenojska kislina, eikozapentaenojska kislina in linolna kislina
- **ZV** – zadostni vnos (iz. ang. »adequate intake« oz. AI)

- **OPP** – ocenjena povprečna potreba (iz. ang. »*estimated average requirement*« oz. EAR)
- **PDV** – priporočen dnevni vnos (iz. ang. »*recommended daily allowance*« oz. RDA)
- **postopno uvajanje hrane** – proces, ki se začne, ko materino mleko samo ni več dovolj za zadovoljitev vseh prehrabnih potreb dojenčka, zato je potrebna druga hrana in tekočine, skupaj z materinim mlekom
- **uvajalna hrana** – trdna hrana in pijače, ki se predstavijo otroku, ko je ta dovolj razvit, da jih lahko zaužije (okoli 6. meseca); pod tem imenom vključujemo otroške žitne kašice, sadje, zelenjavo, meso ter drugo beljakovinsko-bogato hrano, ki je pripravljena tako, da jo otrok lahko varno zaužije (torej je spisirana, filtrirana, narezana ipd.)
- **USDA** (iz ang. »*U. S. Department of Agriculture*«) - Sektor za agrikulturo Združenih držav
- **WIC** (iz ang. »*women, infants and children*«) – ženske, dojenčki in otroci
- **kontaminanti oz. onesnaževala** – snovi, ki niso namenoma dodane hrani ali živalski krmi in so v hrani oz. krmi prisotne zaradi produkcije (živinorejski postopki, poljedelski postopki, veterinarski postopki), proizvodnje, procesiranja, priprave, obdelave, pakiranja ali transportiranja dotične hrane oz. krme ali kot rezultat onesnaženja okolja
- **WHO** (iz ang. »*World Health Organisation*«) – Svetovna zdravstvena organizacija
- **OATPB** – organski polipeptidni prenašalec anionov B (iz ang. »*organic-anion-transporting polypeptide B*«)
- **AQP10** – akvaporin 10 (iz ang. »*aquaporin 10*«)
- **GLUT5** – glukozni transporter tipa 5 (iz ang. »*glucose transporter type-5*«)
- **NaPi2b** – od natrija odvisna beljakovina za prenos fosfata 2B (iz ang. »*sodium-dependent phosphate transport protein 2B*«)
- **As(III)** – arzenit
- **As(V)** – arzenat
- **DMA** – dimetilarzenova kislina
- **MMA** – monometilarzenova kislina
- **iAs in oAs** – anorganski in organski arzen
- **GSH** – glutation
- **SMT** – stopnja minimalnega tveganja (iz ang. »*minimal risk level*« oz. MRL)
- **NOAEL** – stopnja brez opaženih neugodnih učinkov (iz. ang. »*no-observed-adverse-effect level*«)
- **UF** – faktor negotovosti (iz ang. »*uncertainty factor*«)
- **akutna izpostavitve** – obdobje 1–14 dni

- **srednje dolga izpostavitve** – obdobje 15–364 dni
- **kronična izpostavitve** – obdobje minimalno enega leta
- **NADH** - nikotinamid adenin dinukleotid
- **CoA** – koencim A
- **NIP** – nodulinu-26 podobna beljakovina (iz ang. »*nodulin-26-like intrinsic protein*«)
- **DMT1** – prenašalec divalentih kovin 1 (iz ang. »*divalent metal transporter 1*«)
- **MT** – metalotionein
- **Alb** – albumin
- **žito** – katerokoli zrno ali jedilno seme iz družine trav, ki se lahko uporablja kot hrana
- **psevdožita** – rastline, ki so v nasprotju s travami dvokaličnice in ki tako kot prava žita proizvajajo energijsko bogata zrna ali semena
- **ESPGHAN** (iz ang. »*The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*«) – Evropsko združenje za gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano
- **SRM** – standardni referenčni material NIST SRM Rice Flour 1568b (riževa moka)
- **ICP-MS** (iz ang. »*inductively coupled plasma mass spectrometry*«) – masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo
- **HPLC-HG-AFS** (iz ang. »*high performance liquid chromatography with hydride generation and atomic fluorescent spectrometry*«) – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti s hidridno tehniko in atomsko fluorescentno spektrometrijo

1 UVOD

Arzen in kadmij sta predstavnika skupine okoljskih in industrijskih onesnaževal. V živilskih izdelkih se torej pojavljata zgolj nenamerno in lahko potencialno povzročita nevarnost za naše zdravje (Uprava RS za varno hrano, 2020). Ob presežku stopnje minimalnega tveganja pri kronični prehranski izpostavljenosti, ki jo ameriški CDC predpostavlja pri 0,0003 mg/kg/dan za anorganski arzen in 0,0001 mg/kg/dan za kadmij pri izpostavljenosti vsaj eno leto ali več, dopuščamo možnost pojava neugodnih učinkov za kožo pri arzenu in za ledvice pri kadmiju (ATSDR, 2023). Nekateri možni simptomi kronično previsokega vnosa arzena so lahko slabokrvnost, periferna nevropatija, poškodbe ledvic in jeter ter draženje kože in sluznice. Ob previsokem uživanju kadmija lahko pride do bolezni ledvic, osteoporoze, osteomalacije itd. (Patrick, 2003). Mednarodna agencija za raziskave raka IARC oba elementa uvršča tudi med kancerogene skupine 1, torej med snovi, ki v človeku zagotovo povzročajo raka (IARC, 2022).

Arzen in kadmij sta dve od mnogih kovin, ki se v sledovih nahajajo v prsti. Naravno sta tu prisotna že tisočletja, od industrijske revolucije dalje pa se je njuna koncentracija v zemlji zaradi antropogenih dejavnikov ponekod močno zvišala. Višje vsebnosti teh elementov v prsti so lahko problematične, ker imajo nekatere rastline zanje visoko afiniteto in jih vežejo v svoj sistem. V to skupino rastlin spadajo tudi žitarice, ki so pomemben del človeške prehrane (Fowler, et al., 2015) (Nordberg, et al., 2014). Iz njih se med drugim proizvede različne žitne kaše, ki se ob minimalni predelavi po klasifikaciji živil NOVA štejejo med živila skupine 1, torej med industrijsko nepredelana ali minimalno predelana živila. Za to skupino je značilno, da imajo po industrijski obdelavi ohranjeno večino mikrohranil (vitaminov in mineralov), s tem pa posledično tudi onesnaževal (Monteiro, et al., 2019).

Pri odraslih osebah ta problematika ne pride toliko do izraza, saj se prehranjujemo s pestrim izborom živil in bi morali zaužiti ogromne količine hrane z več arzena in kadmija, da bi dosegli mejo kronične ali celo akutne zastrupitve. S to težavo se znanost bolj ukvarja pri prehrani otrok, natančneje pri otrocih, ki se ravno uvajajo v običajno prehrano (torej stari med 6 in 24 mesecev). Pri njih je razmerje med telesno maso in količino zaužite hrane znatno večje, pa tudi izbor njihovih živil je zaradi še nepopolne prilagojenosti na okolje precej selekcioniran (Llorente-Mirandes, et al., 2014). Zato je Komisija EU v 2006 izdala Uredbo Komisije (ES) št. 1881/2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih, v kateri je podala omejitve za različne kontaminante v hrani. Za anorganski arzen je smernice podala naknadno leta 2015, in sicer do 100 ng g⁻¹ za »riž za proizvodnjo živil za dojenčke in majhne otroke«. Leta 2021 je

naknadno še zaostila smernice za kadmij, in sicer do 40 ng g^{-1} za »žitne kašice ter otroško hrano za dojenčke in majhne otroke« (Komisija EU, 2022).

Znanstveniki s področja prehranske analize kemije izmed vseh onesnaževal v žitaricah preučujejo predvsem arzen, natančneje arzen v rižu. Za to žito so namreč ugotovili, da ima višjo afiniteto za arzenove spojine kot ostale žitarice, in hkrati je znanih precej z arzenom onesnaženih območij, kjer se prideluje riž. Medtem ko je povezava med arzenom in rižem že zelo raziskana in utemeljena, pa močno primanjkuje podatkov, kako je z ostalimi vrstami žit. Prav tako se prehranske analize večinoma izvajajo na riževih izdelkih, na živilih iz drugih žit pa so raziskave redke (Fowler, et al., 2015). Obstoječe raziskave s tega področja pogosto merijo in pregledujejo količine arzena v riževih izdelkih za otroke, kot so kaše, vafli, krekerji ... Mnoge se zdijo zelo zaskrbljujoče, saj so analize pokazale, da je kar nekaj vzorcev preseгло omejitev 100 ng g^{-1} . Analiza Andrewa Merhaga in sodelavcev iz leta 2008, ki je pregledovala riževe kaše za otroke, na voljo v britanskem mestu Aberdeen, je v 9 od 17 vzorcev odkrila vsebnost anorganskega arzena nad 100 ng g^{-1} (Meharg, et al., 2008). Desetletje kasnejša raziskava Roxane Guillod-Magnin in sodelavcev, ki je pregledovala riževe izdelke za otroke na švicarskem trgu, je prav tako prišla do zaskrbljujočih ugotovitev. Za riževe otroške kaše so ugotovili srednjo vrednost iAs pri 204 ng g^{-1} , za otroške riževe krekerje pa pri 134 ng g^{-1} (Guillod-Magnin, et al., 2018). To sta le dve od dostopnih analiz s podobnim izidom. Upoštevati moramo tudi, da so smernice EU dokaj nove. Zato je možno, da se v času nastanka teh študij proizvajalcem še ni bilo treba ravnati po njih ali pa do takrat v postopku proizvodnje še niso vpeljali potencialnih sprememb.

Ob pregledovanju zadetkov na spletni strani PubMed (iskalni sistem z dostopom do izvlečkov biomedicinskih znanstvenih člankov) najdemo znatno manj znanstvenih člankov o kadmiju v žitnih izdelkih. Tovrstni podatki bi bili lahko za nas vseeno pomembni, saj bi nam omogočili boljše razumevanje akumulacije onesnaževal in trenutnih vsebnosti kadmija v hrani. Ne glede na to je znano, da nakopičen kadmij najdemo v različnih žitaricah, in sicer predvsem v rižu, čeprav tu v manjši količini kot arzen (TatahMentan, et al., 2020). Za ostala žita, predvsem za pšenico, piro in koruzo, pa obstajajo podatki, da je vsebnost kadmija lahko višja od vsebnosti arzena (TatahMentan, et al., 2020) (Ertl & Goessler, 2018) (Wang, et al., 2017).

Z našo raziskavo želimo doprinesti podatke o vsebnosti arzena in kadmija v žitnih izdelkih za otroke, ponujenih na slovenskem trgu. Poleg ugotovitev, ali so izdelki skladni z Uredbo Komisije (ES) št. 1881/2006, je naš cilj tudi pridobiti podatke o količinah arzena in kadmija v drugih žitaricah, ne le v rižu, ter o vzorcih razporejanja teh elementov glede na sestavo izdelka.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 PREHRANA IN POSEBNE POTREBE DOJENČKOV IN MALČKOV

Otroke, stare med 0 in 12 mesecev, uvrščamo med *dojenčke*, otroke do 3. leta starosti pa med *malčke* oz. *majhne otroke* (CDC, 2021). Ti obdobji sta v otrokovem razvoju najobčutljivejši dobi. V tem času se do konca razvije večina otrokovih notranjih organov (npr. možgani, prebavni trakt, ledvice ...), pride pa tudi do intenzivne rasti. V prvih šestih mesecih se telesna masa otroka podvoji, v prvih dvanajstih mesecih pa potroji. Otrokove energijske potrebe se iz meseca v mesec naglo večajo in spreminjajo. Zato je zelo pomembno, da otrokov razvoj podkrepimo s pravilno in zadostno prehrano, ki bo pokrila njegove energijske potrebe ter mu hkrati ustvarila podlago za zdravo življenje (Institute of Medicine, 2005).

2.1.1 POTREBE PO ENERGIJI IN HRANILIH

Na otrokovo ocenjeno energijsko potrebo oz. OEP (iz ang. »*estimated energy requirement*« oz. EER) vplivata njegova starost in telesna masa. Posredno tako na izračun vpliva tudi otrokov spol, saj so deklice iste starosti v povprečju lažje od dečkov. OEP je vsota celotne energijske porabe oz. CEP (iz ang. »*total energy expenditure*« oz. TEE) in energijskega dodatka, namenjenega otrokovi rasti.

$$OEP \text{ (kcal/dan)} = CEP + \text{energijski dodatek}$$

Glede na navedeno formulo lahko izračunamo energijski vnos za otroke različnih starosti (Institute of Medicine, 2005):

- 0–3 meseci $\rightarrow (89 \times \text{telesna masa [kg]} - 100) + 175$
- 4–6 mesecev $\rightarrow (89 \times \text{telesna masa [kg]} - 100) + 56$
- 7–12 mesecev $\rightarrow (89 \times \text{telesna masa [kg]} - 100) + 22$
- 13–36 mesecev $\rightarrow (89 \times \text{telesna masa [kg]} - 100) + 20$

Seveda pa ni vseeno, iz katerih virov otrok dobi energijo. Pomembno je, da upoštevamo razmerje makrohranil, torej ogljikovih hidratov, beljakovin in lipidov. Ogljikovi hidrati so pomemben vir energije, saj se v jetrih neposredno pretvorijo v glukozo, ki se nato v procesu celičnega dihanja pretvori v molekule ATP. Otroku omogočajo rast in telesno aktivnost. Hkrati pomagajo pri gradnji tkiv in normalni uporabi maščob, gradijo nekatere esencialne spojine ter hranijo živčni sistem in možgane. Večino ogljikovih hidratov dobijo dojenčki iz laktoze, ki se

nahaja v materinem mleku in mleku v prahu. Sčasoma se poveča vnos ogljikovih hidratov iz hrane, torej iz žitaric, sadja, škrobnate zelenjave ipd. Za otrokov razvoj so potrebne tudi vlaknine, ki jih vsebujejo ta živila. Te se v želodcu ne razgradijo in služijo kot prebiotiki, torej kot hrana za črevesno mikrofloro.

Pomembno makrohranilo so tudi beljakovine. Slednje služijo kot gradniki za gradnjo, popravilo in vzdrževanje tkiv (npr. mišice, oči, koža, srce, prebavila ...). So sestavni del mnogih encimov, protiteles, hormonov ipd., hkrati pa tudi regulirajo različne telesne procese. Večino beljakovin dobijo otroci na začetku prav tako iz materinega mleka ali iz mleka v prahu, starejši otroci pa dobivajo beljakovine tudi iz mlečnih izdelkov, mesa, stročnic, jajc ter v manjši meri iz žitaric.

Ostale energijske potrebe zadovoljijo lipidi. Ti telesu predstavljajo vir energije, hkrati pa ustvarjajo mehko oblogo za zaščito organov in ohranjanje telesne toplote. Pomembni so za absorpcijo vitaminov, topnih v maščobah (A, D, E, K). Najpomembnejši lipidi so tisti, ki telo preskrbijo z maščobnimi kislinami skupin omega-3 (ALA, DHA, EPA), omega-6 (LA) in omega-9 (oleinska kislina). Te namreč skrbijo za pravilno delovanje srca in možganov, razvoj oči in vida ter za imunski sistem. Prvi vir lipidov so trigliceridi in fosfolipidi iz materinega mleka ali mleka v prahu, nato pa tudi iz mesa, mastnih rib, rumenjaka, sirov ... (WIC, 2019).

Glede na predhodne študije je ameriški Institute of Medicine pripravil priporočila glede razmerja makrohranil v otrokovi prehrani.

Tabela 1: Količina makrohranil v prehrani otroka

Vir: povzeto iz Institute of Medicine (2005). *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids*.

	Ogljikovi hidrati	Beljakovine	Lipidi
0–6 mesecev	60 g dan ⁻¹ (ZV*)	1,52 g kg telesne mase ⁻¹ dan ⁻¹ (ZV)	31 g dan ⁻¹ (ZV)
7–12 mesecev	95 g dan ⁻¹ (ZV)	11 g dan ⁻¹ (PDV***)	30 g dan ⁻¹ (ZV)
12–36 mesecev	100 g dan ⁻¹ (OPP**)	12 g dan ⁻¹ (PDV)	ni podatka o ZV

* ZV oz. zadostni vnos (iz. ang. »adequate intake« oz. AI)

** OPP oz. ocenjena povprečna potreba (iz. ang. »estimated average requirement« oz. EAR)

*** PDV oz. priporočen dnevni vnos (iz. ang. »recommended daily allowance« oz. RDA)

Vitamine in minerale skupaj uvrščamo pod mikrohranila. To so vsa hranila, ki telesu ne dajejo energije, so pa vseeno esencialna za različne telesne procese. Vitamini so esencialne organske spojine v obliki biološko aktivnih molekul. Delimo jih na dve kategoriji:

- vitamini, topni v maščobi → vitamin A, vitamin D, vitamin E, vitamin K
- vitamini, topni v vodi → vitamin C, vitamin B-kompleks

Njihova glavna funkcija v telesu je, da z uravnavanjem različnih življenjskih procesov (npr. razvoj organov, metabolizem ...) pomagajo pri zagotavljanju homeostaze v telesu.

Minerali pa so esencialni elementi, večinoma v ionski obliki. Pod esencialne minerale štejemo kalcij, železo, cink, fluor, klor, krom, baker, jod, magnezij, mangan, molibden, fosfor, kalij, selen in natrij. Ti v telesu služijo kot elektroliti, gradniki tkiv in kot uravnalci homeostaze (WIC, 2019). Različne minerale in vitamine vsebujejo tudi žitarice.

2.1.2 PREHRANA OTROKA GLEDE NA STAROST

V prvih letih življenja gre otrok skozi tri faze prehranjevanja. Na začetku je njegov edini vir hranil materino mleko. Okoli 6. meseca se začne obdobje postopnega uvajanja hrane. V zadnji fazi začne otrok jesti vso običajno hrano, materinega mleka pa ne potrebuje več. V to obdobje naj bi prišel okoli 2. leta starosti (WIC, 2019).



Slika 1: Časovni trak začetka uvajanja hrane

Vir: <https://www.nestlenutrition-institute.org/resources/infographics/details/complementary-feeding>
(pridobljeno 5. 9. 2022, prevedeno)

2.1.2.1 PREHRANA DO 6. MESECA

Otroško prehrano do 6. meseca starosti naj bi predstavljalo izključno dojenje (iz ang. »exclusiv breastfeeding«). To obdobje se lahko skrajša tudi na samo štiri mesece. Prednost krajšega izključnega dojenja so preprečitev pomanjkanja železa pri otroku, še posebej, če se ta težava pojavlja tudi pri materi (Kramer & Kakumo, 2001). Če otrokov prebavni trakt še ni dovolj razvit, lahko pride do hudih gastrointestinalnih obolenj. Zato se priporoča, da se začne uvajati hrano pri 6. mesecu. Obdobje se lahko maksimalno podaljša za en mesec (Kramer, et al., 2001). Materino mleko je kompleksna biološka tekočina, ki je prilagojena potrebam dojenčka. Njegova sestava se med razvojem spreminja. Prva oblika mleka je sirotki podobna tekočina, s časom pa naraste količina laktoze, oligosaharidov, beljakovin ... Posledično se poveča tudi njegova hranilna vrednost (Andreas, et al., 2015).

2.1.2.2 PREHRANA MED 6. IN 24. MESECEM

Okoli 6. meseca se začne obdobje postopnega uvajanja hrane (iz. ang. »complementary feeding«). Po definiciji Svetovne zdravstvene organizacije iz leta 2002 je to *»proces, ki se začne, ko materino mleko samo ni več dovolj za zadovoljitev vseh prehranskih potreb dojenčka, zato je potrebna druga hrana in tekočine, skupaj z materinim mlekom.«* (Dewey, 2003). Do takrat naj bi bila otrokova prebavila že dovolj razvita tudi za stik s tujimi beljakovinami. To znatno zmanjša možnosti za pojav različnih alergij ob vnosu novih živil. Otrok mora biti tudi sposoben absorbirati hranila, ki niso prisotna v materinem mleku, ter imeti dovolj razvite ledvice, da lahko izločijo tudi večje količine metabolitov. Za samo uživanje hrane so pomembni ustrezno razviti nevromuskularni mehanizmi za prehranjevanje, npr. sposobnost goltanja, držanja žlice ipd. Prva hrana, ki jo otrok zaužije, je uvajalna hrana (iz ang. »complementary food«). Po definiciji USDA je to *»trdna hrana in pijače, ki se predstavijo otroku, ko je ta dovolj razvit, da jih lahko zaužije (okoli 6. meseca). Pod tem imenom vključujemo otroške žitne kašice, sadje, zelenjavo, meso ter drugo beljakovinsko-bogato hrano, ki je pripravljena tako, da jo otrok lahko varno zaužije (torej je spasilana, filtrirana, narezana ipd.).«* (WIC, 2019). Za preprečitev razvoja prehranskih alergij je pomembno, da pogoste alergene (npr. gluten, arašidi, jajca ...) uvajamo že ob začetku te faze. Tako lahko na primer začnemo z glutenom v majhnih količinah že ob 4. mesecu ter s časom povečujemo dnevni vnos. Pomembno je, da v otrokovo prehrano vključimo živila, ki so bogata z železom. Nekaterih živil se je vseeno treba izogibati. Soli in sladkorja naj bi otrok zaužil v zelo majhnih količinah. Prav tako se je treba izogibati medu, saj lahko vsebuje spore bakterije botulina. Otrok ga lahko

normalno uživa po 12. mesecu starosti. V zgodnjem otroštvu se odsvetuje uživanje komarčka, ker lahko vsebuje naravne genotoksične kancerogene. Normalno se ga lahko uživa po 4. letu starosti. Kot uvajalna hrana so manj primerni riževi napitki, saj lahko vsebujejo višje koncentracije anorganskega arzena (Fewtrell, et al., 2017).

2.2 POTENCIALNO TOKSIČNI ELEMENTI V PREHRANI

Poleg makro- in mikrohranil se v hrani nahajajo tudi drugi elementi, ki telesu ne prinašajo nobenega pozitivnega učinka. Nekateri nam lahko celo škodijo. Takim spojinam ali elementom pravimo kontaminanti oz. onesnaževala, kar po definiciji kodeksa Alimentarius zavzema vse snovi, ki »niso namenoma dodane hrani ali živalski krmi in so v hrani oz. krmi prisotne zaradi produkcije (živinorejski postopki, poljedelski postopki, veterinarski postopki), proizvodnje, procesiranja, priprave, obdelave, pakiranja ali transportiranja dotične hrane oz. krme ali kot rezultat onesnaženja okolja.« (WHO Codex Alimentarius Commission, 2015). Med onesnaževala uvrščamo tudi potencialno strupene kovine in polkovine, kot so arzen, kadmij, živo srebro, svinec, kositer, aluminij, antimon, krom in nikelj. V stik s temi lahko pridemo ob vdihavanju zraka, pitju vode ali uživanju določenih živil. Zrak je posebej problematičen na industrijskih območjih ter območjih z veliko prometa. Voda predstavlja velik delež vnosa težkih kovin na območjih, kjer je povečana koncentracija teh v zemlji in kamninah, saj podtalnica prevzame veliko mineralov iz prsti. S hrano lahko zaužijemo prekomerno visoke količine onesnaževal iz različnih razlogov, npr. s selektivno izbiro le nekaterih živil, s posebnim načinom prehranjevanja, ki preferira le ozko skupino živil, ali z naključno izbiro onesnaženih živil. Dojenčke in malčke lahko vnos potencialno strupenih kovin prizadene v večji meri, saj imajo drugačno razmerje med telesno maso in višino. V primerjavi z odraslimi lahko na kilogram telesne mase vnesejo do 2-krat toliko toksičnih elementov iz zraka, do 3-krat toliko iz vode ter do kar 6-krat toliko iz hrane. Do tolikšne razlike pri pitju ter prehranjevanju pride, ker imajo dojenčki višjo stopnjo absorpcije ionov, daljšega zadrževanja hranil v telesu ter večjega vnosa hranil na kilogram telesne mase (Elder, et al., 2015).

2.2.1 ARZEN

Arzen (simbol: As) kot element 15. skupine in 4. periode spada med polkovine. Najraje zavzema valenčna stanja -5, -3, 0 in +3 ter +5. Arzenove spojine delimo na tri skupine:

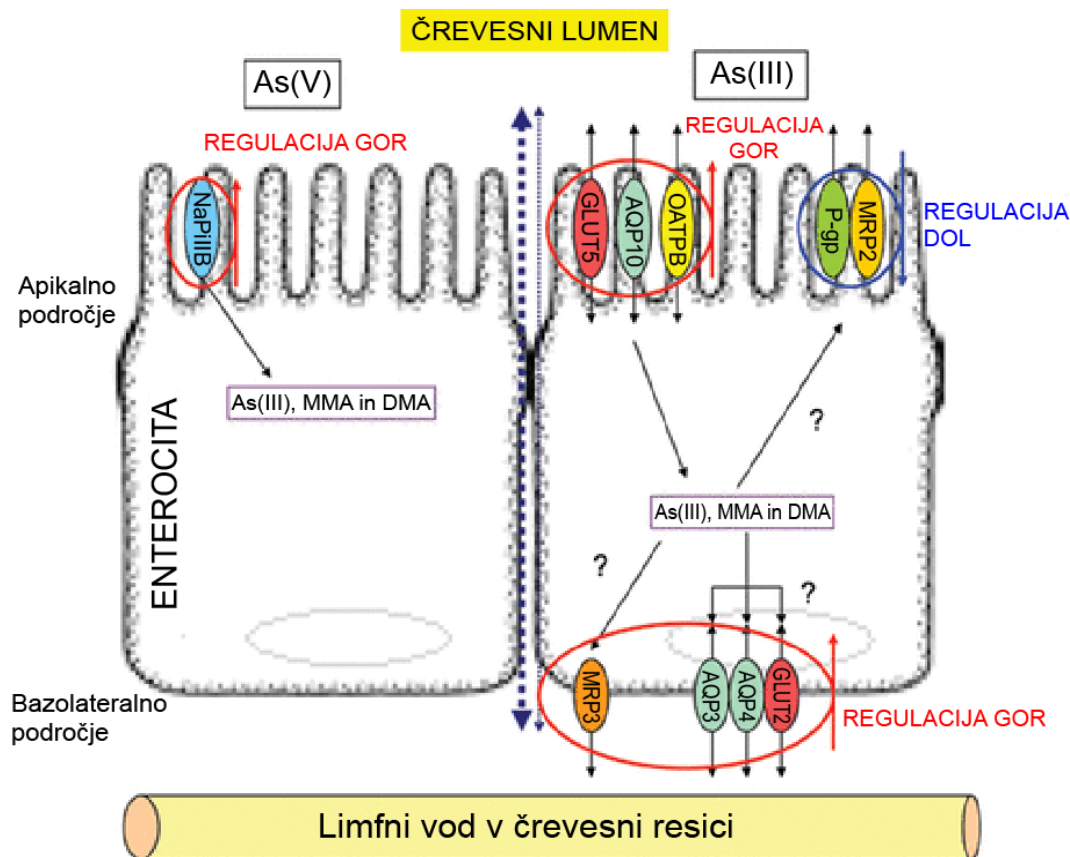
- organske arzenove spojine → monometilarzenova(III in V) kislina (MMA), dimetilarzenova(III in V) kislina (DMA), arzenobetain, arzenoholin, trimetilarzen oksid, tetrametilarzonijev ion, arzenosladorji, arzenolipidi, aminofenilarzenova kislina itd.,
- anorganske arzenove spojine → As_2O_3 , NaAsO_2 , AsCl_3 , As_2O_5 , H_3AsO_4 , arzenati, arzeniti itd.,
- plin arzin (AsH_3).

Zemeljska skorja vsebuje povprečno $3,4 \mu\text{g g}^{-1}$ arzena. Od povprečja močno odstopajo območja rudnikov ali talilnic. Na območju zapuščenega rudnika v Veliki Britaniji so na primer odkrili področje s kar $50\,000 \mu\text{g g}^{-1}$ arzena (Fowler, et al., 2015). Nekatere spojine arzena se uporabljajo tudi kot pesticidi, zato ima lahko zemlja na poljih povišane koncentracije arzena. Takšen primer so riževa polja v ZDA, kjer so včasih gojili bombaž. Ker so pesticidi, s katerimi so škropili polja za bombaž, vsebovala veliko arzena, se je ta kopičil v zemlji in se prenesel na plodove riža, ki ga zdaj gojijo na teh poljih (Williams, et al., 2007). Uporaba arzenovih pesticidov na kmetijskih zemljiščih je v Evropi in Ameriki že nekaj časa prepovedana. Čeprav se zdi problem kontaminacije živil velik, se večina zastrupitev zgodi v nekaj več kot 20 državah, ki so znane po višjih koncentracijah arzena v prsti. Drugod se te zgodijo le redko (Reilly, 2006).

2.2.1.1 ARZEN V ČLOVEŠKEM TELESU

Arzenove spojine, ki so topne v vodi, imajo zelo dobro biorazpoložljivost. Preko prebavnega sistema se v telo absorbira okoli 95 % raztopljenega As(III) in As(V) ter vsaj 75–85 % raztopljene MMA in DMA. Zaenkrat še ni raziskav, ki bi potrdile, da imajo otroci drugačno stopnjo absorpcije arzena kot odrasli (ATSDR, 2007). Prva prepreka v telesu, ki jo mora arzen prečiti, je epitelna membrana tankega črevesa. Skoznjo potuje z aktivnim transportom, glede na raziskavo iz leta 2012 najverjetneje preko transmembranskih beljakovin OATPB (iz ang. »*organic-anion-transporting polypeptide B*« oz. organski polipeptidni prenašalec anionov B), AQP10 (iz ang. »*aquaporin 10*« oz. akvaporin 10) in GLUT5 (iz ang. »*glucose transporter type-5*« oz. glukozni transporter tipa 5) za arzenite ter NaPi2b (iz ang. »*sodium-dependent phosphate transport protein 2B*« oz. od natrija odvisna beljakovina za prenos fosfata) za

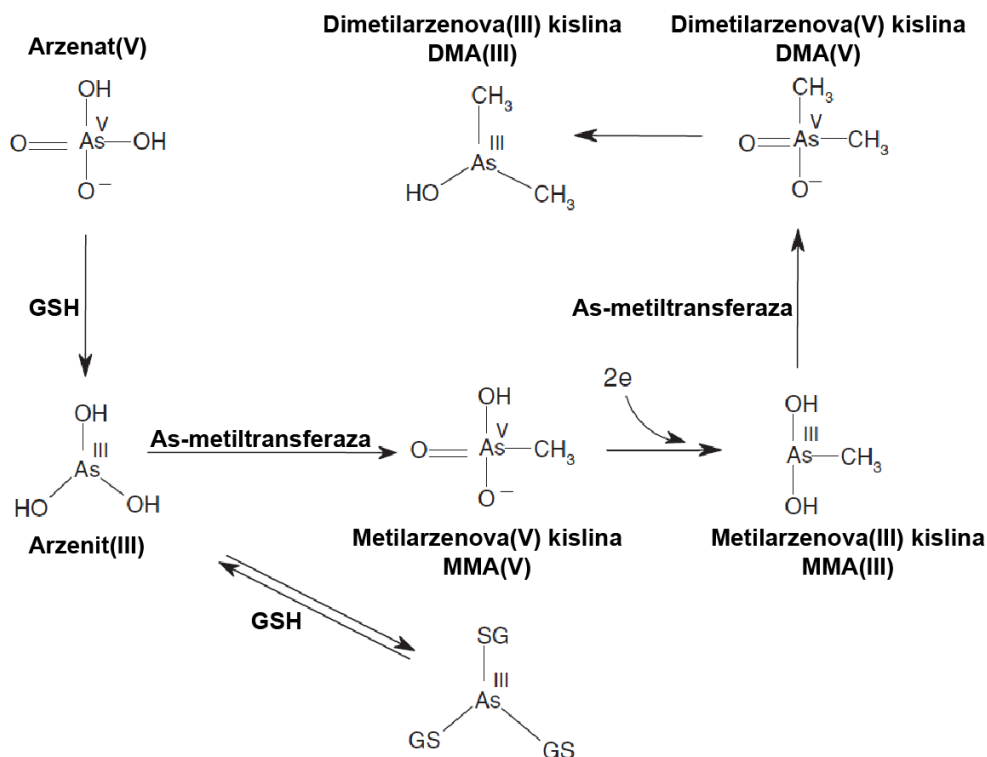
arzenate (Calatayud, et al., 2012). Nazorneje prikazuje prehod iz črevesnega lumna v telesni obtok Slika 2.



Slika 2: Absorpcija arzenovih spojin v prebavilih

Vir: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/tx200491f> (pridobljeno 28. 9. 2022, prevedeno)

Po vstopu v telo se preko krvi razporedi po vsem telesu. Študije na ljudeh in živalih so pokazale, da se arzen najpogosteje začne nalagati v laseh, jetrih, ledvicah in pljučih. Po daljši izpostavitvi se koncentracija izenači v večini organov. V telesu se arzenati in arzeniti hitro presnovijo v druge, manj škodljive spojine. Telo to opravi z dvema mehanizmom biotransformacije, ki ju prikazuje Slika 3 (Fowler, et al., 2015).



Slika 3: Biotransformacija arzenovih spojin v telesu

Vir: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S037842740200084X> (pridobljeno 20. 9. 2022, prevedeno)

Pri vnosu As(V) se ta najprej reducira v As(III) (Fowler, et al., 2015). To reakcijo katalizira antioksidant glutation (oz. GSH), ki s svojo tiolno skupino inducira redukcijo v manj strupeno obliko (Vahter, 2002). Drugi mehanizem je adicija metilnih skupin oz. metilacija arzena do MMA in DMA. Substrat za metilacijo je vedno arzen(III), arzen(V) pa se mora najprej reducirati (Fowler, et al., 2015). Večina metilacije se zgodi v jetrih, kjer arzenit pride v stik z encimi iz skupine metiltransferaze (Vahter, 2002). Pentavalentne metilirane spojine se večinoma izločijo z urinom. Za povprečnega človeka je značilno razmerje med arzenovimi spojinami: 40–75 % DMA, 20–25 % anorganskega arzena (iAs, ki je vsota As(III) in As(V)) ter 15–25 % MMA v urinu. Večina arzena se izloči iz telesa v 1–3 dneh od zaužitja (ATSDR, 2007).

2.2.1.2 TOKSIČNOST ARZENA

Na splošno je arzenu težko določiti stopnjo toksičnosti, ker so njegove spojine škodljive v zelo različnih odmerkih. Precej škodljivejše so anorganske arzenove spojine. V hrani in vodi so to predvsem arzeniti (As(III) oziroma AsO_3^{3-}) in arzenati (As(V) oziroma AsO_4^{3-}). Od organskih

spojin med bolj toksične spadata MMA oz. metilarzenova(III in V) kislina ter DMA oz. dimetilarzenova(III in V) kislina.

Na podlagi podatkov o zastrupitvah z različnimi arzenovimi spojinami je ameriška Agencija za toksične substance in register bolezni izračunala stopnjo minimalnega tveganja oz. SMT (iz ang. »*minimal risk level*« oz. MRL), ki nam pove, koliko snovi lahko zaužijemo brez znatne verjetnosti za negativne nerakaste zdravstvene posledice. Vrednost SMT bazira na pristopu stopnje brez opaženih neugodnih učinkov (iz. ang. »*no-observed-adverse-effect level*« oz. NOAEL) in faktorju negotovosti (iz ang. »*uncertainty factor*« oz. UF). Velja za vse ljudi, tudi za najobčutljivejše. Presežek SMT še ne pomeni gotovih zdravstvenih težav, le višjo stopnjo tveganja za možne negativne učinke, vezane na najobčutljivejše organe. Pri arzenu je to koža (ATSDR, 2007).

Iz Tabele 2 je razvidno, da telo bolje tolerira metilirane oblike arzena v pentavalentni obliki kot anorganske oblike (ATSDR, 2007).

Tabela 2: Stopnje minimalnega tveganja za nekatere bolj toksične arzenove spojine
Vir: povzeto iz Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2007). *Toxicological Profile for Arsenic*

Vrsta	Način vnosa	Izpostavitev*	SMT
iAs	oralno	akutna	0,005 mg/kg/dan
		kronična	0,0003 mg/kg/dan
MMA	oralno	srednje dolga	0,1 mg/kg/dan
		kronična	0,01 mg/kg/dan
DMA	oralno	kronična	0,02 mg/kg/dan

* Akutna izpostavitev je obdobje 1–14 dni, srednje dolga 15–364 dni in kronična minimalno eno leto.

Arzenove spojine se vključijo v telesne procese, saj imajo podobno zgradbo kot nekatere aktivne spojine v teh procesih. Arzenati imajo podobno obliko kot fosfati, zato jih lahko nadomestijo v različnih spojinah in reakcijah. Z glukozo lahko na primer tvorijo spojini glukoza-6-arzenat in 6-arzenoglukanat, ki sta zelo podobni spojinama glukoza-6-fosfat in in 6-fosfoglukanat. Ti sta pomembna dela reakcije, pri kateri nastaja NADH. Reakcijo aktivira encim glukoza-6-fosfat dehidrogenaza. Ker je glukoza-6-arzenat po zgradbi zelo podoben, lahko prav tako deluje kot substrat za ta encim, vendar pa kljub temu prepreči nastajanje NADH.

Fosfati so tudi del natrijevih membranskih črpalk in anionskih transportnih kanalov, zato lahko arzenat moti normalen transport ionov skozi telesne membrane. Ob prisotnosti arzenata lahko v mitohondrijih poteče reakcija arzenoliza, kjer se med oksidativno fosforilacijo na ADP veže arzenat in namesto ATP nastane ADP-arzenat.

Večina karcinogenih in toksičnih učinkov pa je povezana z arzenitom. Ta se zaradi svojih kemijskih lastnosti dobro veže na spojine z eno tiolno (-SH) ali dvema tiolnima skupinama v vicinalnem položaju. Ti funkcionalni skupini sta pogosto aktivni del encimov in transkripcijskih faktorjev, ki jih arzenit s svojo vezavo lahko deaktivira. Neesencialna aminokislina cistein vsebuje tiolno skupino, ki je del beljakovin: keratina, laktalbumina, tripeptida glutationa ... Dve tiolni skupini vsebujejo različni encimi, kot je piruvat dehidrogenaza, ki je pomemben za oksidacijo piruvata v CoA in za nadaljnji potek Krebsovega cikla. Pred učinki arzenita telo ščiti antioksidant glutation (GSH), ki je vir tiolnih skupin, na katere se lahko veže arzenit brez škodljivih posledic za organizem (Hughes, 2002) (ATSDR, 2007) (Fowler, et al., 2015).

Zastrupitve z arzenom delimo glede na odmerke in trajanje izpostavljenosti. Ob kratki izpostavljenosti večjemu odmerku je možna akutna zastrupitev z značilnimi simptomi: slabost, bruhanje, driska ... Lahko privede tudi do kome ali celo smrti. Ob daljši izpostavljenosti manjšemu odmerku tvegamo kronično zastrupitev. Pogosta možna obolenja so: dermalna hiperpigmentacija, bolezen črne noge (bolezen perifernega ožilja, ki povzroči gangreno udov), ciroza jeter, diabetes ..., v najhujšem primeru pa tudi infarkt ali rak (Hughes, 2002). IARC (iz ang. Mednarodna agencija za raziskave rakavih obolenj) arzen označuje kot kancerogen I. stopnje, kar pomeni, da obstaja zadostna količina dokazov za povezavo med rakom in arzenom (Martinez, et al., 2011). Najpogostejše oblike raka zaradi vnosa arzena so: kožni rak, pljučni rak in rak sečnega mehurja, manj dokazov pa je za rakasta obolenja ledvic ali jeter (Fowler, et al., 2015).

2.2.1.3 ARZEN V HRANI

Sledove arzena najdemo v skoraj vsej hrani. Med žitaricami po vsebnosti arzena izstopa riž, ki arzen zelo učinkovito privzema iz prsti. Arzenat v zemlji večinoma najdemo zaradi oksidativnih pogojev, na poplavljenih riževih poljih pa prevladuje arzenit. Prisotne so lahko tudi organske oblike arzena, npr. ob uporabi arzenovih pesticidov ali če so v prsti prisotni mikrobi, ki pretvorijo anorganski arzen v organske arzenove spojine. Arzenat se v riž absorbira preko fosfatnih in silikonskih kanalov, arzenit pa preko NIP (iz ang. »nodulin-26-like intrinsic

protein« oz. nodulinu-26 podobna beljakovina) akvaporinskih kanalov. Riževe rastline dobro privzemajo arzen zaradi svoje visoke afinitete za silikone ter dobre translokacije arzena po rastlini. Največ arzena se nakopiči v stebli in koreninah (Abedi & Mojiri, 2020). Količina arzena v rižu, ki ga kupimo v trgovini, je odvisna predvsem od koncentracije arzena v prsti na riževih poljih, poleg tega pa še od vrste riža, načina pridelave in predelave. Največ ga vsebujeta rjavi riž (okoli 0,350 mg kg⁻¹) in parboiled oz. toplotno obdelan riž (okoli 0,260 mg kg⁻¹), najmanj pa beli basmati riž (okoli 0,05 mg kg⁻¹) (Šlejkovec, et al., 2021).

Glede na Uredbo Komisije (ES) 2015/1006 je v Evropski uniji postavljena meja za količino anorganskega arzena v različnih riževih izdelkih. Za polirani in beli riž (brušeni riž, ki ni predhodno toplotno obdelan) je dovoljena količina iAs do 0,20 mg kg⁻¹, za predkuhani riž in oluščeni riž do 0,25 mg kg⁻¹, za riževe vafle, riževe oblate, riževe krekerje in pecivo iz riževe moke do 0,30 mg kg⁻¹, za riž za proizvodnjo živil za dojenčke in majhne otroke pa 0,10 mg kg⁻¹ (Komisija EU, 2022). Ostale žitarice ne vsebujejo toliko arzena, zato zanje ni posebnih predpisov glede vsebnosti tega elementa. Morska hrana je drugi glavni vir arzena v prehrani. V tej se arzen nahaja pretežno v organski obliki kot arzenobetain in arzenoholin, oblikah, ki zdravju nista nevarni. Manj je prisoten v obliki arzenolipidov in arzenosladkorjev. V manjših količinah lahko z morsko hrano dobimo tudi DMA, ki lahko nastane pri razgradnji arzenosladkorjev in arzenolipidov ter pri pripravi morske hrane, izpostavljene visokim temperaturam, npr. cvrtju (Upadhyay, et al., 2019).

2.2.2 KADMIJ

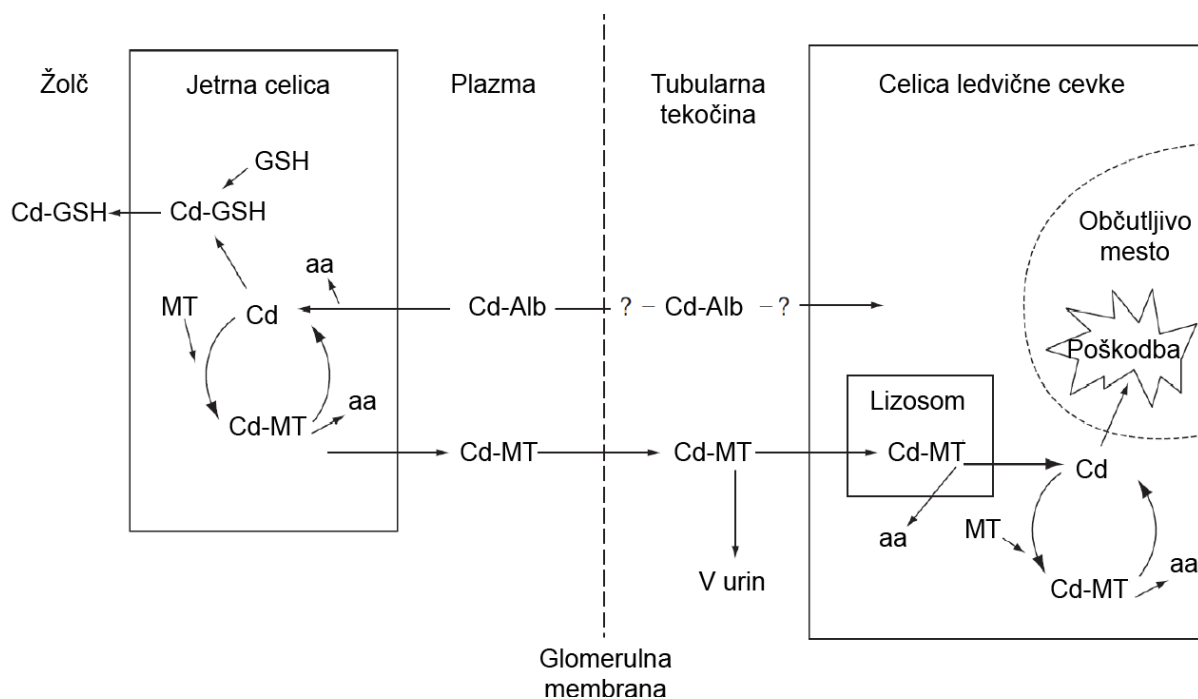
Kadmij (simbol: Cd) je element 12. skupine in 5. periode ter spada med kovine prehoda. Njegovo najpogostejše oksidacijsko stanje je +2. Po Nordbergu in sodelavcih kadmijeve spojine delimo na (Nordberg, et al., 2014):

- organske → kadmijev(II) acetat, kadmijev(II) stearat ...,
- anorganske → kadmijev(II) sulfid, kadmijev(II) sulfoselenid, kadmijev(II) oksid, kadmijev(II) karbonat, kadmijev(II) klorid, kadmijev(II) hidroksid, kadmijev(II) nitrat.

Srednja vrednost kadmija v prsti je 0,2 mg kg⁻¹ (Kubier, et al., 2019). Višje koncentracije kadmija se lahko pojavijo v prsti, bogati s cinkom. Zemlja se lahko onesnaži s kadmijem preko fosfatnih gnojil, ki vsebujejo kadmij, ter preko industrijskih odpadkov in odplak (Khan, et al., 2017).

2.2.2.1 KADMIJ V ČLOVEŠKEM TELESU

Kadmij ima v telesu relativno nizko biološko razpoložljivost. Izvedenih je bilo že več raziskav o absorpciji kadmija v telo. Vse so pokazale delež absorpcije med 5 in 10 % z odstopanji do ± 5 %. Ker ima enak naboj kot železovi ioni, lahko pride do tekmovanja med elementoma za absorpcijo. Zato je možno, da osebe s pomanjkanjem železa iz hrane absorbirajo več kadmija. Po študiji iz leta 1997 imajo osebe s pomanjkanjem divalentnih esencialnih kovin, kot so: Ca, Fe, Zn ... do štirikrat višjo stopnjo absorpcije kadmija kot pri normalnih pogojih (Nordberg, et al., 2014). Majhen delež kadmijevih ionov, ki se absorbira, gre najverjetneje skozi membranski prenašalec DMT1 (iz ang. »*divalent metal transporter 1*« oz. prenašalec divalentnih kovin 1). Po telesu se razširi s krvjo, kjer je večinoma vezan na tiolne skupine v beljakovinah metalotioneinih (oz. MT). To so beljakovine, bogate s cisteinom, ki lahko nase naenkrat vežejo 7 divalentnih ionov. Podobno kot glutation delujejo kot zaščita pred oksidativnim stresom, kot bi ga lahko povzročil prosti kadmij. Nekaj ga potuje tudi vezanega na glutation in albumin (oz. Alb) (Vesey, 2010). Sčasoma se največ kadmija nabere v jetrih in ledvicah, višje koncentracije se lahko pojavijo tudi v trebušni slinavki. Dnevno se izloči zelo malo kadmija – le 0,01–0,02 % celotne količine v telesu. Ker se dobro zadržuje v telesu, ima lahko biološko razpolovno dobo dolgo tudi več 10 let (Nordberg, et al., 2014).



Slika 4: Prenos kadmija po telesu

Vir: Gunnar F. Nordberg, Koji Nogawa, Monica Nordberg. (2014) *Book on the Toxicology of Metals 4th Edition. Chapter 32 – Cadmium* (pridobljeno 1. 11. 2022, prevedeno)

2.2.2.2 TOKSIČNOST KADMIJA

Tudi za kadmij je bila določena stopnja minimalnega tveganja glede na odmerke in trajanje izpostavljenosti. Vrednosti so razvidne iz Tabele 3. Ob presežku SMT za kadmij se najprej poveča verjetnost za obolenja na kosteh (ATSDR, 2012).

Tabela 3: Stopnje minimalnega tveganja za Cd(II)

Vir: povzeto iz Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2012). Toxicological Profile for Cadmium

Vrsta	Način vnosa	Izpostavitev*	SMT
Cd(II)	oralno	akutna	ni gotove vrednosti
		srednje dolga	0,0005 mg/kg/dan
		kronična	0,0001 mg/kg/dan

* Akutna izpostavitev je obdobje 1–14 dni, srednje dolga 15–364 dni in kronična minimalno eno leto.

Kadmij največ škode povzroči predvsem v ledvicah, kjer se kopiči in poškoduje različne funkcionalne dele. V celicah se lahko veže na mitohondrije in omejuje oksidativno fosforilacijo. V prebavnem traktu lahko omeji absorpcijo esencialnih elementov (npr. Zn, Ca, Fe ...), ker se zaradi fizikalno-kemijskih podobnosti lahko veže na iste prenašalce (kompeticija). Posledično vpliva na zmanjšanje kostne mase (pomanjkanje kalcija) in nastanek anemije (pomanjkanje železa) ... (ATSDR, 2012) (Patrick, 2003). Do akutne zastrupitve s kadmijem težko pride z vnosom hrane. Zgodi se le v redkih primerih onesnaženja kuhinjskih pripomočkov ali ob vnosu kadmijevega karbonata pri delu v rudniku. Pri akutni zastrupitvi pride do hitre slabosti in bruhanja, zato se takšna zastrupitev hitro pozdravi, saj se absorbirajo le minimalne količine kadmija. Bolj problematična je kronična zastrupitev z zgoraj opisanimi posledicami (kostne bolezni, anemija). Tovrstne zastrupitve so danes redke, opažene so le v primeru poklicne izpostavljenosti ob neustrezni zaščiti pri delu ali pri okoljski izpostavljenosti pri ljudeh, ki živijo na zelo s kadmijem kontaminiranih področjih. Tudi kadmij se označuje kot kancerogen I. stopnje (Nordberg, et al., 2014).

2.2.2.3 KADMIJ V HRANI

Majhni sledovi kadmija se nahajajo v vsej hrani, vendar nobena vrsta hrane ne izstopa kot večji vir kadmija. Nadpovprečne koncentracije se lahko pojavijo v hrani (npr. v žitaricah, morskih sadežih, gobah, drobovini, kakavu ...), ki je znana po tem, da absorbira več mineralov. Vendar pa bo ta hrana imela povišan nivo kadmija le, če bo vzeta iz onesnaženega okolja. Zato je problem kadmija v hrani aktualnejši za področja Azije in južne Amerike kot za Evropo (Chunhabundit, 2016). Kljub temu je EU z Uredbo Komisije (ES) 2021/1323 postavila mejno vrednost kadmija za različne vrste rastlin in gliv (sadje, lupinarji, korenovke, gomoljnice, čebulnice, plodovke, kapusnice, listnata zelenjava, zelišča, stebelna zelenjava, gobe, stročnice, semena oljnic), kakavovih izdelkov, izdelkov živalskega izvora, formul za dojenčke in majhne otroke, prehranskih dopolnil in žit. Glede žit so postavljene omejitve do $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ za vsa žita, razen za rž in za ječmen do $0,050 \text{ mg kg}^{-1}$; za riž, kvinojo, pšenične otrobe in pšenični gluten do $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$, za trdo pšenico do $0,18 \text{ mg kg}^{-1}$ ter za pšenične kalčke do $0,20 \text{ mg kg}^{-1}$. Posebej so določili tudi mejo za žitne kašice ter otroško hrano za dojenčke in majhne otroke, in sicer do $0,040 \text{ mg kg}^{-1}$ (Komisija EU, 2022).

2.3 ŽITARICE

Glede na definicijo iz Benders' Dictionary of Nutrition and Food Technology so žitarice »katerokoli zrno ali jedilno seme iz družine trav, ki se lahko uporablja kot hrana.« (Bender, 2006). Za svetovno pridelavo hrane so najpomembnejše žitarice: pšenica, riž, koruza, ječmen, oves, rž, proso, sirek in tritikala (McKevith, 2004). Poleg žit se v prehrani pogosto uporabljajo tudi psevdožita, kot so: ajda, kvinoja in amarant. V to skupino uvrščamo vse rastline, ki so v nasprotju s travami dvokaličnice (trave so enokaličnice) in ki tako kot prava žita proizvajajo energijsko bogata zrna ali semena (Schoenlechner, et al., 2008).

2.3.1 ŽITARICE KOT VIR HRANIL V PREHRANI

Žita gojimo poglavitno zaradi njihovih zrn, ki so bogata z makro- in mikrohranili. Od energijskih hranil vsebujejo predvsem ogljikove hidrate (okoli 75 %), nekaj beljakovin (6–15 %) in malo lipidov (1–10 %). V prehrani so pomembna tudi, ker vsebujejo v vodi topne in netopne vlaknine. Vitaminska in mineralna sestava lahko med različnimi vrstami žit močno variira. Večina jih predstavlja dober vir B-vitaminov (tiamin, riboflavin, niacin) ter vitamina E. Z vidika mineralov so dober vir kalija, polnozrnata žita pa vsebujejo tudi veliko železa,

magnezija in cinka. Med žitaricami je posebnost riž, ki vsebuje tudi veliko selena (McKevith, 2004).

2.3.2 ŽITARICE V OBDOBJU POSTOPNEGA UVAJANJA HRANE

V obdobju postopnega uvajanja hrane v prehrano otrok so žitarice z vidika makrohranil pomembne predvsem zaradi njihove visoke vsebnosti ogljikovih hidratov in vlaknin. Vsebujejo tudi visoke koncentracije mikrohranil, torej različnih vitaminov in mineralov. Zaradi hitre rasti in razvoja so potrebe po mikrohranilih zelo visoke in mleko, ki ima le-teh relativno malo, ni več ustrezno kot edini vir prehrane. Ker je količina uvajalne hrane na začetku dokaj majhna, mora biti ta toliko bolj bogata z mikrohranili, kot so na primer žitarice (Dewey, 2003). Glede na sistematični pregled iz leta 2019 pokrijejo žitarice v povprečju 67 % otrokovih potreb po železu ter znaten delež potreb po cinku (Obbagy, et al., 2019). Del beljakovinske sestave žitaric so tudi glutenske molekule, ki so zmes več beljakovin (npr. gluten v pšenici sestavljata glutenin in gliadin), te pa so v sodobni družbi pogost alergen. ESPGHAN (Evropsko združenje za gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano) glede na pregled študij svetuje, da se žitarice otroku predstavi po 4. mesecu starosti, in sicer prvih nekaj tednov v majhnih količinah, nato pa postopoma čedalje več (Fewtrell, et al., 2017). Da bi se izognili preveliki količini glutena, se v prehrani otroka množično uporabljajo pripravki iz riža, ki je ena redkih žitaric naravno brez glutena. Pri tem pa se pojavlja vprašanje varnosti o prekomernem uživanju riževih pripravkov pri otrocih, saj vemo, da med vsemi žitaricami riž vsebuje največjo koncentracijo arzena. O potencialno toksičnih kovinah v žitaricah je objavljeno malo literature, saj so koncentracije težkih kovin v večini žitaric z neonesnaženih področij tako nizke, da jih kljub nizkim mejam detekcije pogosto ne zaznamo (Llorente-Mirandes, et al., 2014). Ker so industrijski prehranski izdelki za dojenčke in male otroke vsaj pod določeno kontrolo, je uporaba le-teh varnejša kot priprava kašic iz kupljenih žit, namenjenih odraslim, za katere so standardne meje za prisotnost onesnažil višje.

3 NAMEN DELA

Namen našega dela je bil določiti masni delež arzena in kadmija v žitnih prehranskih izdelkih za otroke, stare od 6 mesecev dalje, ter zaradi različne biološke aktivnosti posameznih arzenovih spojin določiti vrednosti arzenita (As(III)), arzenata (As(V)), dimetilarzenove kisline (DMA) in monometilarzenove kisline (MMA) v izdelkih z največjim masnim deležem arzena. Glede na dobljene podatke bi nato ocenili, ali so izdelki skladni z Uredbo Komisije EU o določitvi mejnih vrednosti za anorganski arzen (0,1 mg kg⁻¹; Komisija EU 2015/1006) in kadmij (0,04 mg kg⁻¹; Komisija EU 488/2014) v žitnih kašicah ter otroški hrani za dojenčke in majhne otroke.

3.1 CILJI

Pred začetkom dela smo si zastavili naslednje cilje:

- pregledati literaturo na področju otroške prehrane, arzena, kadmija in žitaric;
- zbrati industrijske otroške prehranske izdelke iz žitaric (za otroke od 6. meseca dalje) in ustrezno pripraviti vzorce za kemijsko analizo vsebnosti neželenih kovin;
- določiti koncentracijo arzena in kadmija z induktivno sklopljeno plazmo – masno spektrometrijo (ICP-MS);
- določiti organske in (bolj) strupene anorganske arzenove spojine s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti v kombinaciji s hidridno tehniko in atomsko fluorescenčno spektrometrijo (HPLC-HG-AFS);
- temeljito analizirati pridobljene podatke.

3.2 HIPOTEZE

Po pregledu literature in pred začetkom raziskovanja smo si postavili šest hipotez:

H1: Največ arzena bodo vsebovali izdelki na osnovi riža.

H2: Nobena vrsta žit ne bo izstopala po visokih vrednostih kadmija.

H3: Polnozrnati izdelki bodo vsebovali več arzena in/ali kadmija.

H4: Nekaj izdelkov bo presegalo mejno vsebnosti kadmija ali anorganskega arzena.

H5: Zaradi uveljavljene Uredbe Komisije (EU) 2021/1323 ne pričakujemo močno povišanih koncentracij obeh elementov v izdelkih, namenjenih dojenčkom in majhnim otrokom.

H6: Riževi izdelki bodo vsebovali višji delež organskih arzenovih spojin kot izdelki iz drugih žit.

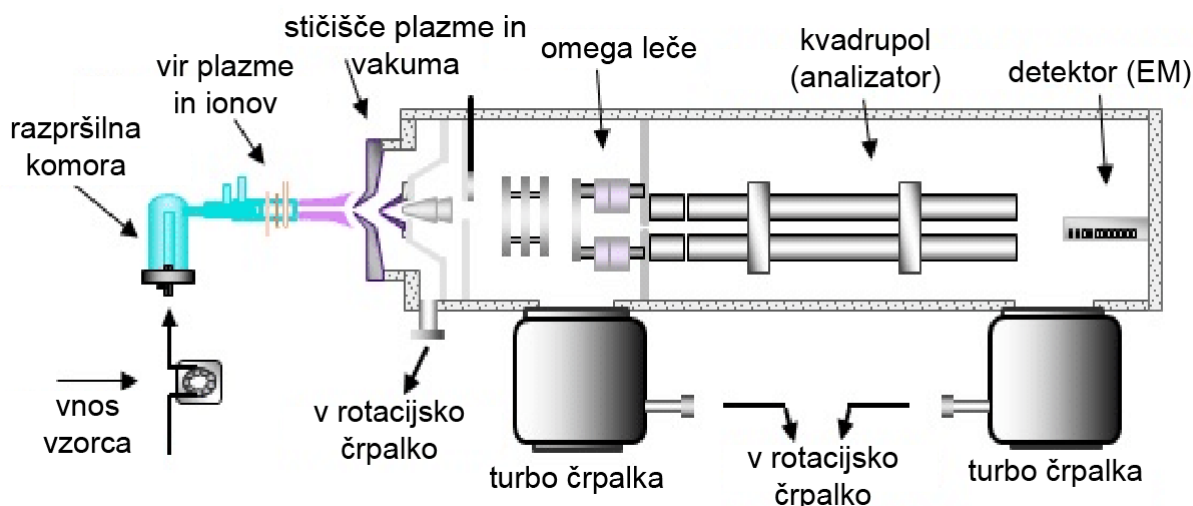
4 ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI ELEMENTOV IN SPOJIN

4.1 INDUKTIVNO SKLOPLJENA PLAZMA – MASNA SPEKTROMETRIJA (ICP-MS)

Masna spektrometrija z ionizacijo v induktivno sklopljeni plazmi (iz ang. »*inductively coupled plasma mass spectrometry*« oz. ICP-MS) je analizna tehnika, ki se uporablja v analizi kemiji za določitev koncentracije različnih elementov v vzorcu. Prednosti te tehnike so, da ima izjemno širok obseg detekcije – od le $0,1 \text{ pg g}^{-1}$ do tudi $1000 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ – ter da lahko zazna skoraj vse različne elemente (razen H in He zaradi premajhne mase, Ar, N in O zaradi prisotnosti v plazmi ter F in Ne, ker se ju v argonu ne more ionizirati) in celo nekatere radiogene izotope. Ta tehnika je popularna, ker omogoča hitro multielementno analizo in jo je možno povezati s speciacijskimi tehnikami.

Homogen tekoč vzorec peristaltična črpalka enakomerno črpa v razpršilnik oz. nebulizer, ki ga razprši v aerosol. V razpršilni komori se kapljice aerosola ločijo po velikosti. Večje se zavržejo, manjše pa v obliki finega aerosola potujejo proti plamenici, kjer se nahaja induktivno sklopljena plazma (oz. ICP). Aerosol z argonom potuje skozi osrednjo cevko, okoli pa sta koncentrično nameščeni cevki s čistim argonom. Induktivna tuljava okoli cevk ustvarja radiofrekvenčno polje, ki vzbuja argon, da preide v plazmo. Ta doseže izjemno visoko temperaturo (tudi do $10000 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Delci aerosola se zato posušijo, razpadejo in disociirajo na posamezne atome, ki so nato ionizirani.

Kvadrupolni masni spektrometer je od plazme ločen z vakuumom. Ioni potujejo preko njega skozi vrsto stožcev, ki usmerijo tok ionov, »ionske« leče, ki odstranijo neionske delce, ter trčne/reakcijske celice, ki odstranijo interferenčne ione. Masni spektrometer (MS) uporablja kvadrupol, ki loči ione glede na razmerje masa proti naboju (m/z). Na koncu je detektor, ki deluje kot elektronski pomnoževalec. Zaradi tega lahko zazna zelo nizko in tudi zelo visoko število ionov neke snovi. Koncentracijo elementa nato določi računalnik s primerjavo intenzitete signala detektorja in predhodne kalibracijske meritve standarda z znano koncentracijo (Agilent, 2023) (Primer, 2005).



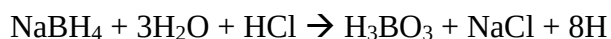
Slika 5: Shema ICP-MS

Vir: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-the-ICP-QMS-quadrupole-mass-analyzer-Agilent-7500a-1_fig1_320566002 (pridobljeno 12. 1. 2023, prevedeno)

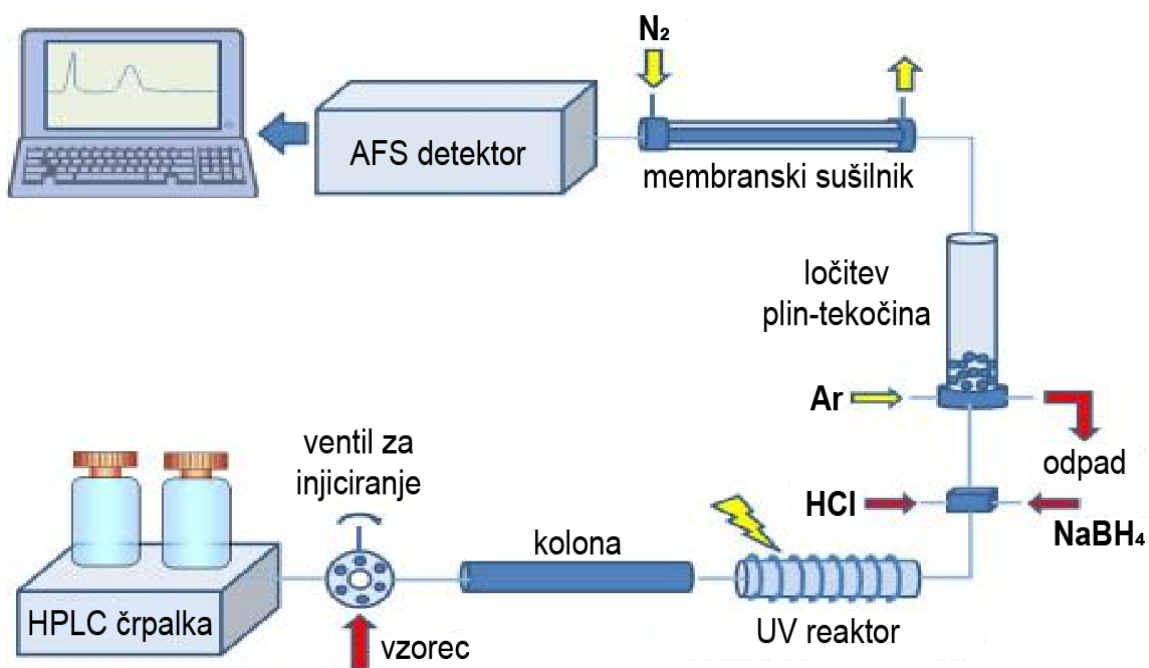
4.2 SPECIACIJA ARZENA S HPLC-HG-AFS

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (iz ang. »*high-performance liquid chromatography*« oz. HPLC) je vrsta kolonske kromatografije, pri kateri mobilna faza prenaša vzorec skozi kolono (stacionarno fazo) pod visokim pritiskom. Tehnika je priljubljena zaradi hitrega delovanja, natančnih rezultatov, nizkih vzdrževalnih stroškov, možnosti analize raznolikih analitov ter zaradi možnosti sklopitve z mnogimi drugimi analiznimi tehnikami. V našem primeru smo HPLC povezali preko hidridnega generatorja (HG) na atomsko fluorescentno spektrometrijo (AFS) (Dong, 2013).

Z brizgo injiciramo vzorec v tok mobilne faze, ki ga enakomerno pod visokim tlakom poganja peristaltična črpalka. Ta teče preko predkolone v anionsko izmenjalno HPLC kolono oz. stacionarno fazo. Polnjena je s pozitivno nabitimi delci iz stabilnega inertnega materiala (polistiren-divinilbenzen) s trimetil amonijevimi funkcionalnimi skupinami, ki privlačijo arzenove spojine. Ker se različne spojine različno dobro vežejo, imajo različne retencijske čase in iz kolone pridejo ločeno. (Blum, 2014) Ob izteku iz anionske kolone se vzorec in mobilna faza mešata s HCl in NaBH₄. Ta v medsebojni reakciji ustvarjata prost vodik, ki se veže z arzenovimi spojinami v ustrezne hidride (AsH₃, dimetilarzin in monometilarzin) (Pohl, 2004).



V separatorju plina in tekočin (gas-liquid separator) se plini ločijo od mobilne baze. Tekoč preostanek se zavrže, pline pa nosilni plin argon dovede v membranski sušilnik, kjer se plini posušijo s tokom dušika. Nato sledi atomska fluorescentna spektrometrija. Posušeni plini se atomizirajo v majhnem difuzijskem plamenu ter pod vplivom arzenove votle katode (iz ang. »*hollow cathode lamp*«) preidejo v vzbujeno stanje. Vzbujeni arzenovi atomi začnejo fluorescirati in oddajati svetlobo specifične valovne dolžine. To zazna fotopomnoževalna cev, ki odda električni signal, ki je premo sorazmeren s koncentracijo arzena v vzorcu (Zou, et al., 2018).



Slika 6: Shema HPLC-HG-AFS

Vir: <https://speciation.net/Public/Document/2012/05/13/6158.html> (pridobljeno 16. 1. 2023, prevedeno)

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 VZORCI

Za analizo potencialno toksičnih elementov v žitnih pripravkih za otroke od 6. meseca dalje smo pripravili izbor otroških prehrambnih izdelkov, ki so ustrezali našim kriterijem in so na voljo v slovenskih živilskih trgovinah (DM, Spar, Müller, Mercator). Da je bil izdelek primeren, je moral temeljiti na žitni osnovi, biti v suhi obliki ter imeti čim manj ostalih sestavin, npr. mleka v prahu, sadja ipd. Torej so v poštev prišle otroške žitne kaše in otroški žitni prigrizki. Ob začetku smo zabeležili vse podatke o naših vzorcih ter jih razdelili v tri kategorije glede na žitno sestavo: riž ($n = 4$), mešanica žit ($n = 9$) in pretežno eno žito ($n = 11$) (Tabela 4). V veliki večini izdelkov je bil delež žit visok, višji od 80 %, razen pri dveh izdelkih s precejšnjim dodatkom mleka v prahu (izdelka št. 10 in 24). V prvo kategorijo smo uvrstili izdelke z rižem brez kakršnegakoli dodatka drugih žit. V drugo kategorijo smo uvrstili izdelke z različnimi mešanicami žit – različne vrste v različnih količinskih razmerjih in različnih oblikah (moka, zdrob, kosmiči). Nabor obsega devet različnih žit: riž, oves, pira, koruza, ječmen, ajda, pšenica, rž in proso. V tretjo kategorijo pa smo uvrstili izdelke z večinoma enim žitom, in sicer piro, koruzo, oves ali pšenico; le v dveh izdelkih je bil dodatek manjše količine riža v obliki sirupa ali moke (izdelka št. 18 in 23). Vključenih je 14 izdelkov s polnozrnatimi žiti (izdelki št. 5–9, 11, 12, 14–20) in en izdelek z naravnim rižem (= nepoliran riž – odstranjen je olup, luske-otrobi z minerali pa ostanejo).

Tabela 4: Osnovni podatki o sestavi žitnih izdelkov **

		Znamka	% vsebnosti žit	Sestava
1	ENO ŽITO - RIŽ	Hipp, Getreidebrei, reis	100 %	riževa moka 100 %
2		Podravka Lino, rižolino	99 %	rižev zdrob 99 %
3		Alnatura, Apfel Mango Reiswaffeln	79,9 %	ekspandiran riž, ekspandiran <i>naraven</i> riž, koncentrat jabolčnega soka 10 %, mangov pire 2,1 %
4		Beauty baby, Bio Mini Reiswaffeln mit banane-Apfel	84,3 %	beli riž, bananin sok 11 %, jabolčni sok 4,7 %

5	MEŠANICA ŽIT	Milupa, Plain cereal, Rice oat organic	98,0 %	riževa moka 59 % , <i>polnoznata</i> ovsena moka 39 %, jagode v prahu
6		Milupa, Plain cereal, 7 grains	95,2 %	<i>polnoznata</i> pšenična moka 84 %, <i>polnoznata</i> ovsena moka 2,7 %, riževa moka 1,7 % , koruzna moka 1,7 %, <i>polnoznata</i> ječmenova moka 1.7 %, <i>polnoznata</i> ržena moka 1,7 %, <i>polnoznata</i> pirina moka 1,7 %, bananini kosmiči, jagode v prahu
7		dm Babylove, Bio Getreidebrei 3-korn	100 %	<i>polnoznata</i> moka 100 % (ovsena, ječmenova, pirina)
8		Hipp, Getreidebrei, 5-Korn	80 %	<i>polnoznata</i> moka 80 % (ovsena, pšenična, ječmenova, pirina, ržena), pšenični zdrob
9		Alnatura, 5-Korn Getreidebrei	80 %	<i>polnoznata</i> ovsena moka 30 %, <i>polnoznata</i> pirina moka 20 %, <i>polnoznata</i> pšenična moka 16 %, <i>polnoznata</i> ržena moka 14 %
10		Podravka, Lino 3 žitarice riž, koruza, ajda	71,4 %	rižev zdrob , koruzna in ajdova moka (skupaj 38 %) delno demineralizirana sirotka v prahu, polnomastno mleko v prahu 26 %, maltodekstrin, posneto mleko v prahu 2,6 %, kalcijev laktat
11		Alnatura Kinder Basis Müsli	96 %	<i>polnoznati</i> pirini kosmiči, <i>polnoznati</i> ovseni kosmiči, pirine puhlice 7 %, pirini kosmiči (pira, riževa moka) – topljivi 5 %, praženi mleti mandlji 4 %
12		Kölln, 5-korn Schmelzflocken, Bio	100 %	<i>polnoznati</i> oves, <i>polnoznata</i> pšenica, <i>polnoznat</i> rž, <i>polnoznat</i> ječmen, <i>polnoznata</i> pira
13		Nutrino 7 grains	54 %	pšenična moka 16 %, riževa moka 13% , koruzna moka 9 %, ajdova moka 8 %, ržena moka 4 %, ovsena moka 3 %, prosena moka 1 %, polnomastno mleko v prahu 34 %, sladkor, inulin

14	ENO ŽITO	dm, Bio, Hirse Getreidebrei	100 %	<i>polnoznati</i> proseni kosmiči
15		dm, Bio, Hirse Getreidebrei	100 %	<i>polnoznati</i> proseni kosmiči
16		dm, Babylove, bio Getreidebrei hafer	100 %	<i>polnoznata</i> ovsena moka 80 %, ovsena moka 20 %
17		Alnatura, Kinder porridge, Hafer & banane	83 %	<i>polnoznati</i> ovseni kosmiči 78 %, pirini topljivi kosmiči 5 %, bananini kosmiči 16 %
18		Alnatura Baby Dinkel – Zwiebeck	> 92 %	pirina moka 82 %, <i>polnoznata</i> pirina moka 10 %, riževa moka , oljčno olje, kvas
19		Alnatura, Mini Dinkel Stangen	90 %	pirina moka 73 %, <i>polnoznata</i> pirina moka 17 %, palmova maščoba
20		Spar natur pur, Bio Volkorn Dinkel Brei	100 %	<i>polnoznata</i> pirina moka
21		Podravka Lino, moj prvi flips	100 %	koruzni zdrob 100 %
22		Babylove Bio Knusperherzen Apfel Mango	81,6 %	koruza 81,6 %, sončično olje, jabolka v prahu 4,8 %, mango v prahu 4,8 %
23		Beauty baby Bio Babykekse	?	pšenična moka, rižev sirup , sončično olje
24		Podravka Lino, Baby keksiči	?	pšenična moka, sladkor, maslo, dekstroza, polno mleko v prahu, sončično olje

** riž je označen z **odebeljenim** zapisom, polnoznatost oz. nepoliranost pa z *ležečim*

Glede na navedbe iz deklaracij žitnih izdelkov smo vzorce ločili še na polnoznatost in prisotnost riža. Razdelili smo jih na 4 kategorije:

- prisotnost riža – vzorci št. 1, 2, 3, 4, 10, 13;
- prisotnost riža in polnoznatega žita – vzorca št. 5, 6;
- prisotnost polnoznatega žita – vzorci št. 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20;
- ni prisotnosti riža in polnoznatega žita – vzorci št. 21, 22, 23, 24.



Slika 7: Kaša na osnovi riža (vzorec št. 2)

Vir: Nika Kadunc



Slika 9: Kaša na osnovi mešanice žit (vzorec št. 7)

Vir: Nika Kadunc



*Slika 8: Prigrizek na osnovi enega žita – pire
(vzorec št. 19)*

Vir: Nika Kadunc



*Slika 10: Prigrizek na osnovi enega žita –
koruze (vzorec št. 21)*

Vir: Nika Kadunc

4.2 PRIPOMOČKI, REAGENTI IN STANDARDI

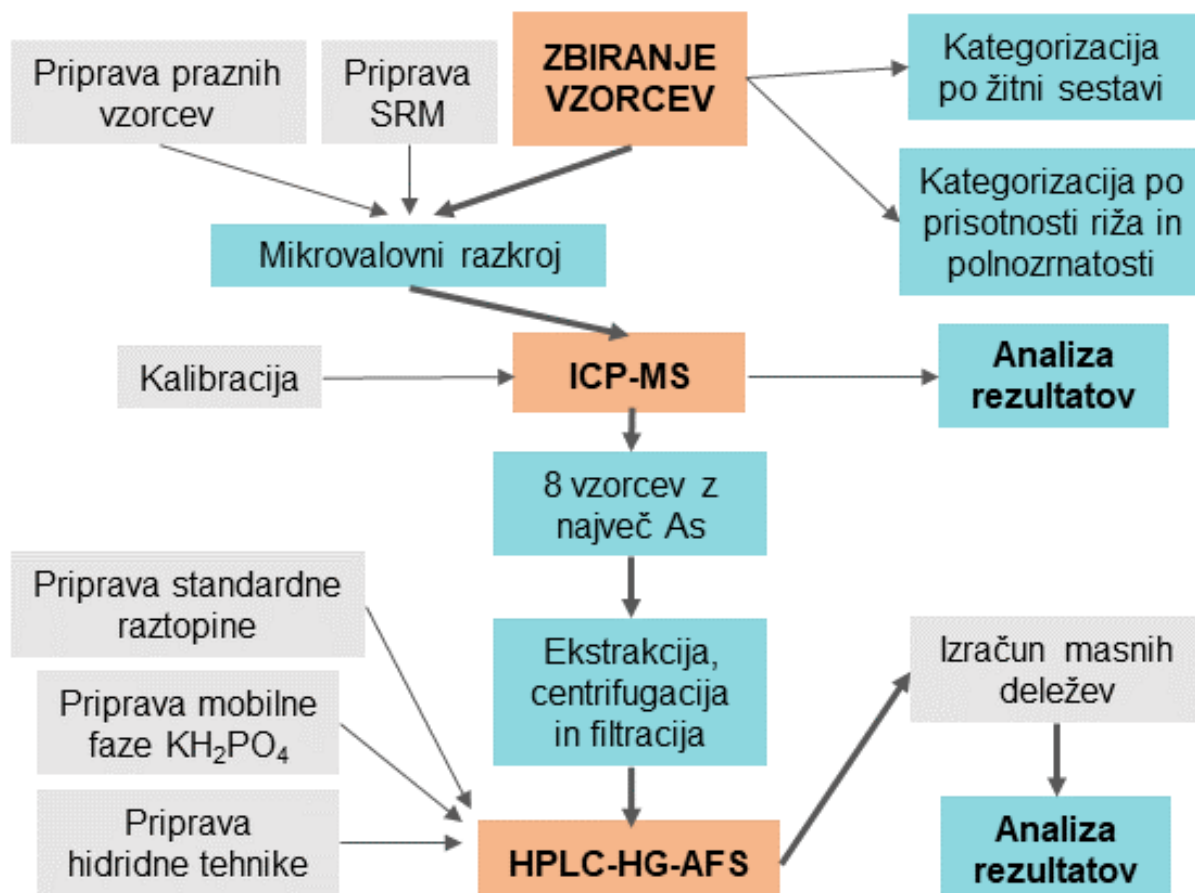
4.2.1 PRIPOMOČKI IN NAPRAVE

- kavni mlinček
- kvarčne epruvete s teflonskimi pokrovčki
- pipetor
- plastične vial s pokrovčki
- analitska tehtnica (Mettler Toledo)
- centrifuga (Tehtnica, Železniki)
- membranski filtri Milipore s porami velikosti 0,45 μm
- pH meter (Mettler Toledo)
- injekcijske brizge za filtracijo in za injiciranje vzorcev
- UltraWave mikrovalovna pečica (UltraVawe, Milestone, Italija)
- HPLC-HG-AFS (PSA 10.055 Millennium Excalibur z modulom PSA 10.820 Modular Interface) z anionsko izmenjalno kolono Hamilton PRP-X100 (4,1 x 240 mm)
- ICP-MS (Agilent 8800)

4.2.2 KEMIČALIJE

- etanol
- HNO_3 (Suprapur)
- Milli-Q destilirana voda
- 1 % raztopina HNO_3 (Suprapur, 0,28 M)
- vroča voda (92 °C)
- 20 mmol L^{-1} KH_2PO_4 , pH 6,1
- 0,7 % raztopina NaBH_4 v 0,1 % raztopini NaOH
- raztopina HCl (125 ml L^{-1})
- standardne raztopine As(III), DMA, MMA in As(V) (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) ter celokupnega As in Cd (1000 mg mL^{-1})
- standardni referenčni material (NIST SRM Rice Flour 1568b)

4.3 POSTOPEK ANALIZE VZORCEV

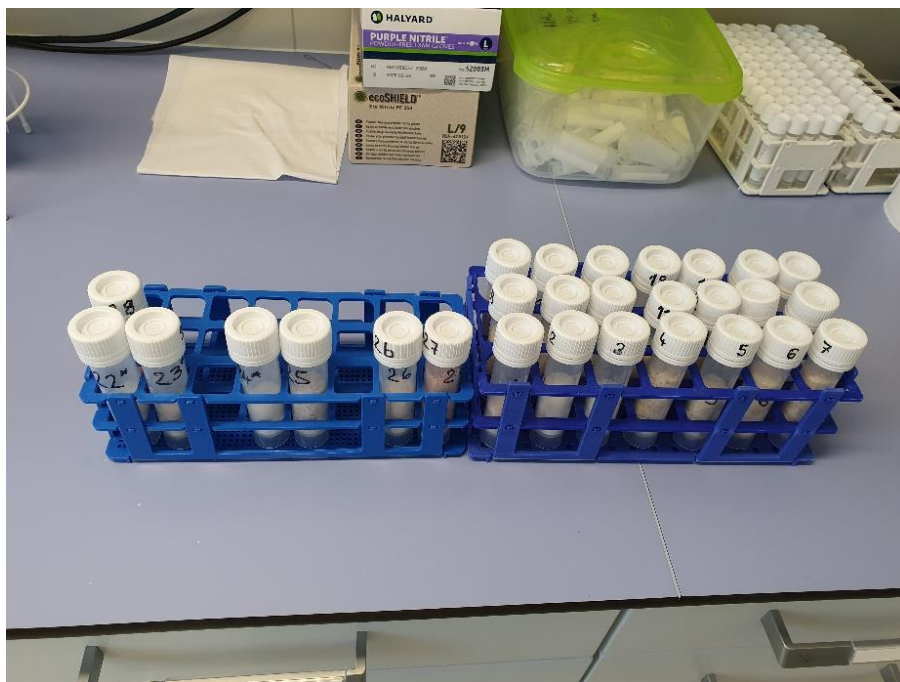


Slika 11: Shema poteka dela

Vir: Nika Kadunc

4.3.1 PRIPRAVA VZORCEV IN MIKROVALOVNI RAZKROJ

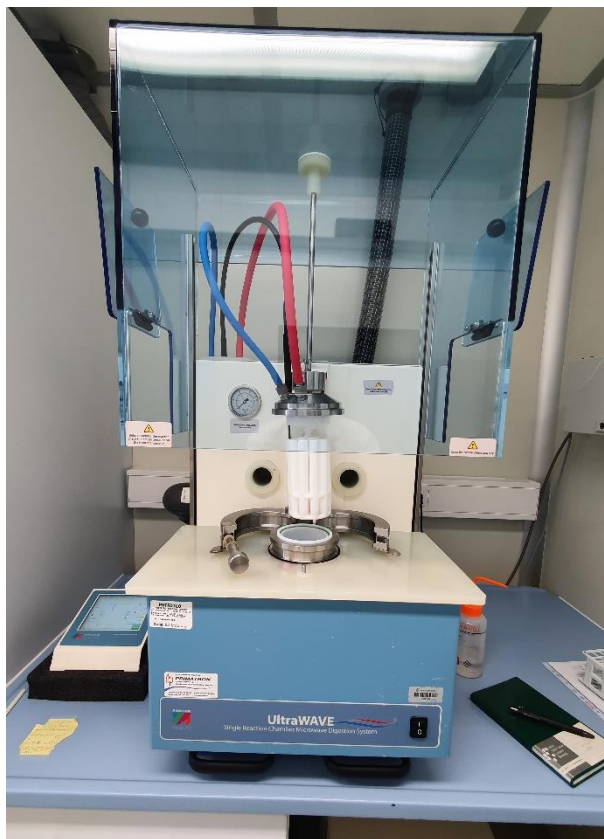
Vzorci v obliki kosmičev smo uporabili za analizo brez predhodne priprave. Vzorce, ki so bili v koščkih (npr. kekse), smo zmleli v kavnem mlinčku do homogene mase. Mlinček smo pred vsakim vzorcem ustrezno očistili z etanolom in ga osušili do suhega.



Slika 12: Homogeni vzorci pred mikrovalovnim razkrojem

Vir: Nika Kadunc

V teflonske epruvete smo zatehtali 150–200 mg vsakega vzorca in dodali 0,5 mL HNO_3 (Suprapur). Vzorec št. 9 smo pripravili v 4 paralelkah. Epruvete smo zaprli s teflonskimi pokrovčki in vzorce razkrojili v mikrovalovni pečici pod visokim tlakom. Program razkroja je obsegal postopno segrevanje do 240 °C v 20 min. in nadaljnje segrevanje pri tej temperaturi še 20 min. Po razkroju smo vzorce ohladili in razredčili z Milli-Q vodo do 5 ali 10 mL. Pri vsakem razkroju smo poleg 10–11 vzorcev razkrojili še dva standardna referenčna materiala ter 2–3 slepe vzorce (epruvete brez vzorca, ki vsebujejo samo vse potrebne kemikalije).

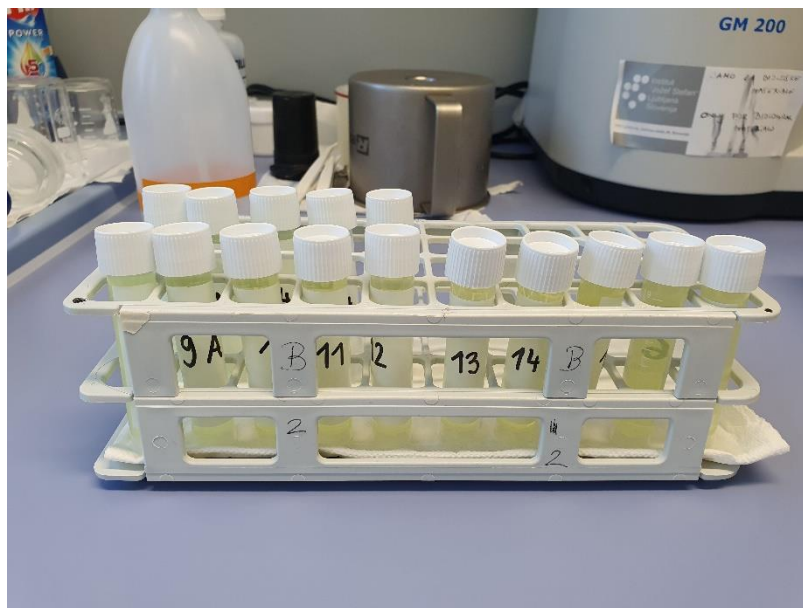


Slika 13: UltraWave mikrovalovna pečica s pripravljenimi vzorci

Vir: Nika Kadunc

4.3.2 DOLOČITEV CELOKUPNE KONCENTRACIJE ARZENA IN KADMIJA V RAZKROJENIH VZORCIH Z ICP-MS

Plastične vialle z razkrojenimi vzorci, standardnim referenčnim materialom in slepimi vzorci smo v posebnih stojalih vložili v avtosampler. Pripravili smo tudi raztopine standardov arzena in kadmija v koncentracijah od 0 do 100 ng mL⁻¹, ki smo jih potrebovali za kalibracijsko krivuljo. Izmerjeno število ionov pri vsaki karakteristični masi (75 za As in 111 za Cd) je proporcionalna koncentraciji elementa v vzorcu, ki jo razberemo iz kalibracijske krivulje.



Slika 14: Razkrojeni in razredčeni vzorci, pripravljeni za ICP-MS

Vir: Nika Kadunc

4.3.3 DOLOČITEV ARZENOVIH SPOJIN (SPECIACIJA) Z UPORABO HPLC-HG-AFS

Glede na rezultate pri analizi z ICP-MS smo izbrali vzorce z najvišjo celokupno vrednostjo arzena, in sicer vzorce številka 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9 in 10. V plastične vialle smo zatehtali 600–700 mg vsakega vzorca. Vzorec št. 2 smo pripravili v 3 paralelkah. Pripravili smo tudi 3 vzorce referenčnega materiala. Za ekstrakcijo arzenovih spojin smo dodali po 6 mL 1 % raztopine HNO_3 . Sledila je ekstrakcija tekoče-trdno v vodni kopeli, in sicer okoli 1 uro pri 92 °C. Vzorce smo nato centrifugirali po 5 minut na 3000 obratih ter jih filtrirali z membranskim filtrom. Do meritve s HPLC smo jih hranili v hladilniku.



Slika 15: Vzorec po ekstrakciji, centrifugiranju in filtraciji

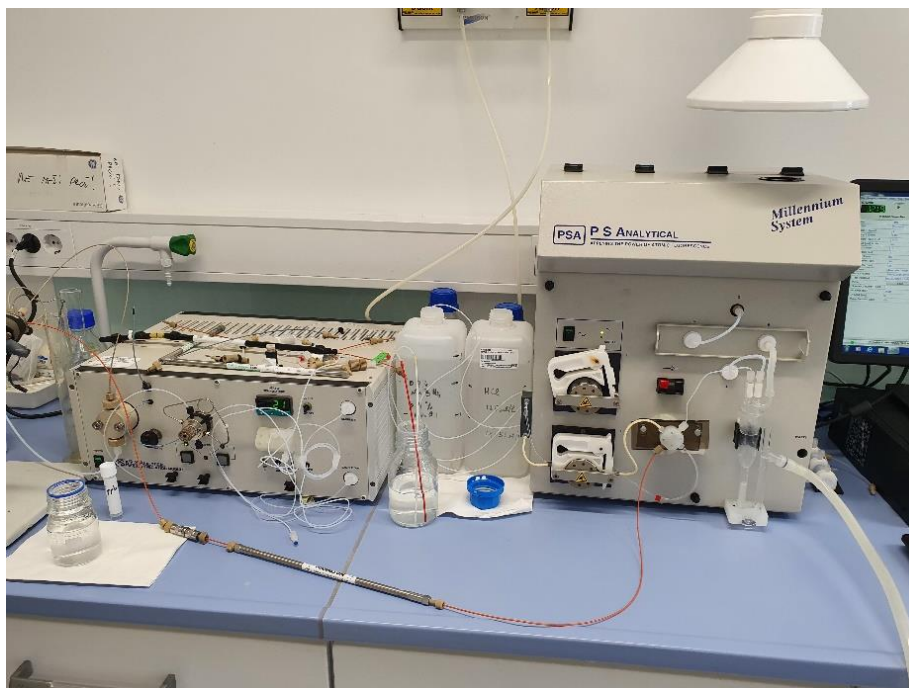
Vir: Nika Kadunc

Za mobilno bazo smo pripravili 2 litra 20 mM raztopine KH_2PO_4 s pH 6,1. Za hidridno tehniko smo pripravili 2 litra mešanice 0,7 % raztopine NaBH_4 in 0,4 % raztopine NaOH ter 2 litra 125 mL L^{-1} raztopine HCl . Za umeritev inštrumenta smo pripravili mešanico standardov iz 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ raztopin As(III) , DMA , MMA in As(V) . Vsako smo odpipetirali po 0,1 mL ter mešanico razredčili do 10 mL z Milli-Q vodo. Dobili smo mešanico s koncentracijo 100 ng mL^{-1} . Za umeritev smo po 1 mL pripravljenega standarda razredčili na 10 mL, da je raztopina vsebovala po 10 ng mL^{-1} vsake spojine. Tudi standard smo do uporabe hranili v hladilniku.

V napravo smo injicirali po 0,05 mL vzorca. Začeli smo s tremi odmerki standarda, da smo napravo umerili. To smo nato ponovili na vsakih 6 meritev. Vsak vzorec smo izmerili dvakrat. Z računalniškim programom smo izmerili površine vrhov posameznih arzenovih spojin ter iz njih izračunali koncentracije teh spojin, in sicer po formuli:

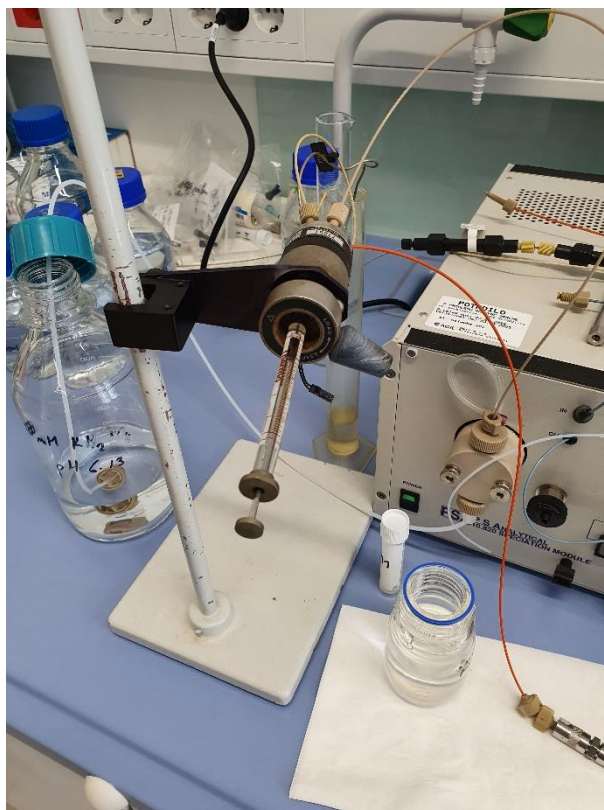
$$c_{vz} = \left(\frac{A_{vz} \cdot c_{std}}{A_{std}} \right) \cdot V_{eks} \div m_{vz}$$

V formuli A_{vz} predstavlja površino vzorca (iz ang. »peak area«), A_{std} povprečno površino standarda, c_{std} koncentracijo standarda (10 ng mL^{-1}), V_{eks} volumen ekstrakta (5 oz. 10 mL) in m_{vz} maso vzorca.



Slika 16: HPLC-HG-AFS za speciacijo arzena

Vir: Nika Kadunc



Slika 17: Injektor in brizga za injiciranje vzorcev

Vir: Nika Kadunc

5 REZULTATI

5.1 STANDARDNI REFERENČNI MATERIAL

Za preverjanje pravilnosti naših analiz smo po enakem postopku kot vzorce hrane pripravili tudi vzorce standardnega referenčnega materiala NIST SRM Rice Flour 1568b (riževa moka) z znanimi podatki o masnem deležu izbranih elementov in posameznih arzenovih spojin. Dobro ujemanje referenčnih in dobljenih vrednosti, ki je vidno iz Tabele 5, je znak dobre kvalitete naših analiz.

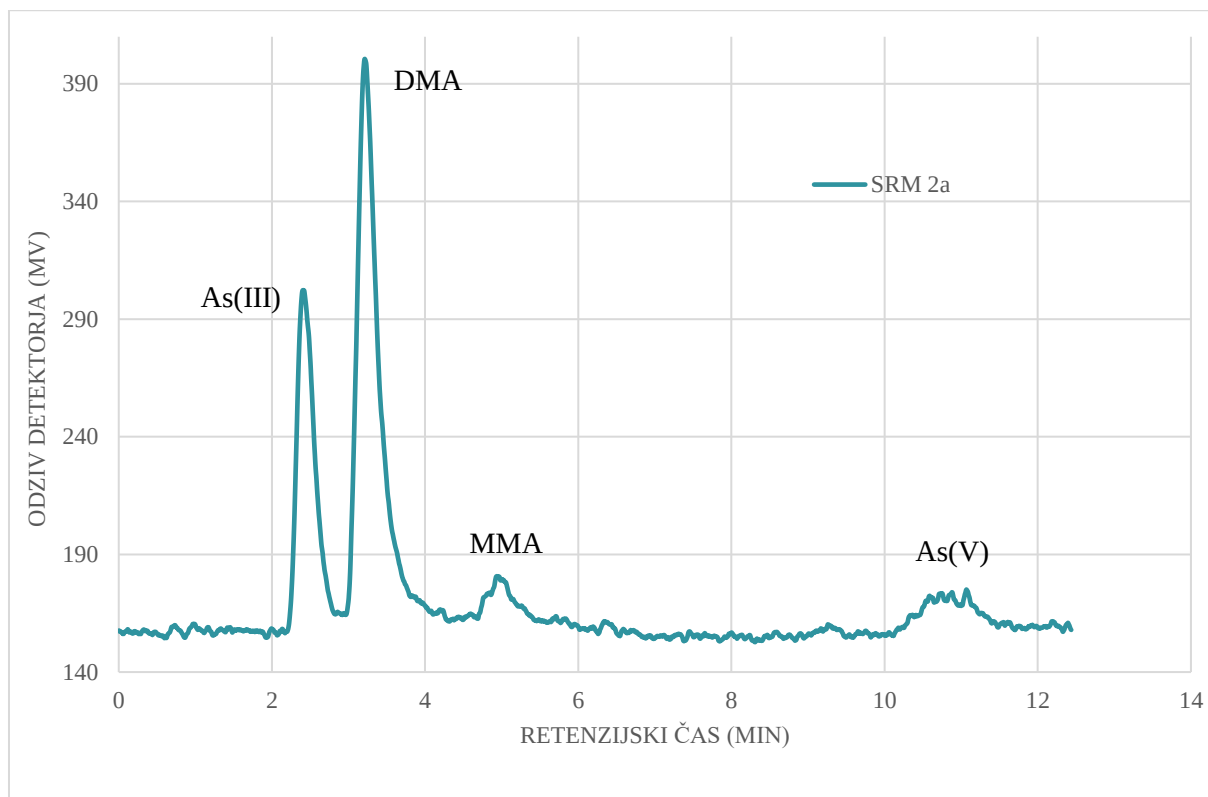
Tabela 5: Referenčne vrednosti v SRM in naše meritve

Vir: National Institute of Standards & Technology. Certificate of Analysis Standard Reference Material® 1568b Rice Flour ter lastne meritve

Element	Referenčni masni delež (mg kg ⁻¹)	Izmerjeni masni delež (mg kg ⁻¹)
Arzen (celokupni)	0,285 ± 0,014	0,294 ± 0,028
Dimetilarzenova kislina (DMA)	0,180 ± 0,012	0,163 ± 0,006
Monometilarzenova kislina (MMA)	0,0116 ± 0,0035	0,0096 ± 0,0014
Anorganski arzen (As(III) + As(V))	0,092 ± 0,010	0,094 ± 0,004
Kadmij	0,0224 ± 0,0013	0,0210 ± 0,0021

Za ilustracijo je na *Grafu 1* prikazan kromatogram ekstrakta standardnega referenčnega materiala, iz katerega se vidi dobra ločitev posameznih kromatografskih vrhov.

Graf 1: Kromatogram ekstrakta standardnega referenčnega materiala NIST SRM Rice Flour 1568b



5.2 REZULTATI DOLOČITVE ARZENA IN KADMIJA Z ICP-MS

Tabela 6 prikazuje rezultate določitve celokupnega arzena in kadmija v vzorcih hrane, razdeljenih glede na žitno sestavo. Vzorec št. 12, ki smo ga analizirali v treh paralelkah, kaže na dobro ponovljivost naših analiz, kar se vidi tudi iz analiz standardnega referenčnega materiala v Tabeli 5.

Tabela 6: Rezultati meritev ICP-MS

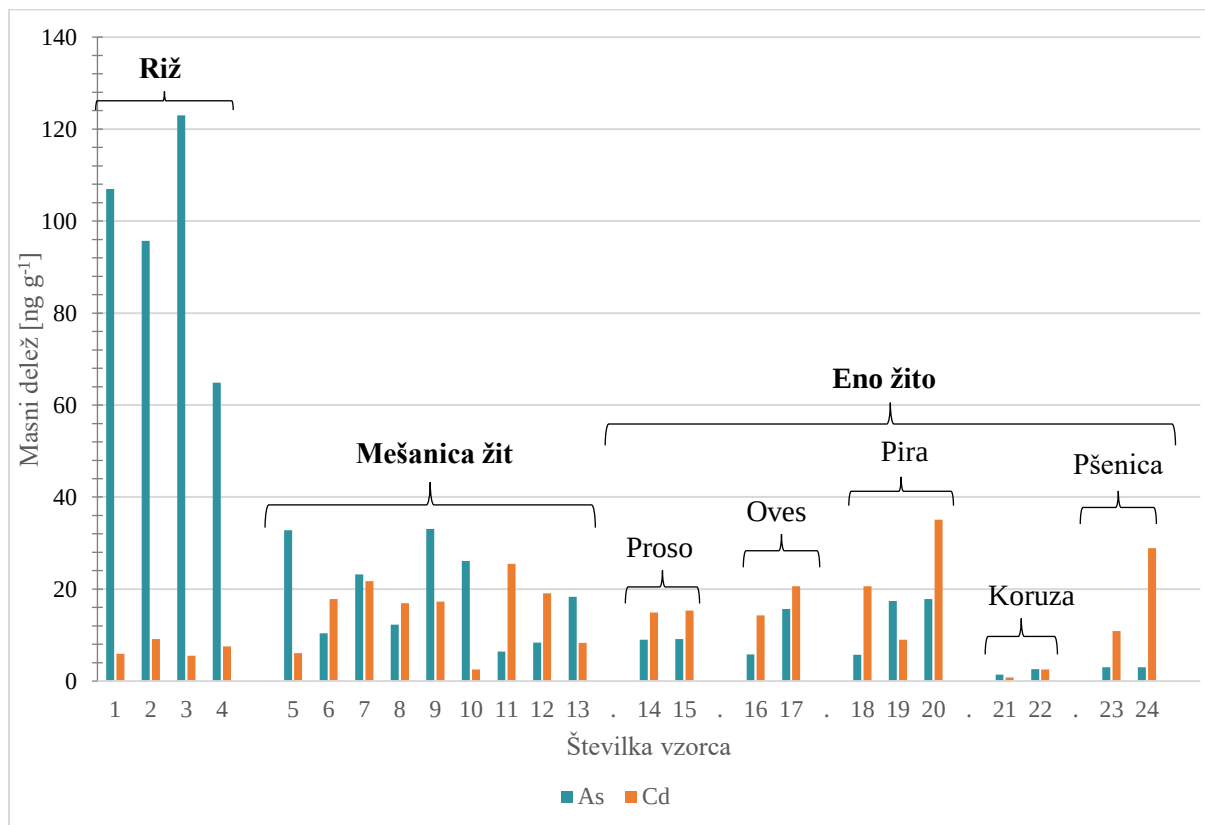
Št.		As (ng g ⁻¹)	Cd (ng g ⁻¹)
1	ENO ŽITO – RIŽ	107,0	5,9
2		95,7	9,1
3		123,0	5,5
4		64,9	7,5
5	MEŠANICA ŽIT	32,8	6,1
6		10,4	17,8
7		23,2	21,7
8		12,3	16,9
9		33,1	17,3
10		26,1	2,5
11		6,4	25,5
12		8,4 ± 0,6	19,1 ± 1,5
13		18,3	8,3
14	ENO ŽITO – PROSO	9,0	14,9
15		9,1	15,3
16	ENO ŽITO – OVES	5,8	14,3
17		15,7	20,6
18	ENO ŽITO – PIRA	5,7	20,6
19		17,4	9,0
20		17,8	35,1
21	ENO ŽITO – KORUZA	1,4	0,8
22		2,6	2,5
23	ENO ŽITO – PŠENICA	3,0	10,9
24		3,0	28,9

Glede na žitno sestavo izdelkov smo vzorce razdelili v 3 kategorije:

- izdelki z rižem brez kakršnegakoli dodatka drugih žit: vzorci št. 1–4,
- izdelki z različnimi mešanici žit: vzorci št. 5–13,
- izdelki z večinoma enim žitom: vzorci št. 14–24.

Za boljšo grafično predstavbo so rezultati določitve As in Cd v vzorcih prikazani še na Grafu 2.

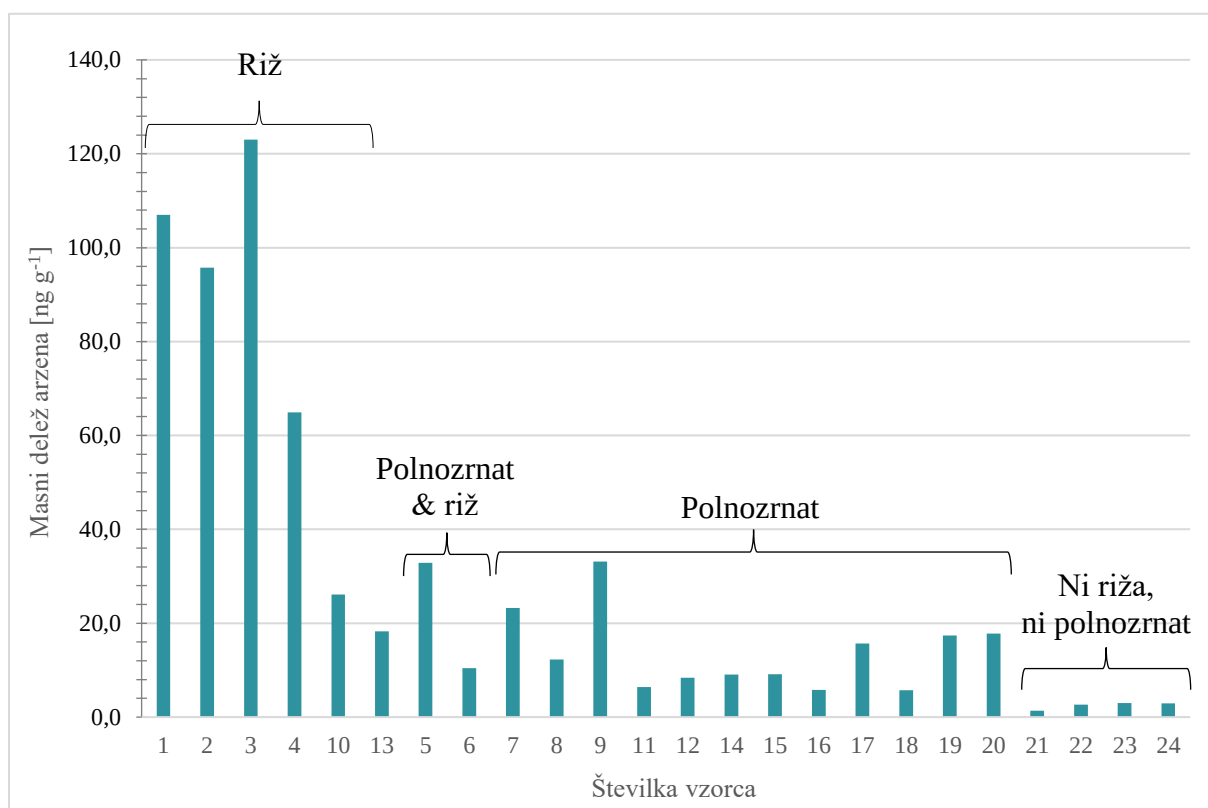
Graf 2: Količina As in Cd v vzorcih glede na žitno sestavo teh



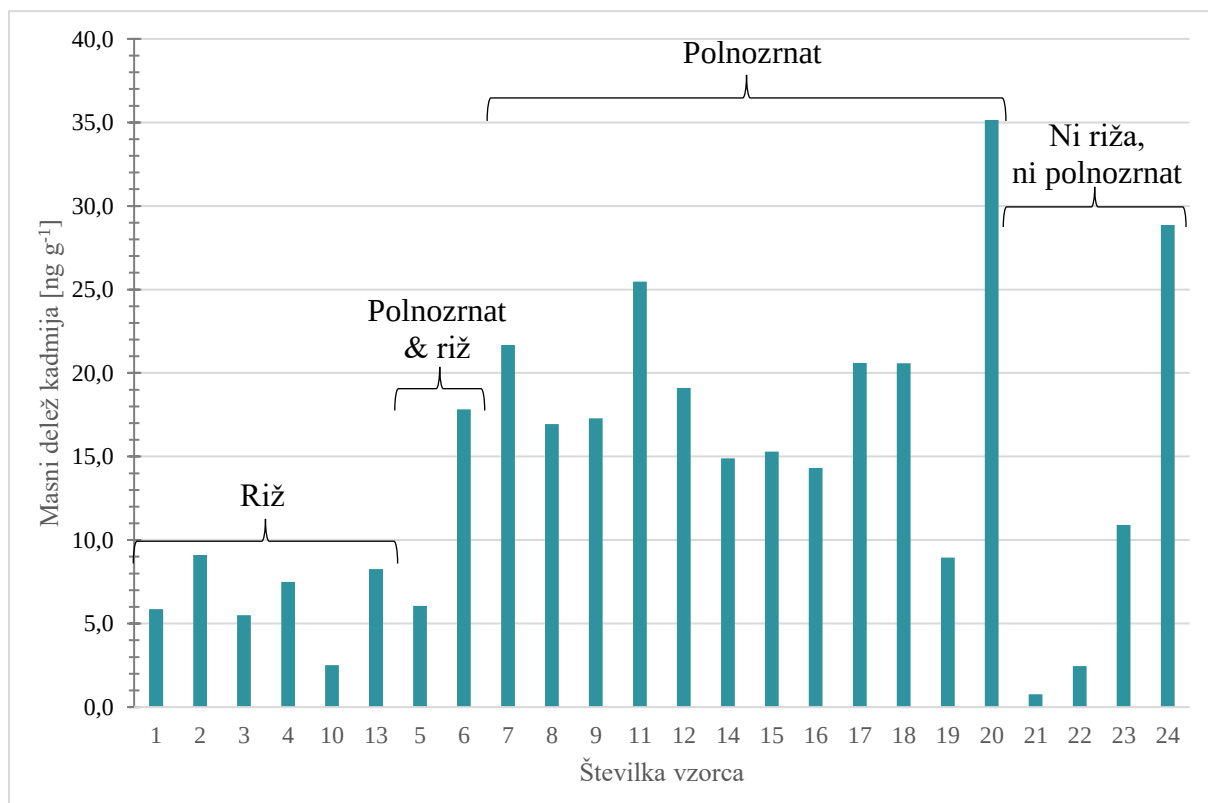
Glede na navedbe iz deklaracij žitnih izdelkov smo vzorce ločili še glede na polnozrnatost in prisotnost riža. Razdelili smo jih na 4 kategorije:

- izdelki z rižem: vzorci št. 1–4, 10, 13;
- izdelki z rižem in polnozrnatim žitom: vzorca št. 5, 6;
- izdelki s polnozrnatim žitom: vzorci št. 7–9, 11, 12, 14–20;
- izdelki brez riža in polnozrnatnega žita: vzorci št. 21–24.

Graf 3: Primerjava količine arzena glede na prisotnost polnozrnatih žit in riža



Graf 4: Primerjava količine kadmija glede na prisotnost polnozrnatih žit in riža



5.3 REZULTATI SPECIACIJE ARZENA S HPLC-HG-AFS

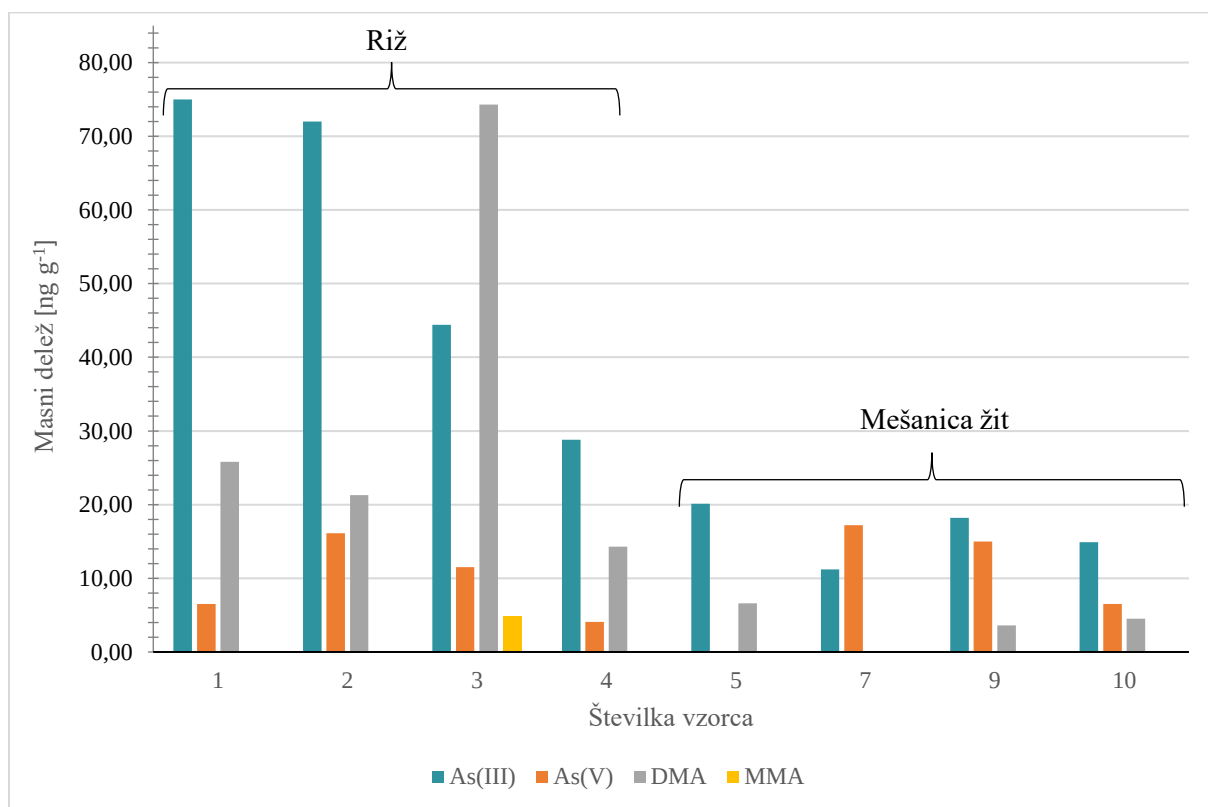
Tabela 7 prikazuje rezultate določitve posameznih arzenovih spojin v vzorcih, ki so glede na meritve ICP-MS imeli najvišjo celokupno vrednost arzena. Vzorci 1–4 so na osnovi riža, vzorci 5, 7, 9 in 10 pa vsebujejo mešanico žit. Vzorec št. 1 smo analizirali v treh paralelkah. Posebno pri nizkih koncentracijah je merska napaka večja kot pri analizi s ICP-MS, saj je markiranje nizkih in širokih kromatogramskih vrhov, kakršen je običajno As(V), subjektivnejše, zato obstaja večja možnost človeške napake.

Tabela 7: Rezultati meritev HPLC

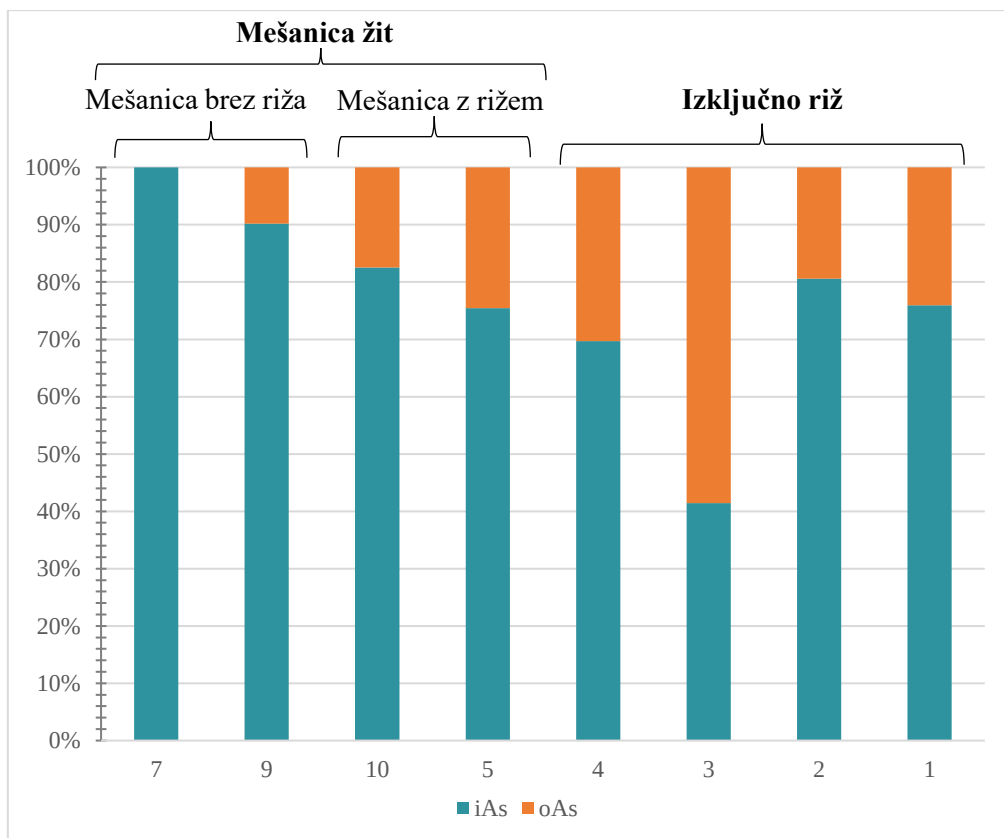
Št.	As(III) (ng g ⁻¹)	DMA (ng g ⁻¹)	MMA (ng g ⁻¹)	As(V) (ng g ⁻¹)	Skupaj iAs (ng g ⁻¹)	Skupaj (ng g ⁻¹)
1	75,0 ± 2,2	25,8 ± 5,3	< 1	6,5 ± 4,3	81,5 ± 5,3	107,3 ± 8,5
2	72,0	21,3	< 1	16,1	88,1	109,4
3	44,4	74,3	4,8	11,5	55,9	135,0
4	28,8	14,3	< 1	4,1	32,8	47,1
5	20,1	6,6	< 1	< 2	20,1	26,7
7	11,2	< 2	< 1	17,2	28,3	28,3
9	18,2	3,6	< 1	15,0	33,2	36,8
10	14,9	4,5	< 1	6,5	21,4	26,0

Vzorci smo nato primerjali glede na količino posameznih arzenovih spojin ter glede na razmerje med anorganskimi in organskimi spojinami.

Graf 5: Primerjava količine arzenovih spojin glede na žitno sestavo vzorca



Graf 6: Primerjava deleža anorganskih in organskih arzenovih spojin v izboru vzorcev



6 RAZPRAVA

Vsebnosti arzena se močno razlikujejo od vzorca do vzorca in so med 1,4 in 123 ng g⁻¹. V grafičnem prikazu istih rezultatov na Grafu 2 lahko hitro vidimo, da so vzorci z najvišjimi koncentracijami arzena iz skupine kašic na osnovi riža. Sledi jim mešanica žit. Daleč najnižje vsebnosti arzena so v koruzi in pšenici. To je najverjetneje posledica riževe visoke afinitete za arzen ter dobre sposobnosti translokacije le-tega po rastlini. Druga žita nimajo tolikšne afinitete za arzen ter ga ne morejo v tolikšni meri translocirati, kar se dobro kaže v naših rezultatih (Šlejkovec, et al., 2021). Da bi to lahko zagotovo potrdili, bi potrebovali še podatke o količini arzena v prsti, v kateri so rastla ta žita.

Hipoteza 1: Največ arzena bodo vsebovali izdelki na osnovi riža.

Glede na ugotovitve iz prejšnjega odstavka lahko Hipotezo 1 potrdimo.

Pri kadmiju so koncentracije nižje in razlike manj opazne, vseeno pa je prisoten. Koncentracije so med 0,8 in 35,1 ng g⁻¹. Glede na posamezna žita izstopajo nizke vsebnosti kadmija v rižu in koruzi. Zanimivo pa je, da so koncentracije kadmija večinoma višje od arzenskih pri vseh ostalih posameznih žitih (pira, oves, proso, pšenica – vzorci št. 14–18, 20, 23, 24) in tistih žitnih mešanicah z nizko vsebnostjo ali odsotnostjo riža (vzorci št. 6, 8, 11, 12). To se ujema tudi s podatki iz literature. V rižu naj bi se kopičil tudi kadmij, vendar ne v takih količinah kot arzen. Za ostale žitarice, predvsem za pšenico, piro in koruzo, pa obstajajo podatki, da kopičijo celo več kadmija kot arzena (TatahMentan, et al., 2020) (Wang, et al., 2017) (Ertl & Goessler, 2018). Mehanizmi, zakaj nekatere žitarice prevzemajo več kadmija, še niso povsem jasni.

Vsi izdelki so glede na Uredbo Komisije (ES) 2021/1323, ki glede anorganskega arzena in kadmija povzame uredbi iz leta 2015 in 2014, ustrezni, saj nobeden ne presega maksimalne količine kadmija 40 ng g⁻¹. Ker je koncentracija Cd v npr. pšenici v signifikantni korelaciji z vsebnostjo Cd v prsti, lahko sklepamo, da nobena od teh žitaric ni rastla v močno s Cd kontaminirani prsti (Zhao, et al., 2013). Kljub temu bi želeli opozoriti na možnost povišanih koncentracij Cd v izjemnih primerih, če bi žitarice rastle na močno onesnaženih območjih. Mejna primera sta vzorca 20 in 24, ki vsebujeta več Cd od ostalih vzorcev, mejne koncentracije pa vendar nista dosegla. Pri vzorcu št. 24 moramo upoštevati tudi, da je vseboval nekaj mleka v prahu, ki je lahko doprinesel manjši delež celokupnega kadmija (Kim, et al., 2016). Očitno

pa večina proizvajalcev izdelkov otroške hrane z žiti upošteva Uredbo Komisije (ES) 2021/1323 in pazi, da uporablja žita iz neonesnaženih področij.

Hipoteza 2: Nobena vrsta žit ne bo izstopala po visokih vrednostih kadmija.

Tudi Hipotezo 2 lahko glede na predhodne ugotovitve potrdimo.

V literaturi pogosto zasledimo podatek, da imajo nepolnozrnati izdelki manjšo vsebnost arzena. Ta se namreč večinoma koncentrira v zunanjih plasteh žitnega zrna, ki je med predelavo v nepolnozrnat izdelek zavržen (Thielecke & Nugent, 2018). Glede na navedbe na embalažah izdelkov so bili edini produkti brez polnozrnatih žit ali riža vzorci št. 21, 22, 23 in 24. Iz Grafa 3 vidimo, da ti izdelki res vsebujejo manj arzena kot izdelki z rižem ali polnozrnatimi žiti.

Zanimalo nas je, ali bi lahko podobno trdili tudi za vsebnost kadmija, torej ali vsebujejo polnozrnati izdelki tudi več kadmija kot nepolnozrnati. Iz Grafa 4 vidimo, da takšne povezave za kadmij neposredno ne moremo narediti, saj med nepolnozrnatimi vzorci masni delež kadmija močno variira. Vzorci št. 21, 22 in 23 so vsebovali znatno manj Cd kot polnozrnati vzorci, vzorec št. 24 pa je bil primerljiv polnozrnatim. Pri tem je ponovno potrebno opozoriti, da lahko del kadmija v vzorcu št. 24 izhaja tudi iz mleka v prahu. Zaenkrat so raziskave, ki so primerjale količino kadmija v polnozrnatih in belih vrstah moke, pokazale signifikantno razliko med letoma. Kathrin Ertl in sodelavci so npr. odkrili 62,5 % večjo koncentracijo kadmija v polnozrnatih piri in 70,0 % višjo vrednost v polnozrnatih pšenici. Za polnozrnat piro so ugotovili povprečno vrednost kadmija $39,0 \pm 3 \text{ ng g}^{-1}$ (Ertl & Goessler, 2018), kar je zelo blizu vrednosti našega vzorca s 100-odstotno polnozrnat piro (št. 20 – $35,1 \text{ ng g}^{-1}$). Zato lahko sklepamo tudi za kadmij, da je koncentracija odvisna od stopnje prečiščenosti žita.

Hipoteza 3: Polnozrnati izdelki bodo vsebovali več arzena in/ali kadmija.

Hipotezo 3 lahko delno potrdimo. Trditev namreč velja za arzen, za kadmij pa velja le pri nekaterih vzorcih.

S speciacijo smo določili, koliko arzena v anorganski obliki je bilo v vzorcih z najvišjo celokupno vrednostjo arzena. Masni delež iAs v vzorcih je znašal med 20,1 in $88,1 \text{ ng g}^{-1}$. S tem smo ugotovili, da so vsi izdelki ustrezni tudi glede na Uredbo Komisije (EU) 2015/1006, saj so vsi imeli vsebnost anorganskega arzena pod 100 ng g^{-1} .

Hipoteza 4: Nekaj izdelkov bo presegalo maksimalno mejo vsebnosti kadmija ali anorganskega arzena.

Hipotezo 4 lahko ovržemo, saj med našimi vzorci nismo našli izdelka, ki bi presegal omejitve za arzen ali kadmij.

Hipoteza 5: Zaradi uveljavljene Uredbe Komisije (EU) 2021/1323 ne pričakujemo močno povišanih koncentracij obeh elementov v izdelkih, namenjenih dojenčkom in majhnim otrokom.

Ker nobeden od vzorcev ni presegal omejitev, postavljenih z Uredbo Komisije EU, lahko posledično tudi Hipotezo 5 potrdimo.

Iz Grafa 5 vidimo, da k višji vrednosti arzena v rižu najbolj doprineseta arzenit in DMA. Razlog za višje vrednosti arzenita najdemo v načinu pridelave riža. Veliko riža raste na območjih s povišano koncentracijo arzena v prsti in vodi, poleg tega pa riž gojijo na namakalnih poljih, na katerih zaradi velikih količin vode in odsotnosti kisika tečejo redukcijski procesi, kot je pretvorba arzenata v arzenit. Arzenit je bistveno bolj topen od arzenata in je bolj biorazpoložljiv za rastline kot arzenat. Druge vrste žit se goji v bolj aerobnih pogojih, zato rastejo v okolju z večjo koncentracijo arzenata kot arzenita, pogosto pa je koncentracija obeh v prsti zelo nizka (Šlejkovec, et al., 2021).

Nivo arzenata v vzorcih ni pretirano variiral. MMA je bila nad mejo detekcije v le enem od vzorcev (št. 3).

Iz Grafa 6 je razvidno, da so imeli vzorci na podlagi riža večji delež organskih arzenovih spojin kot vzorci brez riža. Izdelki, ki so temeljili izključno na rižu, so vsebovali med 19,4 % in 30,3 % organskih arzenovih spojin, izdelki, ki so deloma tudi vsebovali riž, so vsebovali med 17,5 % in 25,6 %, izdelki brez riža pa so vsebovali med 0,0 % in 9,8 % DMA in MMA. V strokovni literaturi še ni povsem pojasnjeno, od kod te spojine prihajajo. Metilacija arzenita do MMA in/ali DMA verjetno poteka v mikroorganizmih v vodi na riževih poljih in v manjši meri v rastlinah samih. To podpira dejstvo, da riž bolje absorbira organske arzenove spojine kot druge žitarice (Zhao, et al., 2009).

Hipoteza 6: Riževi izdelki bodo vsebovali višji delež organskih arzenovih spojin kot izdelki iz drugih žit.

Glede na dobljene podatke lahko Hipotezo 6 potrdimo.

7 ZAKLJUČEK

Z našo raziskovalno nalogo smo izvedli prvo analizo količine arzena in kadmija v žitnih pripravkih za otroke od 6. meseca dalje, ponujenih na slovenskem trgu. Analizirali smo 24 različnih vzorcev, ki so temeljili na različnih žitih (riž, oves, pira, koruza, ječmen, ajda, pšenica, rž, proso ali mešanica teh). Masne deleže celokupnega arzena in kadmija smo določili z metodo masne spektrometrije z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS). Vzorci so vsebovali od 1,4 do 123 ng g⁻¹ arzena in od 0,8 do 35,1 ng g⁻¹ kadmija. Ker imajo anorganske arzenove spojine višjo stopnjo toksičnosti kot organske, smo na vzorcih z višjo vrednostjo arzena (vzorci št. 1–5, 7, 9, in 10) opravili tudi speciacijo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti s hidridno tehniko in atomsko fluorescentno spektrometrijo (HPLC-HG-AFS). Ti vzorci so vsebovali od 20,1 do 88,1 ng g⁻¹ anorganskega arzena.

Z rezultati smo potrdili trditvi, da se največ arzena akumulira v rižu in da nobena žitarica ne izstopa po nadpovprečni afiniteti za kadmij. Ugotovili smo, da polnozrnati izdelki vsebujejo več arzena kot nepolnozrnati. Ta princip lahko delno povežemo tudi za kadmij. Večina naših nepolnozrnatih vzorcev je vsebovala manj kadmija kot polnozrnati, pa tudi v literaturi pogosto zasledimo, da imajo manj prečiščena žita več kadmija. Da bi to tudi mi potrdili z večjo stopnjo gotovosti, bi potrebovali več vzorcev z nepolnozrnatimi žiti, teh pa je med izdelki za majhne otroke dokaj malo. To odpira možnost za nadaljnjo raziskavo, kjer bi primerjali koncentracije kadmija v različnih žitaricah z različno stopnjo prečiščenosti. Speciacija arzenovih spojin nam je dala dober vpogled v očitno precej drugačen profil arzena v rižu v primerjavi z mešanico drugih žit. Medtem ko so druga žita vsebovala nekaj arzenata in arzenita, so riževi vzorci poleg arzenata in malo arzenita vsebovali še DMA. S primerjavo deležev organskih in anorganskih arzenovih spojin v vzorcih pri speciaciji smo videli, da imajo riževi izdelki na račun DMA višji delež organskih spojin kot izdelki iz drugih žit. Vzrok za višjo vrednost DMA v rižu še ni povsem jasen, zato se nam tudi tu odpirajo možnosti za nadaljnje raziskave.

Vsi izdelki so vsebovali manj kot 100 ng g⁻¹ anorganskega arzena in manj kot 40 ng g⁻¹ kadmija. Proizvajalci se torej dosledno držijo Uredbe Komisije (EU) št. 1881/2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih. Omejitvi se je po količini anorganskega arzena najbolj približal vzorec št. 2 (88,1 ng g⁻¹), po količini kadmija pa vzorec št. 20 (35,1 ng g⁻¹). Nevarnost za potencialno kronično zastrupitev otrok je zato zelo nizka. Vseeno pa se je smiselno držati smernic za uravnoteženo prehrano, saj z uživanjem raznolike hrane nivo vnosa onesnaževal še zmanjšamo.

Literatura

Abedi, T. & Mojiri, A., 2020. Arsenic Uptake and Accumulation Mechanisms in Rice Species. *Plants*, 9(129).

Agilent, 2023. *An Introduction to the Fundamentals of Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (ICP-MS)*. [Elektronski]

Available at: <https://www.agilent.com/en/product/atomic-spectroscopy/inductively-coupled-plasma-mass-spectrometry-icp-ms/what-is-icp-ms-icp-ms-faqs>

[Poskus dostopa 31 januar 2023].

Andreas, N. J., Kampmann, B. & Mehring Le-Doare, K., 2015. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*, 91(11), pp. 629-635.

ATSDR, 2007. *Toxicological Profile for Arsenic*, s.l.: U.S. Department of Health and Human Services.

ATSDR, 2012. *Toxicological Profile for Cadmium*, s.l.: U.S. Department of Health and Human Services.

ATSDR, 2023. *Minimal Risk Levels (MRLs) for Hazardous Substances*. [Elektronski]

Available at: <https://wwwn.cdc.gov/TSP/MRLS/mrlsListing.aspx>

[Poskus dostopa 25 februar 2023].

Bender, D. A., 2006. *Benders' Dictionary of Nutrition and Food Technology (8th Edition)*. s.l.:Woodhead Publishing Limited.

Blum, F., 2014. High performance liquid chromatography. *Br J Hosp Med*, 75(2), pp. 18-21.

Calatayud, M., Barrios, J. A., Vélez, D. & Devesa, V., 2012. In Vitro Study of Transporters Involved in Intestinal Absorption of Inorganic Arsenic. *Chem Res Toxicol.*, 25(2), p. 446–453.

CDC, 2021. *Child Development*. [Elektronski]

Available at: <https://www.cdc.gov/ncbddd/childdevelopment/positiveparenting/infants.html>

[Poskus dostopa 11 marec 2023].

Chunhabundit, R., 2016. Cadmium Exposure and Potential Health Risk from Foods in Contaminated Area, Thailand. *Toxicol Res*, 32(1), pp. 65-72.

- Clemens, S. & Ma, J. F., 2016. Toxic Heavy Metal and Metalloid Accumulation in Crop Plants and Foods. *Annu Rev Plant Biol*, Izvod 67, pp. 489-512.
- Dewey, K., 2003. *Guiding principles for complementary feeding of the breastfed child*, s.l.: Pan American Health Organization.
- Dong, M. W., 2013. The Essence of Modern HPLC: Advantages, Limitations, Fundamentals, and Opportunities. *Lc Gc North Am*, 31(6), pp. 472-479.
- Elder, A., Nordberg, G. F. & Kleinman, M., 2015. Chapter 3 - Routes of Exposure, Dose, and Toxicokinetics of Metals. V: G. F. Nordberg, B. A. Fowler & M. Nordberg, ured. *Handbook on the Toxicology of Metals (4th Edition)*. s.l.:Academic Press, pp. 45-74.
- Ertl, K. & Goessler, W., 2018. Grains, whole flour, white flour, and some final goods: an elemental comparison. *Eur Food Res Technol*, Izvod 244, p. 2065–2075.
- Fewtrell, M., Bronsky, J., Campoy, C. & e. a., 2017. Complementary Feeding: A Position Paper by the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 64(1), pp. 119-132.
- Fowler, B. A., Chou, C.-H. S. J., Jones, R. L. & Sullivan JR, D. W., 2015. Chapter 28 - Arsenic. V: G. F. Nordberg, B. A. Fowler & M. Nordberg, ured. *Handbook on the Toxicology of Metals (4th Edition)*. s.l.:Academic Press, pp. 581-624.
- Guillod-Magnin, R., Brüscheiler, B. J., Aubert, R. & Haldimann, M., 2018. Arsenic species in rice and rice-based products consumed by toddlers in Switzerland. *Food Add & Cont*, 35(6), pp. 1164-1178.
- Hughes, M. F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett*, 133(1), pp. 1-16.
- IARC, 2022. *Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–132*. [Elektronski] Available at: <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/> [Poskus dostopa 2 marec 2023].
- I. o. M., 2005. *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids*. Washington, DC: The National Academies Press.
- K. E., 2022. *UREDBA KOMISIJE (ES) št. 1881/2006 z dne 19. decembra 2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih*, s.l.: s.n.

- Khan, M. A., Khan, S., Khana, A. & Alam, M., 2017. Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *Sci Total Environ*, Izvod 601-602, pp. 1591-1605.
- Kim, D.-G., Kim, M., Shin, J. Y. & Son, S.-W., 2016. Cadmium and lead in animal tissue (muscle, liver and kidney), cow milk and dairy products in Korea. *Food Addit Contam Part B Surveill*, 9(1), pp. 33-37.
- Kramer, M. S., Chalmers, B., Hodnett, E. D. & e. a., 2001. Promotion of Breastfeeding Intervention Trial (PROBIT): A Randomized Trial in the Republic of Belarus. *JAMA*, 285(4), pp. 413-420.
- Kramer, M. S. & Kakumo, R., 2001. *The optimal duration of exclusive breastfeeding: a systematic review*, WHO, Geneva: WHO Department of Nutrition for Health & Department of Child and Adolescent.
- Kubier, A., Wilkin, R. T. & Pichlera, T., 2019. Cadmium in soils and groundwater: A review. *Appl Geochem*, Izvod 108, pp. 1-16.
- Llorente-Mirandes, T., Calderón, J., Centrich, F. & Rubio, R., 2014. A need for determination of arsenic species at low levels in cereal-based food and infant cereals. Validation of a method by IC–ICPMS. *Food Chem*, Izvod 147, pp. 377-385.
- Martinez, V. D. in drugi, 2011. Arsenic Exposure and the Induction of Human Cancers. *J Toxicol*, Izvod 2011.
- McKevith, B., 2004. Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin*, 29(2), pp. 111-142.
- Meharg, A. A. in drugi, 2008. Inorganic arsenic levels in baby rice are of concern. *Environ Pollut*, 152(3), pp. 746-749.
- Monteiro, C. A. in drugi, 2019. *Ultra-processed foods, diet quality, and health using the NOVA classification system*, Rim: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Nordberg, G. F., Nogawa, K. & Nordberg, M., 2014. Chapter 32 - Cadmium. V: G. F. Nordberg, B. A. Fowler & M. Nordberg, ured. *Handbook on the Toxicology of Metals (4th Edition)*. s.l.:Academic Press, pp. 667-716.
- Obbagy, J. E. in drugi, 2019. Complementary feeding and micronutrient status: a systematic review. *Am J Clin Nutr*, 109(Suppl 1), pp. S852-S871.

- Patrick, L., 2003. Toxic Metals and Antioxidants: Part II. The Role of Antioxidants in Arsenic and Cadmium Toxicity. *Altern Med Rev*, 8(2), pp. 106-128.
- Pohl, P., 2004. Hydride generation – recent advances in atomic emission spectrometry. *TrAC, Trends Anal Chem*, 23(2), pp. 87-101.
- Primer, A., 2005. *ICP-MS Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, s.l.: Agilent Technologies, Inc..
- Reilly, C., 2006. Chapter 10 - Pollutants in Food - Metals and Metalloids. V: P. Szefer & J. O. Nriagu, ured. *Mineral Components in Foods (1st Edition)*. s.l.:CRC Press, pp. 363-388.
- Schoenlechner, R., Siebenhandl, S. & Berghofer, E., 2008. Chapter 7 - Pseudocereals. V: E. Arendt & F. D. Bello, ured. *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*. s.l.:Academic Press, pp. 149-190.
- Šlejkovec, Z. in drugi, 2021. Arsenic speciation and elemental composition of rice samples from the Slovenian market. *Food Chem*, Izvod 342.
- TatahMentan, M. in drugi, 2020. Toxic and Essential Elements in Rice and Other Grains from the United States and Other Countries. *Int J Environ Res Public Health*, 17(21), p. 8128.
- Thielecke, F. & Nugent, A. P., 2018. Contaminants in Grain—A Major Risk for Whole Grain Safety?. *Nutrients*, 10(9), pp. 12-13.
- Upadhyay, M. K., Shukla, A., Yadav, P. & Srivastava, S., 2019. A review of arsenic in crops, vegetables, animals and food products. *Food Chem*, Izvod 276, pp. 608-618.
- Uprava RS za varno hrano, v. i. v. r., 2020. *Onesnaževala v živilih*. [Elektronski]
Available at: <https://www.gov.si/teme/onesnazevala-v-zivilih/>
[Poskus dostopa 1 marec 2023].
- Vahter, M., 2002. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, Izvod 181-182, pp. 211-217.
- Vesey, D. A., 2010. Transport pathways for cadmium in the intestine and kidney proximal tubule: Focus on the interaction with essential metals. *Toxicol Lett*, 198(1), pp. 13-19.
- Wang, S. in drugi, 2017. Accumulation of heavy metals in soil-crop systems: a review for wheat and corn. *Environ Sci Pollut Res Int*, 24(18), pp. 15209-15225.
- W. C. A. C., 2015. *Procedural Manual (24th Edition)*. [Elektronski].

WIC, 2019. *Infant Nutrition and Feeding: A Guide for Use in the Special Supplemental Nutrition Program for Women, Infants, and Children (WIC)*. Washington DC: USDA.

Williams, P. N., Raab, A., Feldmann, J. & Meharg, A. A., 2007. Market Basket Survey Shows Elevated Levels of As in South Central U.S. Processed Rice Compared to California: Consequences for Human Dietary Exposure. *Environ Sci Technol*, 41(7), pp. 2178-2183.

Zhao, F. J., Ma, J. F., Meharg, A. A. & McGrath, S. P., 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol*, 181(4), pp. 777-794.

Zhao, H., Guo, B., Wei, Y. & Zhang, B., 2013. Multi-element composition of wheat grain and provenance soil and their potentialities as fingerprints of geographical origin. *J Cereal Sci*, 57(3), pp. 391-397.

Zou, Z. in drugi, 2018. Recent trends in atomic fluorescence spectrometry towards miniaturized instrumentation-A review. *Anal Chim Acta*, Izvod 2019, pp. 25-37.