

Технология переработки
водных биоресурсов

УДК 615.072

Изучение токсичности мышьяксодержащих соединений, выделенных из бурой водоросли *Saccharina japonica*, на лабораторных животныхЛ. С. Абрамова¹, В. В. Гершунская¹, А. В. Козин¹, Д. А. Бондаренко², А. Н. Мурашёв²¹ Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ФГБНУ «ВНИРО»), г. Москва² Филиал Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (ФГБУН «ФИБХ РАН»), г. Пущино

E-mail: abramova@vniro.ru

Способность различных морских организмов, в особенности водорослей и беспозвоночных, к накоплению мышьяка в высоких концентрациях может представлять угрозу для здоровья населения при употреблении их в пищу. Из литературных данных известно, что неорганические соединения мышьяка (арсениты и арсенаты) являются наиболее токсичными, по сравнению с метилированными формами элемента, и тем более с комплексными органическими соединениями (арсенобетаином, арсенохолином, тетраметиларсоний йоном, арсенорибозами), считающимися нетоксичными для живых организмов. На основе данных мониторинга показателей безопасности установлено, что для водорослей характерно превышение содержания общего мышьяка. Согласно ТР ТС 021/2011 максимально допустимый уровень мышьяка в водорослях составляет 5 мг/кг и установленная норма без разделения на органические и неорганические соединения мышьяка создаёт барьер для рационального использования сырья. В связи с этим определение содержания неорганических соединений мышьяка в водорослях, а также оценка их токсичности является весьма актуальной проблемой. При исследовании коммерческой бурой водоросли *Saccharina* (= *Laminaria*) *japonica* и фракций, полученных при её обработке, с помощью методов ИСП-МС, ВЭЖХ-МС-ИСП выявлено превышение предельно допустимого уровня мышьяка, однако наиболее токсичные неорганические формы составили от 6 до 14% от общего количества мышьяка в сырье. В опытах на лабораторных животных (крысах) изучена острая токсичность и показано отсутствие токсических эффектов при пероральном введении суспензии, содержавшей фракцию с большой концентрацией соединений мышьяка. В исследованиях возможной хронической токсичности ламинарии при продолжительном введении тех же субстанций лабораторным мышам линии CD-1 обнаружено, что даже многократное превышение дозы мышьяксодержащих соединений, выделенных из водоросли, не оказывает токсического действия.

Ключевые слова: водоросли, неорганические соединения мышьяка, острая токсичность, хроническая токсичность, лабораторные животные.

DOI: 10.36038/2307-3497-2020-181-223-234

ВВЕДЕНИЕ

Бурые водоросли в настоящее время пользуются широким спросом у населения в связи с высоким содержанием в них полезных микронутриентов, обладают выраженным терапевтическим действием и являются естественным источником с большим потенциалом для использования в качестве функциональных ингредиентов [Gomez-Zavaglia et al., 2019; Вафина, Подкорытова, 2009].

Мониторинг показателей безопасности водных биологических ресурсов в основных промысловых бассейнах Российской Федерации показал, что для бурых водорослей характерно частое превышение содержания общего мышьяка [Аминина, 2011; Щукин и др., 2018]. Согласно ТР ТС 021/2011 максимально допустимый уровень мышьяка в водорослях составляет 5 мг/кг, и установленная норма без разделения на органические и неорганические соединения мышьяка и без учёта изменения его процентного содержания при переработке создаёт барьер для рационального использования сырья.

Хорошо известно, что токсичность мышьяка зависит не только от его общего содержания, но и от того в виде какого химического соединения присутствует этот элемент [EFSA, 2009; EFSA, 2014]. Неорганические соединения мышьяка (арсениты (As III) и арсенаты (As V)) являются наиболее токсичными по сравнению с метилированными формами элемента (монометиларсоновая кислота (ММА), какодиловая кислота (DMA)) и комплексными органическими соединениями (арсенобетаином (AsB), арсенохолином (AsC), тетраметиларсоний йоном (TMA^{s+})), считающимися нетоксичными для живых организмов [Taylor et al., 2017].

В морских водорослях мышьяк находится преимущественно в виде арсенорибоз, считающихся нетоксичными [Kumari et al., 2017; Ma et al., 2018]. Многочисленные исследования образцов водорослей (*Laminaria* spp., *Porphyra* spp., *Hizikia* spp., *Eucheuma denticulatum*, *Fucus vesiculosus*) методами ВЭЖХ–МС–ИСП и ВЭЖХ–МС с ионизацией электрораспылением (ESI) показали, что основными соединениями мышьяка в них являются арсеносахара, хотя в ламинарии

было обнаружено незначительное количество диметиларсенида, а также следы таких соединений как триметиларсенид и йон тетраметиларсония [Van Hulle et al., 2002; Hsieh, Jiang, 2012; Zhao et al., 2012; Ma et al., 2018].

Исследование 31 образца высушенных бурых водорослей [Rose et al., 2007], предназначенных для непосредственного употребления в пищу, показало, что общее содержание мышьяка составило от 18 до 124 мг/кг сухой массы. Неорганический мышьяк в значительных количествах (67–97 мг/кг) был обнаружен только в 9 образцах хидзики *Hizikia fusiforme*, в остальных образцах содержание неорганического мышьяка составило менее 0,3 мг/кг.

Повышенное содержание мышьяка в некоторых видах водорослей (до десятков мг на кг) приводит к выводу о необходимости более глубокого анализа соединений мышьяка для оценки потенциального риска для здоровья человека при их употреблении в пищу. Определение метаболизма и оценка токсичности органических соединений мышьяка из морских организмов часто могут давать противоречивые результаты по сравнению с неорганическими соединениями мышьяка. Тесты на цитотоксичность [Sakurai et al., 1997; Andrewes et al., 2004] подтвердили, что арсеносахара из морских водорослей и их метаболиты являются значительно менее токсичными во всех случаях по сравнению с диметиларсенидом и неорганическим мышьяком. Вместе с тем в последние годы появились данные о том, что различные формы органического мышьяка могут негативным образом влиять на организм. Например, метилированные формы арсеносахаров и арсенолипидов, как и неорганический мышьяк оказывали канцерогенное воздействие при их введении грызунам в дозе 50 мкг/кг массы в пересчёте на мышьяк [Twaddle et al., 2019].

Отечественные данные о содержании различных соединений мышьяка в бурых водорослях и продукции из них являются немногочисленными [Петруханова и др., 2012; Аминина и др., 2015; Круглякова и др., 2018; Щукин и др., 2019]. В связи с вышеизложенным, специфика накопления различ-

ных форм мышьяка в этом виде морской биоты и оценка потенциальной токсичности его соединений требуют проведения дальнейших исследований.

Целью настоящей работы было изучение токсичности фракций с различным содержанием общего мышьяка и его неорганических соединений, выделенных из бурой водоросли путём биотестирования на лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служила коммерческая бурая водоросль *Saccharina* (= *Laminaria*) *japonica* (Сахалин, Холмский район, ООО «Посейдон», 2010 г.) и фракции, полученные при её обработке.

Экстракцию мышьяка из водоросли проводили согласно [Salgado et al., 2006] по следующей схеме: навеску 1,6 г высушенного измельчённого образца взвешивали в пробирке для центрифугирования, в каждую пробирку добавляли по 40 мл деионизованной воды, подвергали встряхиванию в течение 10 мин, затем центрифугировали 10 мин (с ускорением 14 g). Супернатант сливали в колбу, экстракцию повторяли ещё дважды, собирая супернатант в ту же колбу. Полученный супернатант и водорослевый остаток высушивали лиофильным способом. Исходную водоросль высушивали до постоянной массы и тонко измельчали до размера частиц 0,5 мм. Таким образом, для исследований использовали следующие фракции: исходную водоросль, супернатант (жидкая фракция после экстракции, центрифугирования и сушки) и водорослевый остаток (твёрдая фракция после экстракции, центрифугирования и сушки).

Анализ содержания различных соединений мышьяка проведён на кафедре аналитической химии в Кубанском государственном университете (г. Краснодар) методами ИСП-МС и ВЭЖХ-МС-ИСП с использованием следующего оборудования: система ВЭЖХ LC20 Prominence (фирма Shimadzu), масс-спектрометр с индуктивно связанной плазмой XSeries2 (фирма Thermo Fisher Scientific). Инструментальные параметры и условия измерения на ВЭЖХ-ИСП-МС

системе: хроматографическая колонка — transgenomic ICSeP AN2, ID 4,6 мм × 250 мм (алкильные четвертичные аммониевые группы), подвижная фаза 3,5ММ Na₂CO₃ + 1,0 мМ NaHCO₃, скорость потока элюента 1,2 мл/мин. Выходная мощность генератора 1250 Вт. Подобранные скорости потоков аргона составили: плазмообразующий — 13 л/мин, вспомогательный — 0,9 л/мин, распылительный — 0,89 л/мин.

Для определения содержания общего мышьяка навеску фракции массой 0,60 г помещали в тefлоновый реакционный сосуд микроволновой системы Ethos 1 (фирма Milestone), добавляли 5,00 мл концентрированной азотной кислоты и 4,00 мл бидистиллированной воды. СВЧ-минерализацию осуществляли при максимальной мощности 1000 W, температуры 200 °С в течение 45 мин. Полученный минерализат количественно переносили в мерную колбу объёмом 100,0 мл и доводили до метки бидистиллированной водой. Расчёт концентрации общего содержания мышьяка осуществляли методом абсолютной градуировки (от 0,50 до 50,00 мкг/л) и стандартных добавок.

Для определения неорганических соединений мышьяка навеску фракции массой 0,40 г помещали в кварцевый реакционный сосуд микроволновой системы Ethos 1 (фирма Milestone), добавляли 12,50 мл 3,5%-ного раствора азотной кислоты. СВЧ-экстракцию осуществляли при температуре 90 °С в течение 30 мин. После экстракции пробу фильтровали и доводили до метки соответствующим экстрагентом в мерной колбе объёмом 50,00 мл. Аликвоту полученного экстракта объёмом 4,00 мл помещали в мерную колбу объёмом 25,00 мл и доводили до метки подвижной фазой (3,5 мМ Na₂CO₃ и 1,0 мМ NaHCO₃).

Расчёт концентрации осуществляли по градуировочному графику, построенному с помощью стандартных растворов As(III) и As(V) концентрацией 0,1 мг/мл, в диапазоне концентраций от 1,00 до 50,00 мкг/л (рис. 1) и методом нормировки пиков (по сумме площадей). Соответствующий объём калибровочного раствора мышьяка вводили в анионообменную систему ВЭЖХ

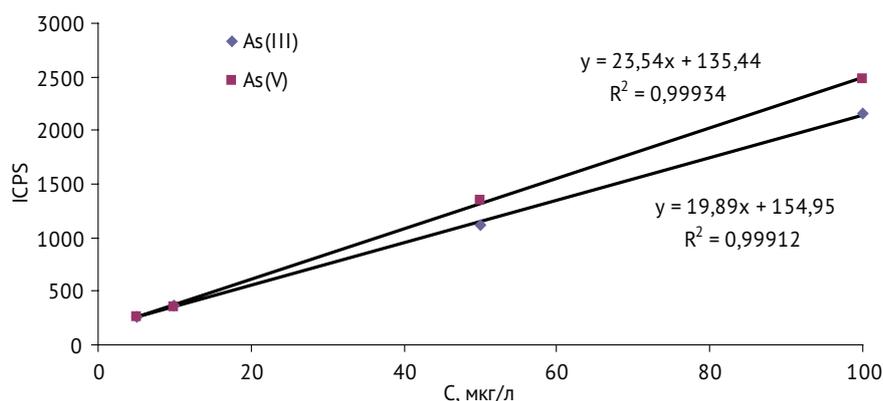


Рис. 1. Градуировочные графики для As(III) и As(V)

ИСП-МС и определяли площадь пика каждой из точек калибровки для построения калибровочной кривой.

Исследования острой и хронической токсичности ламинарии проводили в лаборатории биологических испытаний филиала Института биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (г. Пущино). Характеристика лабораторных животных приведена в табл. 1.

Образцы вводили животным однократно зондом в желудок в объёме и дозах, указанных в табл. 2. Дозы для введения готовились путём разведения порошков из исходной водоросли, супернатанта и водорослевого остатка в носителе (1% суспензии крахмала), выбранном для повышения стабильности и равномерности распределения частиц. Контрольной группе животных (группы 4 и 8) вводился только носитель.

Наблюдения за крысами проводили в течение трёх суток, за мышами — в течение 21 суток. Клинический осмотр животных после введения препаратов проводили каждый час в течение первых трёх часов, через сутки и ежедневно в последующие дни: у животных регистрировали изменения массы тела, потребление корма, смертность, внешние проявления отклонений в состоянии здоровья, локомоторную активность. Затем крыс и мышей подвергали эвтаназии помещением в CO₂-камеру и полной некропсии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 представлен пример хроматограммы разделения соединений мышьяка в исходной водоросли. Использование в качестве экстрагента раствора азотной кислоты способствовало оптимальному разделению пиков: органический мышьяк

Таблица 1. Характеристика лабораторных животных в экспериментах по острой и хронической токсичности образца водорослей

Параметры животных	Эксперимент 1	Эксперимент 2
Вид	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Mus musculus</i>
Линия/Сток	SD	CD-1
Источник	НПП «Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН»	
Возраст к началу введения, недель	8–12	–
Вес животных к началу эксперимента, г	250–300	27,9 ± 0,5 (самцы) 24,2 ± 0,3 (самки)
Количество самцов (М)	20	20
Количество самок (F)	20	20
Продолжительность эксперимента, сут.	3	21

Таблица 2. Дизайн эксперимента по исследованию острой и хронической токсичности ламинарии и фракций, полученных из неё

Группа	Пол	Кол-во животных в группе	Использованная фракция	Содержание фракции в суспензии, мг/мл	Наименование полученного образца	Объём введения, мл/кг массы животного
1	М	5	Исходная водоросль	10	Образец № 1	20
2		5	Супернатант	10/250*	Образец № 2	
3		5	Водорослевый экстракт	10	Образец № 3	
4		5	Носитель	0	Контроль	
5	F	5	Исходная водоросль	10	Образец № 1	
6		5	Супернатант	10/250*	Образец № 2	
7		5	Водорослевый экстракт	10	Образец № 3	
8		5	Носитель	0	Контроль	

* При исследовании хронической токсичности на мышах содержание супернатанта в суспензии для введения увеличено благодаря его хорошей растворимости.

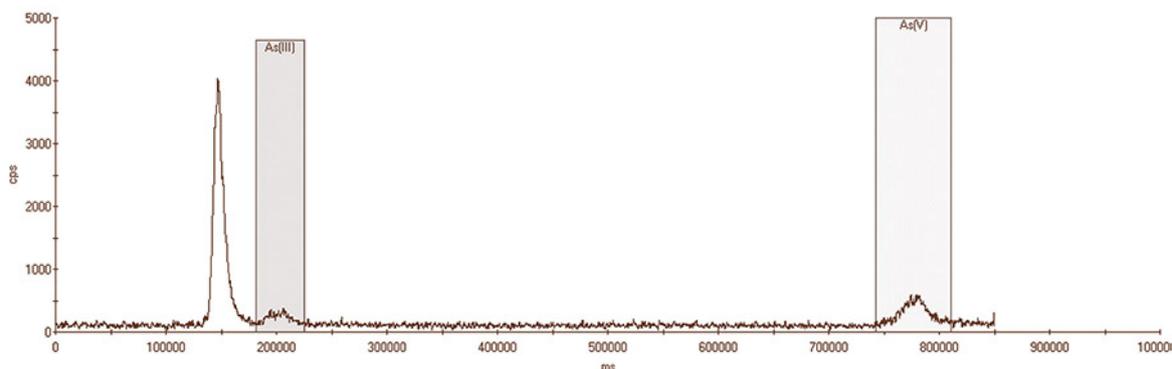


Рис. 2. Хроматограмма разделения образца исходной водоросли (экстрагент — 3,5%-ный раствор HNO_3)

выходит из колонки при времени удерживания 2,5 мин, трёхвалентный мышьяк As^{+3} при 3,5 мин и пятивалентный мышьяк As^{+5} при 12,5 мин.

Рассчитанные значения содержания мышьяка на основании хроматограмм для исследованных образцов приведены в табл. 3.

Согласно результатам анализов суммарное содержание общего мышьяка в исходной водоросли, супернатанте и водорослевом экстракте превышало 5 мг/кг — максимально допустимый уровень мышьяка в водорослях согласно ТР ТС 021/2011. Наиболее токсичные неорганические формы состави-

Таблица 3. Содержание общего и неорганического мышьяка в ламинарии и фракциях, полученных из неё

Наименование фракции	Содержание, мг/кг сухих веществ			Допустимый уровень
	Общий мышьяк	As^{+3}	As^{+5}	
Исходная водоросль	$27,2 \pm 1,4$	$1,32 \pm 0,07$	$2,32 \pm 0,12$	5
Супернатант	$45,7 \pm 2,3$	$2,35 \pm 0,12$	$4,25 \pm 0,21$	
Водорослевый экстракт	$17,7 \pm 0,9$	$0,43 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,06$	

ли от 6 до 14% от общего количества мышьяка в сырье.

Содержание органических соединений мышьяка в образцах рассчитывали по разности между общим и неорганическим мышьяком. Анализ распределения органических и неорганических соединений мышьяка в образцах ламинарии подтвердил известные литературные данные [Tukai et al., 2002; Llorente-Mirandes et al., 2011] о преобладании органической формы в исходной водоросли (рис. 3).

Из приведённых данных следует, что супернатант отличался повышенным содержанием, как общего (45,7 мг/кг сухого вещества) мышьяка, так и его неорганических форм (6,6 мг/кг сухого вещества). Проведённую пробоподготовку для водорослевого остатка условно можно считать подобной первой стадии технологической обработки водоросли —этапу мойки, при этом она позволяет

более чем в 2 раза снизить содержание неорганических соединений мышьяка.

В эксперименте по острой токсичности суспензии, приготовленные на основе фракции водорослей, вводили в желудок в дозе 200 мг/кг массы крысы. Количество общего и неорганического мышьяка, полученного при этом лабораторными животными, представлено в табл. 4.

Случаев гибели животных во время проведения эксперимента с введением в корм образцов № 1–3, достоверных отклонений в изменении массы тела крыс (табл. 5) и макроскопических отклонений внутренних органов (табл. 6) зафиксировано не было ни в одной группе животных.

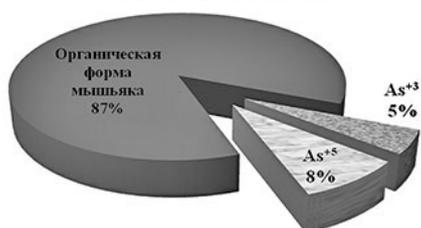
Таким образом, однократное введение суспензий исходной водоросли (образец № 1), супернатанта (образец № 2) и водорослевого остатка (образец № 3), содержащих 5,44 9,14 и 3,54 мкг мышьяка на кг массы крысы, соответственно, не оказывало токсического эффекта. В связи с этим проведены дальнейшие исследования возможной хронической токсичности мышьяксодержащих соединений при многократном введении тех же образцов лабораторным мышам линии CD-1.

Различие в содержании исследованных фракций в образцах (№ 1–10 мг/мл; № 2–250 мг/мл; № 3–10 мг/мл), вводившихся различным группам животных обусловлено неодинаковой растворимостью данных фракций. Супернатант хорошо растворим, поэтому вводился в форме истинного раствора; исходная водоросль и водорослевый экстракт нерастворимы, поэтому вводились в виде суспензий.

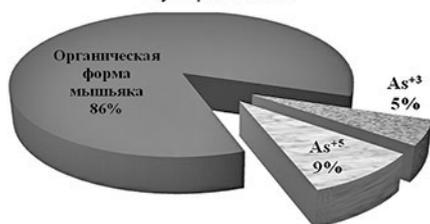
С учётом возможных объёмов введения, содержания фракции во вводимом объёме суспензии и содержания общего и неорганического мышьяка в образце рассчитана доза мышьяка, получаемая мышью в сутки, приведённая в табл. 7.

В течение 21 дня у животных регистрировали изменения массы тела (табл. 8), потребление корма, смертность, внешние проявления отклонений в состоянии здоровья, локомоторную активность. Для всех перечисленных показателей отклонений не об-

Распределение различных форм мышьяка в исходной водоросли



Распределение различных форм мышьяка в супернатанте



Распределение различных форм мышьяка в водорослевом экстракте

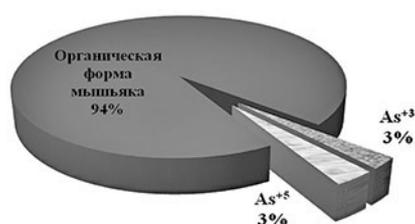


Рис. 3. Распределение различных форм мышьяка в ламинарии и фракциях, полученных из неё

Таблица 4. Количество мышьяка, полученного лабораторными крысами в эксперименте по острой токсичности

Наименование образца	Объем введения, мл/кг массы животного	Содержание фракции в суспензии, мг/мл	Доза общего мышьяка, мкг/кг крысы	Доза мышьяка As ⁺³ , мкг/кг крысы	Доза мышьяка As ⁺⁵ , мкг/кг крысы
Образец № 1	20	10	5,44	0,264	0,464
Образец № 2	20	10	9,14	0,470	0,850
Образец № 3	20	10	3,54	0,086	0,118
Контроль	20	0	0	0	0

Таблица 5. Средние значения массы тела исследованных лабораторных животных (крыс)

	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3	Контроль
Самцы				
1 день, г	252 ± 3,1	247 ± 4,7	245 ± 3,6	249 ± 2,5
3 день, г	253 ± 3,1	248 ± 4,9	247 ± 3,3	250 ± 2,5
Самки				
1 день, г	199 ± 2,0	195 ± 2,0	201 ± 1,1	200 ± 1,3
3 день, г	200 ± 2,2	196 ± 2,2	201 ± 1,3	200 ± 1,1

Таблица 6. Средние значения массы внутренних органов исследованных лабораторных животных (крыс), % к массе тела

	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3	Контроль
Селезёнка	0,24 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,28 ± 0,01
Почки	0,90 ± 0,05	0,90 ± 0,04	0,94 ± 0,3	0,89 ± 0,03
Печень	5,02 ± 0,25	5,24 ± 0,17	5,46 ± 0,19	5,36 ± 0,2
Сердце	0,41 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,53 ± 0,07
Лёгкие	0,55 ± 0,04	0,64 ± 0,03	0,67 ± 0,04	0,61 ± 0,04
Головной мозг	0,74 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,76 ± 0,02	0,78 ± 0,03

Таблица 7. Количество мышьяка, полученного лабораторными мышами в эксперименте по хронической токсичности

Наименование образца	Объем введения, мл/кг массы животного	Содержание фракции в суспензии, мг/мл	Доза общего мышьяка, мкг/кг мыши	Доза мышьяка As ⁺³ , мкг/кг мыши	Доза мышьяка As ⁺⁵ , мкг/кг мыши
Образец № 1	20	10	5,44	0,264	0,464
Образец № 2	20	250	228,50	11,75	21,25
Образец № 3	20	10	3,54	0,086	0,118
Контроль	20	0	0	0	0

наружено, случаев гибели животных зафиксировано не было. На 22 сутки эксперимента животных подвергали эвтаназии, с последующей некропсией, органы подвергали макроскопическому анализу. По результатам некропсии введение в рацион животных образцов с повышенным содержанием мышьяка не вызывало токсичных эффектов

и достоверных макроскопических отклонений органов у опытных групп мышей по сравнению с контролем.

Для большинства токсичных элементов в настоящее время определены токсикологические характеристики и установлены допустимые суточные дозы и условно переносимое недельное поступление (УПНП). Для

Таблица 8. Средние значения массы тела исследованных лабораторных животных (мышей)

	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3	Контроль
Самцы				
1 день, г	28,6 ± 1,0	27,0 ± 1,3	28,1 ± 0,9	28,6 ± 1,7
22 день, г	32,7 ± 1,4	29,5 ± 0,8	30,9 ± 1,4	32,0 ± 0,7
Прирост на 22 день, %	+14,4	+9,1	+10,1	+11,8
Самки				
1 день, г	24,3 ± 0,4	24,5 ± 0,4	23,9 ± 0,2	25,2 ± 0,4
22 день, г	24,5 ± 0,1	24,3 ± 0,4	24,9 ± 0,4	25,7 ± 0,2
Прирост на 22 день, %	+0,8	-1,0	+5,1	+1,9

мышьяка УПНП составляет 15 мкг/кг массы тела/неделю [ИЕСФА, 2010]. При пересчёте дозы вещества, полученной мышью, в эквивалентную дозу для человека в доклинической фармакологии используется коэффициент 12 [Гуськова, 2010]. С учётом этого коэффициента определено количество мышьяка, полученного за 7 дней в пересчёте на человека (табл. 9). Минимальная доза, полученная мышью за 7 дней, составляла 0,025 мг на кг массы тела, максимальная — 1,599 мг на кг массы тела. Полученные данные указывают на то, что при введении супернатанта условно переносимое недельное поступление мышьяка превышено в восемь раз по

общему и в 1,28 раз по неорганическим соединениям мышьяка.

Таким образом, исследование токсичности ламинарии *S. japonica*, выделенной из неё водорастворимой фракции супернатанта и водорослевого остатка, показало, что даже многократное превышение дозы общего мышьяка не оказывает токсического действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведённых исследований, установлено, что количество неорганических соединений мышьяка в образце ламинарии составляет менее 14% от общего содержания мышьяка. Исследование токсич-

Таблица 9. Характеристика дозы мышьяка, введённой мышам, в пересчёте на условно-переносимое недельное поступление мышьяка для человека

Показатель	Наименование образца			
	образец № 1 ³⁾	образец № 2 ³⁾	образец № 2 ⁴⁾	образец № 3 ³⁾
Доза мышьяка, полученного мышью мкг/кг/сут	5,44	228,5	33	3,54
Кол-во мышьяка, полученного мышью за 7 дней, мг/кг	0,038	1,599	0,231	0,025
Коэффициент пересчёта (мышь/человек) ¹⁾	1/12			
Кол-во мышьяка, получ. за 7 дней, в пересчёте на массу человека, мг/кг	0,0032	0,1325	0,0192	0,0021
УПНП мышьяка для человека, мг/кг ²⁾	0,015			
Превышение УПНП	нет	в 8,9 раз	в 1,28 раз	нет

Примечания:

¹⁾ — в соответствии с [Гуськова, 2010];

²⁾ — УПНП — условно переносимое недельное поступление мышьяка, установлено на уровне 0,015 мг/кг согласно ИЕСФА, 2010;

³⁾ — дозировка рассчитана на содержание общего мышьяка;

⁴⁾ — дозировка рассчитана на содержание неорганического мышьяка.

ности мышьяксодержащих соединений на лабораторных крысах и мышах показало отсутствие достоверных отклонений в росте, развитии и состоянии внутренних органов животных. Превышение условно переносимого недельного поступления в восемь раз по общему мышьяку и в 1,3 раза по неорганическому, полученное при пересчёте в эквивалентную дозу для человека, позволяет предположить, что содержание мышьяка в водорослях больше нормируемого допустимого уровня (5 мг/кг) не должно оказывать потенциального воздействия на здоровье человека.

ЛИТЕРАТУРА

- Аминина Н.М. 2011. Мышьяк в бурых водорослях // Рыбное хозяйство. № 6. С. 65–68.
- Аминина Н.М., Якуш Е.В., Блинов Ю.Г. 2015. О методах определения мышьяка в морских организмах // Рыбное хозяйство. № 5. С. 38–39.
- Вафина Л.Х., Подкорытова А.В. 2009. Новые продукты функционального питания на основе биоактивных компонентов бурых водорослей // Известия ТИНРО. Т. 156. С. 348–356.
- Гуськова Т.А. 2010. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований // Токсикологический вестник. № 5 (104). С. 2–6.
- Круглякова У.С., Багрянцева О.В., Евстратова А.Д., Малинкин А.Д., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. 2018. Раздельное количественное определение органических и неорганических форм мышьяка в морепродуктах // Анализ риска здоровью. № 2. С. 112–118.
- Петруханова А.В., Гершунская В.В., Абрамова Л.С. 2012. Мониторинг содержания мышьяка в водных биологических ресурсах и продукции из них // Рыбная промышленность. № 1. С. 8–9.
- Щукин В.М., Кузьмина Н.Е., Ерина А.А., Яшкир В.А., Меркулов В.А. 2018. Сравнительный анализ содержания тяжёлых металлов, алюминия и мышьяка в бурых водорослях различного происхождения // Химико-фармацевтический журнал. Т. 52. № 7. С. 30–36.
- Щукин В.М., Ерина А.А., Лисман Е.С., Ваганова О.А. 2019. Проблемы нормирования мышьяка в бурых водорослях и лекарственных препаратах на их основе // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Т. 9. № 3. С. 167–172.
- Andrewes P., Demarini D.M., Funasaka K., Wallace K., Lai V.W.M., Sun H.S., Cullen W.R., Kitchin K.T. 2004. Do arsenosugars pose a risk to human health? The comparative toxicities of a trivalent and pentavalent arsenosugar // Environ. Sci. Technol. 38 (15). 4140–4148.
- Gomez-Zavaglia A., Prieto Lage., M.A., Jimenez-Lopez C., Mejuto J.C., Simal-Gandara J. 2019. The Potential of Seaweeds as a Source of Functional Ingredients of Prebiotic and Antioxidant Value // Antioxidants. V.8. P. 406.
- EFSA. 2009. Scientific opinion on arsenic in food. EFSA panel on contaminants in the food chain. EFSA J. 7, 198.
- EFSA. 2014. Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. EFSA J. 12, 68.
- Hsieh Y.J., Jiang S.J. 2012. Application of HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS procedures for arsenic speciation in seaweeds // J. of Agricultural and Food Chemistry, V. 60. № 9. P. 2083–2089.
- JECFA. 2010. Summary and conclusions of the seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). P. 1–16. Accessible via: https://www.who.int/foodsafety/chem/summary72_rev.pdf. 30.06.2020.
- Kumari B., Kumar V., Sinha A.K., Ahsan J., Ghosh A.K., Wang H., DeBoeck G. 2017. Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems // Environ Chem Lett. V.15. P. 43–64.
- Llorente-Mirandes T., Ruiz-Chancho M.J., Barbero M., Rubio R., Lopez-Sanchez J.F. 2011. Determination of water-soluble arsenic compounds in commercial edible seaweed by LC-ICPMS // J. Agric. Food Chem. 59 (24), 12963–12968.
- Ma Z., Lin L., Wu M., Yu H., Shang T., Zhang T., Zhao M. 2018. Total and inorganic arsenic contents in seaweeds: Absorption, accumulation, transformation and toxicity // Aquaculture. V. 497. P. 49–55.
- Reis V.A.T., Duarte A.C. 2018. Analytical methodologies for arsenic speciation in macroalgae: a critical review // Trends Anal. Chem. V.102. P. 170–184.
- Rose M., Lewis J., Langford N., Baxter M., Origgi S., Barber M. 2007. Arsenic in seaweeds —forms, concentration, and dietary exposure // Food Chem Toxicol. V. 45 P. 1263–1267.
- Sakurai T, Kaise T, Ochi T, Saitoh T, Matsubara C. 1997. Study of in vitro cytotoxicity of a water-soluble organic arsenic compound, arsenosugar, in seaweed // Toxicology. 122(3):205–12.
- Salgado S.G., Quijano Nieto M.A., Bonilla Simón M.M. 2006. Optimisation of sample treatment for arsenic speciation in alga samples by focussed sonication and ultrafiltration // Talanta. V.68. № .5. P. 1522–1527.
- Taylor V., Goodale B., Raab A., Schwerdtle T., Reimer K., Conklin S., Karagas M.R., Francesconi K.A. 2017. Human exposure to organic arsenic species from seafood // Science of The Total Environment. V. 580. P. 266–282.
- Tukai R., Maher W.A., McNaught I.J., Ellwood M.J. 2002. Measurement of arsenic species in marine macroalgae by microwave-assisted extraction

- and high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta* 457 (2), 173–185.
- Twaddle N.C., Vanlandingham M., Beland F.A., Doerge D.R. 2019. Metabolism and disposition of arsenic species from controlled dosing with dimethylarsinic acid (DMAV) in adult female CD-1 mice. V. Toxicokinetic studies following oral and intravenous administration // *Food and Chemical Toxicology*. V. 130. P. 22–31.
- Van Hulle M., Zhang C., Zhang X., Cornelis R. 2002. Arsenic speciation in chinese seaweeds using HPLC–ICP-MS and HPLC-ES-MS. // *Analyst*. V. 127. № 5. P. 634–640.
- Zhao Y., Shang D., Ning J., Zhai Y. 2012. Arsenic and cadmium in the marine macroalgae (*Porphyra yezoensis* and *Laminaria japonica*) —forms and concentrations // *Chem. Speciat. Bioavailab.* 24, 197–203.

Поступила в редакцию 03.07.2020 г.
Принята после рецензии 09.10.2020 г.

Trudy VNIRO

2020. Vol. 181

Aquatic bioresources processing technologies

Study of toxicity of arsenic-containing compounds isolated from brown algae *Saccharina japonica* in laboratory animals

L.S. Abramova¹, V.V. Gershunskaya¹, A. V. Kozin¹, D.A. Bondarenko², A.N. Murashev²

¹ Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (FSBSI «VNIRO»), Moscow, Russia

² The Branch of the M.M. Shemyakin, Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS (FSBIS «BIBCh RAS»), Pushchino, Russia

The ability of various marine organisms, especially algae and invertebrates, to accumulate arsenic in high concentrations can pose a threat to public health when consumed. It is known from the literature that inorganic arsenic compounds (arsenites and arsenates) are the most toxic, in comparison with methylated forms of the element, and especially with complex organic compounds (arsenobetain, arsenocholine, tetramethylarsonium, arsenoriboses), which are considered non-toxic for live organisms. Monitoring of safety indicators of aquatic biological resources in the main commercial basins of the Russian Federation has shown that the most common excess of total arsenic content is characteristic for algae. According to TR CU 021/2011, the total arsenic content in algae should be 5 mg / kg and the established norm without separation of organic and inorganic arsenic compounds creates a barrier to the rational use of seafood. In this regard, the justification of the norms for the content of inorganic arsenic in algae and the assessment of their toxicity is a very urgent problem. Study of the samples of commercial brown algae *Saccharina* (= *Laminaria*) *japonica* and its derivatives with ICP-MS, HPLC–MS-ISP methods, the maximum permissible level of arsenic was found to be exceeded, but the most toxic inorganic forms made up from 6 to 14% of the total amount of arsenic in the raw material. Acute toxicity on laboratory animals (rats) was studied and the absence of toxic effects was shown when an oral suspension containing high doses of arsenic was administered. Repeated administration of the same substances to laboratory mice of the CD-1 line has shown no toxic effects even after multiple doses of arsenic isolated from algae.

Keywords: algae, inorganic arsenic compounds, acute toxicity, chronic toxicity, laboratory animals.

DOI: 10.36038/2307-3497-2020-181-223-234

REFERENCES

- Aminina N.M.* 2011. Mysh'yak v buryh vodoroslyah [Arsenic in brown seaweeds] // *Rybnoe hozyajstvo*. № 6. S. 65–68.
- Aminina N.M., Yakush E.V., Blinov Yu.G.* 2015. O metodah opredeleniya mysh'yaka v morskikh organizmah [The methods of arsenic speciation in seafood] // *Rybnoe hozyajstvo*. № 5. S.38–39.
- Vafina L.Kh., Podkorytova A.V.* 2009. Novye produkty funktsional'nogo pitaniya na osnove bioaktivnykh komponentov buryh vodoroslei [New products of functional nutrition on the basis of bioactive substances from brown algae] // *Izvestiya TINRO*. T. 156. S. 348–356.
- Gus'kova T.A.* 2010. Doklinicheskoe toksikologicheskoe izuchenie lekarstvennykh sredstv kak garantiya bezopasnosti provedeniya ih klinicheskikh issledovaniy [Preclinical Toxicological study of medicinal products as a guarantee of the safety of their clinical research] // *Toksikologicheskij vestnik*. № 5 (104). S. 2–6.
- Petruhanova A.V., Gershunskaya V.V., Abramova L.S.* 2012. Monitoring sodержaniya mysh'yaka v vodnykh biologicheskikh resursakh i proizvodii iz nih [Monitoring of arsenic content in aquatic biological resources and seafood] // *Rybnaya promyshlennost'*. № 1. S. 8–9.
- Kruglyakova U.S., Bagryanceva O.V., Evstratova A.D., Malinkin A.D., Gmoshinskij I.V., Hotimchenko S.A.* 2018. Razdel'noe kolichestvennoe opredelenie organicheskikh i neorganicheskikh form mysh'yaka v moreproduktah [Separate quantitative determination of organic and non-organic arsenic in sea products] // *Analiz riska zdorov'yu*. № 2. S. 112–118.
- Shchukin V.M., Kuz'mina N.E., Erina A.A., Yashkir V.A., Merkulov V.A.* 2018. Sravnitel'nyj analiz sodержaniya tyazhelykh metallov, alyuminiya i mysh'yaka v buryh vodoroslyah razlichnogo proiskhozhdeniya [Comparative analysis of the heavy metal, aluminum, and arsenic contents in brown algae of various origins] // *Himikofarmaceuticheskij zhurnal*. T. 52. № 7. S. 30–36.
- Shchukin V.M., Erina A.A., Lisman E.S., Vaganova O.A.* 2019. Problemy normirovaniya mysh'yaka v buryh vodoroslyah i lekarstvennykh preparatah na ih osnove [Problems of establishing limits for arsenic content in brown algae and brown algae-containing medicinal products] // *Vedomosti Nauchnogo centra ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya*. T. 9. № 3. S. 167–172.
- Andrewes P., Demarini D.M., Funasaka K., Wallace K., Lai V.W.M., Sun H.S., Cullen W.R., Kitchin K.T.* 2004. Do arsenosugars pose a risk to human health? The comparative toxicities of a trivalent and pentavalent arsenosugar // *Environ. Sci. Technol.* 38 (15). 4140–4148.
- Gomez-Zavaglia A., Prieto Lage, M.A., Jimenez-Lopez C., Mejuto J.C., Simal-Gandara J.* 2019. The Potential of Seaweeds as a Source of Functional Ingredients of Prebiotic and Antioxidant Value // *Antioxidants*. V. 8. P. 406.
- EFSA.* 2009. Scientific opinion on arsenic in food. EFSA panel on contaminants in the food chain. *EFSA J.* 7, 198.
- EFSA.* 2014. Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. *EFSA J.* 12, 68.
- Hsieh Y.J., Jiang S.J.* 2012. Application of HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS procedures for arsenic speciation in seaweeds // *J. of Agricultural and Food Chemistry*, V. 60. № 9. P. 2083–2089.
- JECFA.* 2010. Summary and conclusions of the seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). P. 1–16. Accessible via: https://www.who.int/foodsafety/chem/summary72_rev.pdf. 30.06.2020.
- Kumari B., Kumar V., Sinha A.K., Ahsan J., Ghosh A.K., Wang H., DeBoeck G.* 2017. Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems // *Environ Chem Lett*. V.15. P. 43–64.
- Llorente-Mirandes T., Ruiz-Chancho M.J., Barbero M., Rubio R., Lopez-Sanchez J.F.* 2011. Determination of water-soluble arsenic compounds in commercial edible seaweed by LC-ICPMS // *J. Agric. Food Chem.* 59 (24), 12963–12968.
- Ma Z., Lin L., Wu M., Yu H., Shang T., Zhang T., Zhao M.* 2018. Total and inorganic arsenic contents in seaweeds: Absorption, accumulation, transformation and toxicity // *Aquaculture*. V. 497. P. 49–55.
- Reis V.A.T., Duarte A.C.* 2018. Analytical methodologies for arsenic speciation in macroalgae: a critical review // *Trends Anal. Chem.* V.102. P. 170–184.
- Rose M., Lewis J, Langford N, Baxter M, Origgi S, Barber M.* 2007. Arsenic in seaweeds —forms, concentration, and dietary exposure // *Food Chem Toxicol.* V. 45 P. 1263–1267.
- Sakurai T, Kaise T, Ochi T, Saitoh T, Matsubara C.* 1997. Study of in vitro cytotoxicity of a water-soluble organic arsenic compound, arsenosugar, in seaweed // *Toxicology*. 122(3):205–12.
- Salgado S.G., Quijano Nieto M.A., Bonilla Simón M.M.* 2006. Optimisation of sample treatment for arsenic speciation in alga samples by focussed sonication and ultrafiltration // *Talanta*. V.68. № .5. P. 1522–1527.
- Taylor V., Goodale B., Raab A., Schwerdtle T., Reimer K., Conklin S., Karagas M.R., Francesconi K.A.* 2017. Human exposure to organic arsenic species from seafood // *Science of The Total Environment*. V. 580. P. 266–282.
- Tukai R., Maher W.A., McNaught I.J., Ellwood M.J.* 2002. Measurement of arsenic species in marine macroalgae by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta* 457 (2), 173–185.

- Twaddle N.C., Vanlandingham M., Beland F.A., Doerge D.R.* 2019. Metabolism and disposition of arsenic species from controlled dosing with dimethylarsinic acid (DMAV) in adult female CD-1 mice. V. Toxicokinetic studies following oral and intravenous administration // *Food and Chemical Toxicology*. V. 130. P. 22–31.
- Van Hulle M., Zhang C., Zhang X., Cornelis R.* 2002. Arsenic speciation in chinese seaweeds using HPLC–ICP-MS and HPLC-ES-MS. // *Analyst*. V. 127. № 5. P. 634–640.
- Zhao Y., Shang D., Ning J., Zhai Y.* 2012. Arsenic and cadmium in the marine macroalgae (*Porphyra yezoensis* and *Laminaria japonica*) —forms and concentrations // *Chem. Speciat. Bioavailab.* 24, 197–203.

TABLE CAPTIONS

- Table 1.** Characteristics of laboratory animals in the experiment on acute and chronic toxicity of algae samples
- Table 2.** Design of the experiment on acute and chronic toxicity of algae samples
- Table 3.** Content of total and inorganic arsenic in algae samples
- Table 4.** The volume of arsenic gained by laboratory rats in the acute toxicity experiment
- Table 5.** Average body weight of the laboratory animals (rats)
- Table 6.** Average values of organ weights of the laboratory animals (rats)
- Table 7.** The volume of arsenic gained by laboratory mice in the chronic toxicity experiment
- Table 8.** Average body weight of the laboratory animals (mice)
- Table 9.** Characteristics of the arsenic dose administered to mice in conversion to provisional tolerable weekly intake of arsenic for humans

FIGURE CAPTIONS

- Fig. 1.** Calibration dependencies for AsIII and AsV
- Fig. 2.** Chromatogram of sample No. 1 separation (extractant solution of 3,5% HNO₃)
- Fig. 3.** Distribution of various arsenic compounds in algae samples