

POZIOM POLIBROMOWANYCH ETERÓW DIFENYLOWYCH W ŻYWNOŚCI

STRESZCZENIE

Polibromowane etery difenyłowe jest to grupa związków halogenoorganicznych dodawanych do wielu różnego rodzaju tworzyw sztucznych w celu zmniejszenia ich palności. Są one podobne pod względem chemicznym i toksykologicznym do innych związków halogenoorganicznych takich jak np. polichlorowane bifenyly (PCB). Stwierdzono, że główną drogą wprowadzania tych substancji do organizmu jest żywność, przede wszystkim zawierająca znaczne ilości tłuszczu pochodzenia zwierzęcego. W celu oceny poziomu polibromowanych eterów difenyłowych (PBDE) w produktach żywności poddano analizie 5 różnych rodzajów żywności. Analizowano próbki: masła, jaj, produktów czekoladowych oraz tkankę tłuszczową wieprzową i wołową. Z każdego rodzaju żywności poddano analizie trzy produkty pochodzące od trzech różnych producentów. Wszystkie produkty żywnościowe zostały kupione na terenie Krakowa. Zastosowano trzystopniową metodę oczyszczania próbek przed analizą GC-MS/MS. W próbkach oznaczano kongenery z grup triBDE do heptaBDE. Najwyższe zawartości uzyskano dla kongenerów z grup tetraBDE i pentaBDE. Sumaryczna zawartość kongenerów tych dwóch grup stanowiła 90% całkowitej zawartości PBDE w badanych produktach.

WSTĘP

Jedne z pierwszych doniesień na temat polibromowanych eterów difenyłowych w środowisku pochodzą z 1981 roku, kiedy to Anderson i Blomkvist wykazali bardzo wysokie stężenia PBDE w tkankach ryb oraz osadach dennych rzeki Viskan na północy Szwecji. Rzeka ta płynie przez tereny, na których zlokalizowane były liczne zakłady wykorzystujące PBDE w produkcji materiałów tekstylnych [1,2].

Od tego czasu, PBDE oznaczono w próbkach osadów ściekowych, osadów dennych, glebie, powietrzu. Wykazano również gwałtownie rosnące stężenia tych związków w różnego rodzaju organizmach żywych, w tym również w tkankach i mleku ludzkim. Przykładem może być prowadzona w Szwecji analiza próbek mleka ludzkiego. Badania te wykazały, że w latach 1972-1997 nastąpił 60-krotny wzrost stężeń PBDE w tych próbkach [3].

PBDE są używane do obniżania palności wielu typów polimerów. Są to polimery termoplastyczne, sieciowane żywice, kauczuki, pianki poliuretanowe, farby i lakiery, oraz materiały tekstylne. Zawartość PBDE w takich tworzywach może wynosić nawet do 30% masy gotowego tworzywa [4,5]. PBDE są wykorzystywane w wielu gałęziach przemysłu: w

budownictwie, przemyśle stoczniowym, lotniczym, przy produkcji przedmiotów codziennego użytku, w tym różnego typu urządzeń elektrycznych [4,6,7].

PBDE są zaliczane do grupy antypirenów addytywnych, a to oznacza, że substancje te nie wiążą się z materiałem polimeru trwałym wiązaniem chemicznym, w związku z tym istnieje realne zagrożenie przedostawania się ich do środowiska naturalnego [8]. Substancje te wykazują wysoką trwałość, silne właściwości lipofilowe, możliwość bioakumulacji i toksyczność [1,2]. PBDE coraz częściej zaliczane są do grupy substancji stanowiącej globalne zanieczyszczenie. Negatywny wpływ na organizmy żywe powoduje coraz większe zainteresowanie tymi związkami. Pożywienie jest głównym źródłem wprowadzania PBDE do organizmu człowieka, szczególnie tetra i pentaBDE [9,10,11,12]. Ocenia się, że około 70% całkowitego spożycia PBDE (123ng/dzień/osobę) zachodzi wraz z pokarmem, a jako główne źródło podaje się tłuste ryby [12,13].

MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ

Materiał do badań Materiał do badań stanowiły wybrane produkty żywności takie jak: masło, wyroby czekoladowe, jaja, tkanka tłuszczowa: wieprzowa i wołowa. Wszystkie produkty zostały kupione na terenie Krakowa w latach 2004 - 2006. Do czasu przygotowania ekstraktów tłuszczowych tkankę tłuszczową wieprzową i wołową przechowywano w lodówce w temperaturze -10°C, pozostałe próbki w temperaturze +4°C. Próbki przed ekstrakcją, poddano liofilizacji przez jedną lub dwie doby w zależności od rodzaju próbki.

Odczynniki i materiały Wszystkie wykorzystane odczynniki i materiały były o najwyższej dostępnej czystości. Rozpuszczalniki organiczne: n-heksan, dichlorometan, aceton pochodziły z POCh S.A. w Gliwicach. Bezwodny siarczan sodu, kwas siarkowy, wodorotlenek sodu pochodziły z J.T.Baker. Żel krzemionkowy był produktem handlowym Merck. Żel krzemionkowy przed użyciem aktywowano w temperaturze 200°C przez 24h, a następnie przechowywano w eksykatorze do czasu użycia. Żel krzemionkowy modyfikowany stężonym kwasem siarkowym przygotowano przez zmieszanie odpowiednich ilości żelu krzemionkowego i kwasu siarkowego, aby uzyskać jednolitą mieszaninę 44% wagowo kwasu siarkowego na żelu. Żel krzemionkowy modyfikowany wodorotlenkiem sodu przygotowano przez zmieszanie odpowiednich ilości 1M roztworu NaOH i żelu krzemionkowego, aby uzyskać jednolitą mieszaninę 2% wagowo NaOH na żelu. Tlenek glinu (ICN Alumina B-Super I) – produkt handlowy EcoChrom, ICN Biomedicals GmbH. Tlenek glinu aktywowano w temperaturze 130°C i przechowywano w tej temperaturze do czasu użycia. Membrany do

oczyszczania próbek (SPM) są produktem Expos Meter AB, Tavelsjo, Szwecja. Membrany wykonane są z folii z polietylenu niskiej gęstości (LDPE), w postaci rękawa o długości 200 – 300 mm i średnicy ok. 25 mm. Przed użyciem membrany kondycjonowano w heksanie, przez co najmniej 72h.

Wzorce Wszystkie wykorzystane wzorce są produktem Wellington Laboratories, Guelph, Ontario, Kanada. W analizie użyto wzorce BDE-CS1-5, które zawierają 20 naturalnych kongenerów PBDE (mono-BDE-3, di-BDE-7, -15, tri-BDE-17, -28, tetra-BDE-47,-49,-66,-71,-77, penta-BDE-85, -99, -100, -119, -126, hexa-BDE-138, -153, -154, hepta-BDE-183 i deka-BDE-209) oraz 10 kongenerów znaczonych izotopowo węglem ^{13}C (mono- ^{13}C -BDE-3, di- ^{13}C -BDE-15, tri- ^{13}C -BDE-28, tetra- ^{13}C -BDE-47, penta- ^{13}C -BDE-99, hexa- ^{13}C -BDE-139, -153, -154, hepta- ^{13}C -BDE-183, deka- ^{13}C -BDE-209), o stężeniu kongenerów naturalnych 1-400 ng/ml i stężeniu kongenerów znaczonych 100 [ng/ml].

Jako wzorzec wewnętrzny oczyszczania próbki w oznaczaniu PBDE wykorzystano mieszaninę wzorcową BDE-CSS przygotowaną z wzorców MBDE-MXA lot MBDEMXA1199 i MBDE-MXB lot MBDEMXP0200. Wzorzec zawiera kongenery znaczone izotopem węgla ^{13}C PBDE : BDE-28, BDE-47, BDE-99, BDE-153, BDE-154, BDE-183 o stężeniu 50 ng/ml w nonanie. Jako wzorzec odzysku (strzykawkowy) wykorzystano wzorzec PCDD (EPA 1613ISS). Wzorzec zawiera roztwór dwóch kongenerów ^{13}C – 1,2,3,4-TCDD i ^{13}C – 1,2,3,7,8,9 –HxCDD o stężeniu każdego 200 ng/ml w nonanie.

Ekstrakcja Ekstrakt tłuszczu czekolady przygotowano przez rozpuszczenie 100g czekolady w zlewce w 100ml heksanu. Po 24h po całkowitym rozdzieleniu się dwóch warstw: stałej-pył kakaowy i ciekłej- tłuszcz rozpuszczony w heksanie warstwę ciekłą odebrano przy pomocy pipety do kolby i odparowano na obrotowej wyparce próżniowej do uzyskania stałej masy.

Ekstrakt tłuszczowy masła przygotowano z 100g masła. Pokrojoną próbkę umieszczono w zlewce i ogrzewano w suszarce nagrzałej do temperatury 105°C na czas 2h. Po tym czasie pipetą odebrano wytopiony tłuszcz i zważono.

Ekstrakt tłuszczowy wieprzowiny i wołowiny przygotowano z 100g tkanki tłuszczowej. Pokrojoną tkankę tłuszczową umieszczono w zlewce i ogrzewano w suszarce nagrzałej do temperatury 150°C przez 5h. Po tym czasie pipetą odebrano wytopiony tłuszcz i zważono.

Ekstrakty tłuszczowe jaj przygotowano przez zważenie 30g suchej masy rozdrobnionego produktu. Próbki umieszczano w celulozowej gilzie, zasypano kilkoma gramami bezwodnego siarczanu sodu i całość zamknięto warstwą waty szklanej. Gilzę umieszczono w aparacie

Soxhleta i prowadzono ekstrakcję dichlorometanem przez 8 godzin.

Metody oczyszczania Oczyszczaniu przy zastosowaniu metody SPM poddawano 5g tłuszczu rozpuszczonego w 10ml roztworu DCM/Hx (1:9). Do roztworu dodawano 50 µl wzorca wewnętrznego BDE-CSS i umieszczano wewnątrz rękawa membrany. Jako rozpuszczalnik odbierający zastosowano heksan. Dializę prowadzono przez 48h zmieniając porcję rozpuszczalnika odbierającego po upływie 24h. Drugim etapem była dalsza redukcja matrycy organicznej przy użyciu kolumn wypełnionych żelem krzemionkowym kwaśnym (8g) i alkalicznym (2g). Jako eluent zastosowano heksan. Ostatnim etapem oczyszczania był rozdział na kolumnie wypełnionej tlenkiem glinu (5g). Zastosowano trzy rozpuszczalniki wymywające, aby tylko trzeci z nich- roztwór DCM/Hx (1:1) wymywał badany analit, a dwa pierwsze zostały odrzucone. Próbkę zostały odparowane na obrotowej wyparce próżniowej do objętości 1 ml a następnie w strumieniu gazu obojętnego do końcowej objętości 50 µl, jako rozpuszczalnika wysokowrzącego użyto dekan. Na końcu dodano 2 µl wzorca wewnętrznego odzysku (EPA 1613ISS). Próbkę przechowywano w lodówce do czasu analizy chromatograficznej.

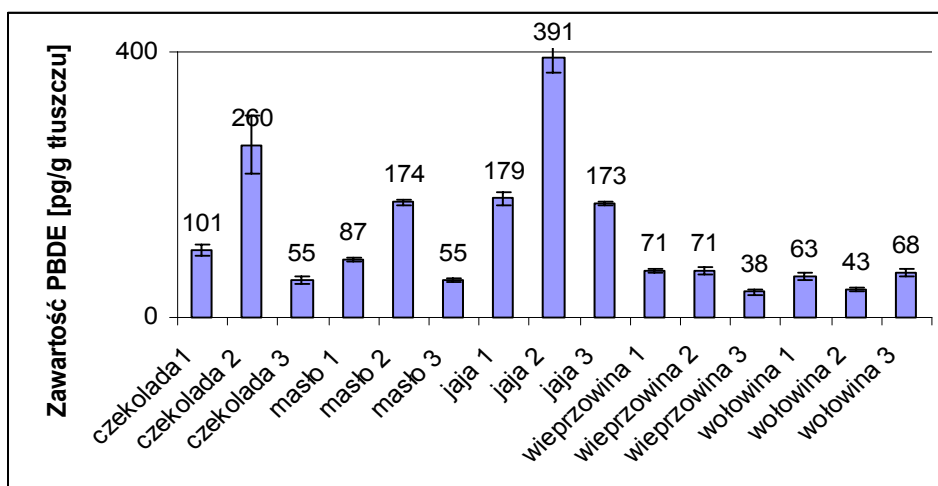
Analiza GC-MS/MS W analizie wykorzystano chromatograf gazowy CE Trace 2000 wyposażony w spektrometr mas Finnigan GCQ Plus GC-MS/MS. Detekcję analizowanych związków prowadzono z wykorzystaniem spektrometru mas wyposażonego w pułapkę jonową. Analizę prowadzono w oparciu o technikę monitorowania wybranego jonu (SIM) z podwójną fragmentacją cząsteczki MS/MS. Rejestrowano jony macierzyste powstające w pułapce jonowej wskutek bombardowania strumieniem elektronów (M^+) oraz powstające z jonów pierwotnych, wskutek kolizji z atomami helu, jony wtórne $(M-Br_2)^+$ i $(M-Br_2-COBr)^+$. Metoda MS/MS umożliwia bardzo wysoką selektywność analizy i równocześnie wysoki poziom wykrywalności badanego związku. Rozdzielanie chromatograficzne prowadzi się przy użyciu kolumn o niskiej polarności takich jak: ZB-5MS o długości 30m, średnicy wewnętrznej 0,25mm i grubości fazy stacjonarnej 0,25µm, w programie z narostem temperatury w zakresie 100°C do 300°C.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Prezentowane wyniki pokazują pierwsze w Polsce badania zawartości PBDE w polskiej żywności. Opracowane wyniki pokazują charakterystyczny profil kongenerowy w analizowanej żywności oraz sumaryczną zawartość 19 oznaczanych kongenerów PBDE.

Zawartość PBDE w analizowanych próbkach żywności przedstawiono w sposób graficzny na rysunku 1. Na wykresie uwzględniono wartości odchyłeń standardowych dla $n=3$.

Wszystkie wyniki zostały podane w przeliczeniu na masę tłuszczu, ponieważ takie przedstawienie wyników jest właściwe w przypadku analizy próbek o dużej zawartości tłuszczu. Analizowana żywność zawierała od 20% w przypadku wyrobów czekoladowych do 75% tłuszczu w przypadku próbek masła.



Rys. 1. Sumaryczna zawartość PBDE w próbkach żywności

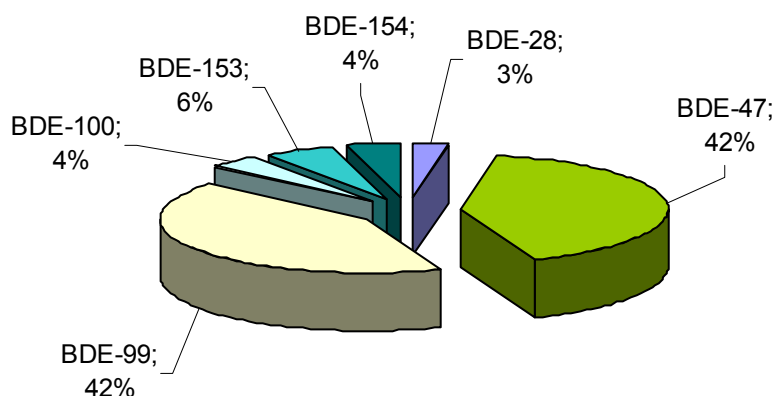
Prezentowane na rysunku 1 wyniki przedstawiają sumaryczną zawartość 6 oznaczonych kongenerów w analizowanej żywności: BDE-28, BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154. Zawartości pozostałych kongenerów PBDE były poniżej granicy oznaczalności. Analizy próbek wieprzowiny pokazują znaczne różnice w stężeniach w zależności od kraju pochodzenia próbki. Uzyskane wyniki są na porównywalnym poziomie jak te uzyskane w Japonii [14] oraz kilkakrotnie niższe niż wyniki uzyskane w Australii [15] oraz Norwegii [19]. Średnia sumaryczna zawartość PBDE w próbkach wieprzowiny, pobranej na terenie Australii była na poziomie 5,6 ng/g tłuszczu [15], w Norwegii 105 pg/g tłuszczu [19], natomiast w Japonii 64 pg/g tłuszczu [14]. 98% całkowitej zawartości PBDE w tych próbkach stanowiło pięć kongenerów PBDE: BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154. Są one uważane za najbardziej rozpowszechnione w środowisku naturalnym [15].

Analiza próbek wołowiny przeprowadzona w Japonii pokazuje zawartość PBDE w tkance wołowej na poziomie 16 pg/g tłuszczu [14]. Tak samo jak poprzednio ukazał się charakterystyczny profil kongenerowy, z dominującym udziałem kongenerów z grup tetraBDE i pentaBDE. Przeprowadzone w Norwegii badania oceniające poziom PBDE w żywności wykazały wyższe zawartości PBDE w tkance tłuszczowej wołowej niż w

prezentowanych badaniach. W tym przypadku zawartość PBDE w tkance tłuszczowej wołowej wynosiła średnio 135 pg/g tłuszczu [19].

Również w przypadku analizowanych próbek jaj i masła w prezentowanych badaniach uzyskano wartości niższe od uzyskanych w badaniach prowadzonych w Norwegii. Zawartość PBDE w próbkach masła wynosiła średnio 227 pg/g tłuszczu, natomiast w przypadku jaj 3852 pg/g tłuszczu [19].

Pomimo różnic w sumarycznych zawartościach PBDE w żywności stwierdzono duże podobieństwa między profilem kongenerowym w analizowanych próbkach. Po obliczeniu średnich procentowych zawartości poszczególnych kongenerów PBDE w próbkach: czekolad, masel, wieprzowiny, wołowiny i jaj na rysunku 2 przedstawiono w sposób graficzny ogólny profil rozkładu kongenerów w analizowanej żywności. Dla tego typu żywności w największych ilościach oznaczono kongenery: BDE-47 i BDE-99. Sumarycznie stanowiły one ponad 80% całkowitej sumy wszystkich oznaczonych kongenerów PBDE. Taki charakterystyczny rozkład kongenerów w żywności potwierdzają dane literaturowe. Fakt taki jest często kojarzony ze składem mieszanek technicznych pentaBDE i oktaBDE, w których kongenery z grup tetraBDE i pentaBDE występują w największych ilościach.



Rys.2. Profil kongenerowy PBDE w próbkach żywności (czekolady, masła, jaj, wieprzowiny, wołowiny)

Kongenerem o największym stopniu wnikania z pokarmu jest kongener BDE-47. Szacuje się, że około 90% spożytego z pokarmem BDE-47 pozostaje w organizmie. Kongenery o większej ilości atomów bromu w cząsteczce mają wartości odpowiednio niższe: BDE-99 - 62%, BDE-153 - 40% [16]. Badania krwi oraz tkanek ludzkich potwierdzają

występowanie kongenerów BDE-47 i BDE-99 w największych ilościach. PBDE uważa się za substancje uciążliwe dla środowiska głównie ze względu na możliwość bioakumulacji tych substancji w tkance tłuszczowej organizmów żywych [17]. Badania potwierdzają wyższe stężenia kongenerów tetraBDE i pentaBDE niż pozostałych kongenerów w próbkach biologicznych. Liczne analizy różnego rodzaju materiału biologicznego wykazały selektywną bioakumulację tych grup kongenerów [1,6,18]. TetraBDE i pentaBDE przyłączają się w organizmach żywych do receptorów związków organicznych (Ah receptorów), dzięki którym mogą przenikać przez błonę komórkową do wnętrza komórki i do jądra komórkowego. Natomiast wyżej bromowane kongenery PBDE są cząsteczkami o zbyt dużym ciężarze molekularnym i rozmiarach, dlatego zostają „odfiltrowane” przez błony komórkowe. Badania laboratoryjne na myszach wykazały, że PBDE w organizmach żywych gromadzą się głównie w tkance tłuszczowej, wątrobie, płucach i mózgu [8].

WNIOSKI

Prezentowane wyniki badań można traktować jako wstępne badania nad oznaczaniem PBDE w żywności w Polsce. Badania wykazały obecność PBDE w żywności, dlatego celowe wydaje się prowadzenie dalszych badań nad oznaczaniem PBDE w żywności. Charakterystyczny profil kongenerowy PBDE w próbkach żywności, w którym dominują kongenery o największym stopniu bioakumulacji w organizmach żywych, stawia konieczność stałej kontroli poziomu stężeń PBDE w żywności.

CYTOWANA LITERATURA

- [1] Alae M., Sergeant D. B., Ikonomou M. G., Luross J. M., A gas chromatography/high – resolution mass spectrometry (GC/HRMS) method for determination of polybrominated diphenyl ethers in fish, *Chemosphere* 44 (2001) 1489-1495
- [2] Tjärnlund U., Ericson G., Örn U., de Wit C., Balk L., Effects of two Polybrominated Diphenyl Ethers on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed via Food, *Marine Environmental Research* 46, No.1-5, (1998) 107-112
- [3] She J., Petreas M., Winkler J., Visita P., McKinney M., Kopec D., PBDE in the San Francisco Bay Area; measurements in harbor seal blubber and human breast adipose tissue, *Chemosphere* 46 (2002) 697-707
- [4] Luross J.M., Alae M., Sergeant D.B., Cannon C.M., Whittle D.M., Solomon K.R., Muir D.C.g., Spatial distribution of polybrominated diphenyl ethers and polybrominated biphenyls in lake trout from the Laurentian Great Lakes, *Chemosphere* 46(2002) 665-672
- [5] Alae M., Wenning R.J., The significance of brominated flame retardants in the environment: current understanding, issues and challenges., *Chemosphere* 46 (2002) 579-582
- [6] Martin M., Lam P.K.S., Richardson B.J., An Asian quandary: where have all of the PBDEs gone?, *Marine Pollution Bulletin* 49 (2004) 375-382

- [7] Darnerud P.O., Toxic effects of brominated flame retardants In man and In wildlife, *Environment International* 29 (2003) 841-853
- [8] de Wit C.A., An overview of brominated flame retardants in the environment, *Chemosphere* 46 (2002) 583-624
- [9] Jakobsson K., Thuresson K., Rylander L., Sjödin A., Hagmar L., Bergman A., Exposure to polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A among computer technicians, *Chemosphere* 46 (2002) 709-716
- [10] Lindström G., Wingfors H., Dam M., Bavel B., Identification of 19 Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Long-Finned Pilot Whale (*Globicephala melas*) from the Atlantic, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36, 355-363(1999)
- [11] Meneses M., Wingfors H., Schuhmacher M., Domingo J.L., Lindström G., Bavel B., Polybrominated diphenyl ethers detected in human adipose tissue from Spain, *Chemosphere* 39, No 13, (1999) 2271-2278
- [12] Watanabe I., Sakai S., Environmental release and behavior of brominated flame retardants, *Environment International* 29 (2003) 665-682
- [13] Sjödin A., Patterson D.G., Bergman Å., A review on human exposure to brominated flame retardants-particularly polybrominated diphenyl ethers, *Environment International* 29 (2003) 829-839
- [14] Ohta S., Ishizuka D., Nishimura H., Nakao T., Aozasa O., Shimidzu Y., Ochiai F., Kida T., Nishi M., Miyata H., Comparison of polybrominated diphenyl ethers in fish, Vegetables, and meats and levels in human milk of nursing women in Japan, *Chemosphere* 46 (2002) 689-696
- [15] Burniston D.A., Symons R.K., Croft M., Trout M., Korth W., Determination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Australian pig fat, *Organohalogen Compounds*, Volumes 60-65, Dioxin 2003 Boston,
- [16] Wenning R.J., Uncertainties and data needs in risk assessment of three commercial polybrominated diphenyl ethers: probabilistic exposure analysis and comparison with European Commission results, *Chemosphere* 46 (2002) 779-796
- [17] Hale R.C., La Guardia M.J., Harvey E., Mainor T.M., Potencial role of fire retardant-treated polyurethane foam as a source of brominated diphenyl ethers to the US environmet, *Chemosphere* 46 (2002) 729-735
- [18] Branchi I., Capone F., Alleva E., Costa L.G., Polybrominated diphenyl ethers: Neurobehavioral Effects Following developmental exposure, *NeuroToxicology* 24 (2003) 449-462
- [19] Knutsen H., Bergsten C., Thomsen C., Sletta A., Becher G., Alexander J., Metzger H., Preliminary assessment of PBDE exposure from food i Norway, 25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs) Dioxin 2005, 624-1627