

JOANNA KUC, JOANNA GIEROŃ, ADAM GROCHOWALSKI*

OZNACZANIE POLIBROMOWANYCH BIFENYLI W WYBRANYCH PRÓBKACH ŻYWNOŚCI

DETERMINATION OF POLYBROMINATED BIPHENYLS IN SELECTED FOOD SAMPLES

Streszczenie

Przedstawiono wyniki badań z zakresu oznaczania polibromowanych bifenyli (PBB) w wybranych próbkach żywności zawierających tłuszcz. Próbki analizowano metodą chromatografii gazowej z detekcją wychwytu elektronów (GC-ECD). W celu wydzielenia PBB z matrycy tłuszczowej zastosowano sorbent Bio-Beads® S-X3. Badania wykazały dużą skuteczność izolowania analitu od matrycy przy zastosowaniu chromatografii żelowej. Stosowany sorbent może być używany wielokrotnie bez pogorszenia selektywności w izolowaniu PBB. Opracowana metoda może służyć jako metoda przesiewowa w oznaczaniu zawartość PBB w żywności.

Słowa kluczowe: PBB, BFRs, GPC, analiza żywności

Abstract

The results of research on the determination of polybrominated biphenyls (PBB) in selected samples of food containing fat are presented. The samples were analyzed by gas chromatography with electron capture detection (GC-ECD). In order to separation of PBB from the fat matrix sorbent Bio-Beads® S-X3 was used. Studies have shown high effectiveness of isolating the analyte from the matrix by using gel chromatography. The sorbent can be used repeatedly without deterioration of selectivity in the isolation of PBB. The method can recommended as a screening method for the determination of PBB in food samples.

Keywords: PBB, BFRs, GPC, food analysis

* Mgr inż. Joanna Kuc, dr Joanna Gieroń, dr hab. inż. Adam Grochowalski, Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska.

Oznaczenia

BB-29	– 2,4,5-tribromobifenyl
BB-52	– 2,2',4,5'-tetrabromobifenyl
BB-49	– 2,2',5,5'-tetrabromobifenyl
BB-101	– 2,2',4,5,5'-pentabromobifenyl
BB-153	– 2,2',4,4',5,5'-heksabromobifenyl
BRF	– bromowane opóźniacze zapłonu
DCM	– dichlorometan
GC-ECD	– chromatografia gazowa z detektorem wychwyty elektronów
GC-MS/MS	– chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas z podwójną fragmentacją oznaczanej cząsteczki
Hx	– heksan
Hx/DCM	– mieszanina heksanu i dichlorometanu
PBB	– polibromowane bifenyle
PBBmix	– roztwór wzorcowy zawierający BB-29, BB-49, BB-52, BB-101, BB-153 o stężeniu 500 ng/ml każdego, przygotowany w dekanie
PBDD/F	– polibromowane dibenzodiodoksyny/furany
TBB	– 1,3,5-tribromobenzen

1. Wstęp

PBB stosowano do wczesnych lat 70. XX w. jako addytywne opóźniacze zapłonu w tworzywach sztucznych, w budownictwie, w przemyśle tekstylnym oraz elektrycznym i elektronicznym. Badania w zakresie identyfikacji PBB i ich wpływu na środowisko naturalne rozpoczęto po przypadkowym zmieszaniu w 1973 r. produktu FireMaster® zawierającego PBB z paszą dla zwierząt, co spowodowało skażenie środowiska oraz śmierć dużej ilości zwierząt hodowlanych [1–4].

Głównym źródłem emisji PBB do środowiska naturalnego były zakłady produkcyjne oraz wysypiska odpadów, na których w wyniku pożarów mogą powstawać i uwalniać się PBDD/F [5].

Zdolność kumulacji PBB w tkance tłuszczowej, wątrobie i mózgu oraz niekorzystny wpływ tych zanieczyszczeń na wydzielanie hormonów sterydowych [1, 2, 6–15] wymagają stosowania czułych i selektywnych metod oznaczania w próbkach środowiskowych oraz w żywności.

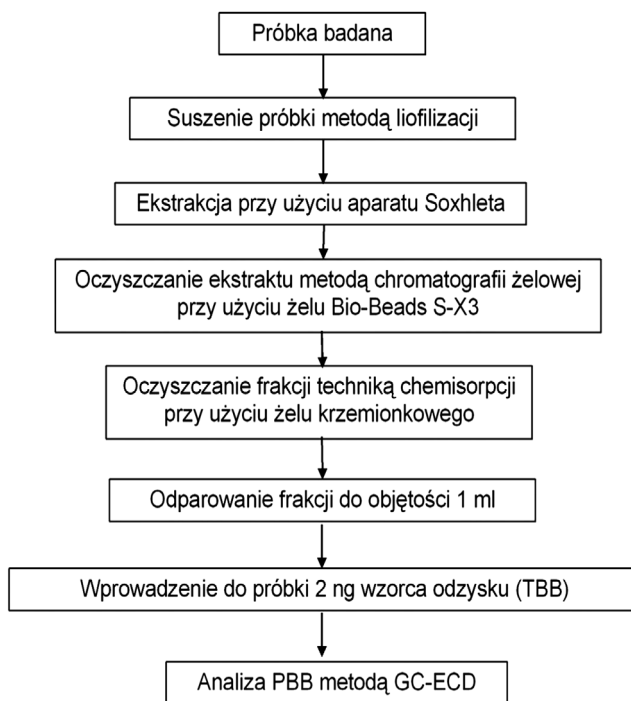
Przedmiotem badań było opracowanie metody oznaczania PBB, głównie BB-29, BB-52, BB-49, BB-101 i BB-153 w mięsie łososia, wieprzowiny i w maśle. Szczególną uwagę zwrócono na etapy oczyszczania próbki techniką chromatografii wykluczenia (żelowej) przy użyciu kopolimeru styrenu i diwinylobenzenu Bio-Beads® S-X3 (Bio-Rad Laboratories). Rozdzielanie kongenerów PBB prowadzono metodą chromatografii gazowej z detektorem wychwyty elektronów (GC-ECD) przy użyciu kolumny CP Sil5 CB 30 m /0,32 mm/0,25 µm.

2. Eksperyment

2.1. Materiał badawczy i metodyka badań

Procedurę analityczną opracowywano przy użyciu następujących próbek żywności: tkanka mięsna łososia bałtyckiego, wieprzowa tkanka tłuszczowa oraz masło. Żywność pochodzi z sieci handlowej miasta Krakowa.

Etapy przygotowania próbki do analizy chromatograficznej przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Etapy przygotowania próbki do analizy chromatograficznej

Fig.1. A stages of a sample preparation for chromatographic analysis

Rozdrobnione i odważone próbki liofilizowano (3–4 doby), a następnie poddano ekstrakcji dichlorometanem (60–80 ml) w aparacie Soxhlet’a. Ekstrakcję prowadzono 6–8 godzin. 100 mg ekstraktu wzbogacono 4 μ l roztworu wzorcowego PBBmix zawierającego kongenery BB-29, BB-49, BB-52, BB-101, BB-153 o stężeniu każdego 500 μ g/ml. W celu izolowania PBB z matrycy tłuszczowej zastosowano frakcjonowanie metodą chromatografii wykluczenia. Przygotowano szklaną kolumnę wypełnioną sorbentem Bio-Beads® S-X3 spęcznianym mieszaniną Hx/DCM w stosunku objętościowym 1:1. Takiej samej mieszaniny użyto jako eluentu. Odbierano dziesięciomililitrowe frakcje. Po zakończeniu frakcjonowania sorbent dodatkowo przemywano 50 ml eluentu. Frakcje zawierające analit poddano dalszemu oczyszczaniu wykorzystując szklaną kolumnę wypełnioną żelem krzemionkowym aktywowanym NaOH, żelem krzemionkowym obojętnym i żelem krzemionkowym aktywowanym H₂SO₄. Jako eluentu użyto heksanu. Przy użyciu próżniowej wyparki obrotowej odparowy-

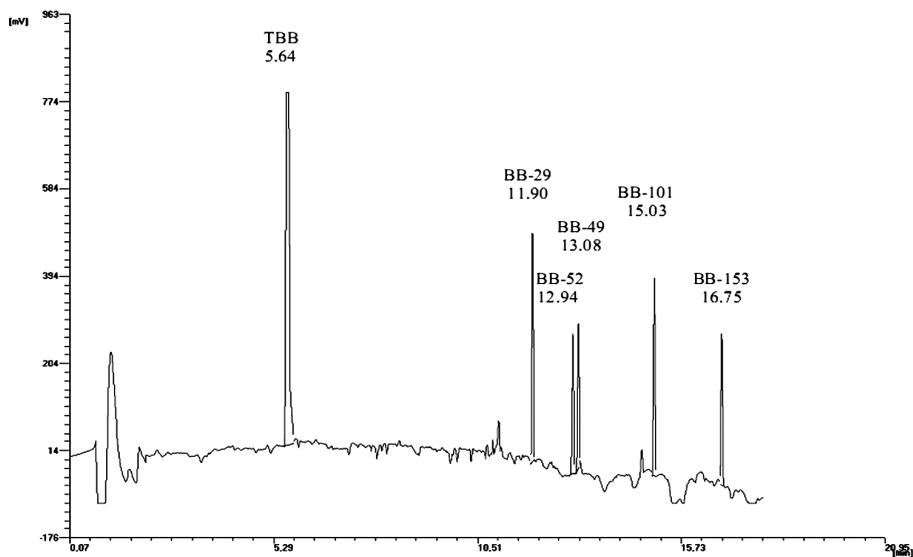
wano próbkę do objętości około 1 ml w strumieniu gazu obojętnego. Na etapie odparowywania końcowego dodano 2 μ l roztworu wzorca wewnętrznego odzysku (strzykawkowego) i kontynuowano odparowywanie rozpuszczalnika do objętości około 20 μ l. Jako wzorec wewnętrzny odzysku stosowano 1,3,5-tribromobenzen (TBB). Roztwór wzorcowy roboczy o stężeniu 1 mg/ml przygotowano poprzez odważenie na wadze analitycznej naważki 5 mg TBB i rozpuszczenie jej w heksanie w kolbce miarowej o objętości 5 ml.

Oznaczenia jakościowe PBB przeprowadzono przy użyciu chromatografu gazowego Varian typ CP 3800 z detektorem wychwytu elektronów (GC-ECD) oraz kolumną z fazą o niskiej polarności CP Sil 5 CB (30 m/0,32 mm/0,25 μ m). Parametry analizy chromatograficznej stosowane w oznaczaniu PBB były następujące:

- dozownik z podziałem/bez podziału strumienia próbki, temperatura 250°C,
- gaz nośny: hel; natężenie przepływu strumienia gazu przez kolumnę 2 ml/min,
- program temperaturowy: 90°C (1 min) – 10°C/min – 160°C – 15°C/min – 228°C (1 min) – 15°C/min – 300°C (3 min).

2.2. Wyniki badań

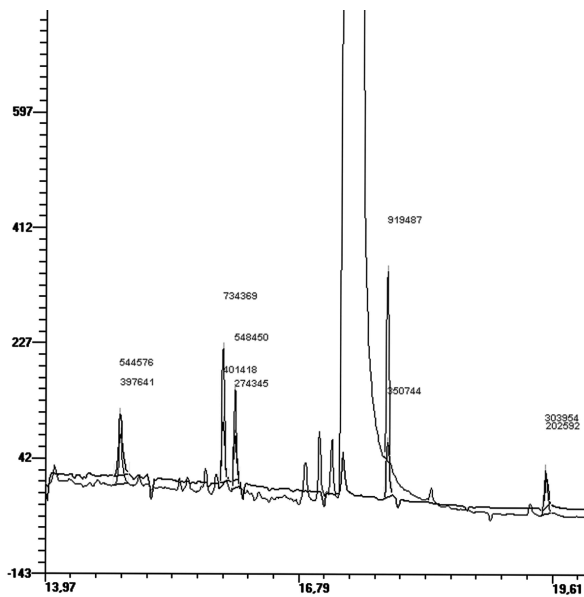
Procedurę analityczną w odniesieniu do każdej próbki wykonano z trzykrotnym powtórzeniem. Oznaczane związki zidentyfikowano poprzez porównanie czasów retencji sygnałów analitycznych w analizowanej próbce i odpowiednio we wzorcu PBBmix. Chromatogram uzyskany w trakcie analizy wzorca PBBmix przedstawia rys. 2.



Rys. 2. Chromatogram wzorca PBBmix i wzorca TBB (6.25 ng/ml)

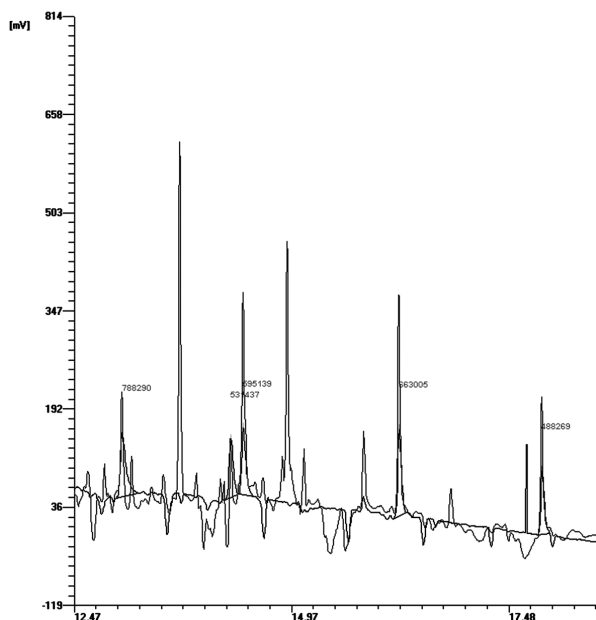
Fig. 2. Chromatogram of PBBmix and TBB standard (6.25 ng/ml)

Analizy poszczególnych frakcji otrzymanych na etapie oczyszczania przy użyciu żelu Bio-Beads® S-X3 wykazały, że PBB uzyskano we frakcji 30–40 ml eluentu. Chromatogramy uzyskane w trakcie analizy wzbogaconych próbek analizowanej żywności przedstawiono na rys. 3–5.



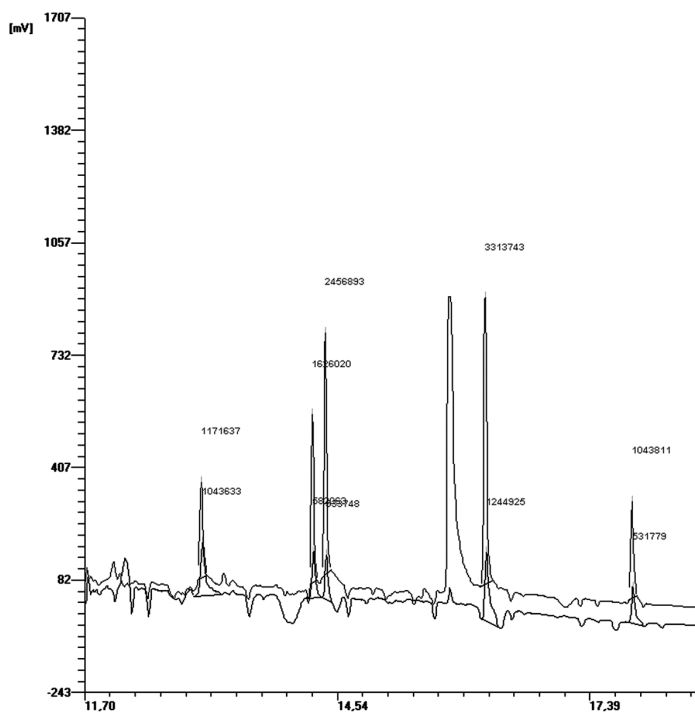
Rys. 3. Chromatogram PBB w próbce tkanki łososia w porównaniu z chromatogramem uzyskanym z analizy wzorca PBBmix

Fig. 3. Chromatogram of PBB in a sample of salmon tissue compared with chromatogram of PBBmix standard



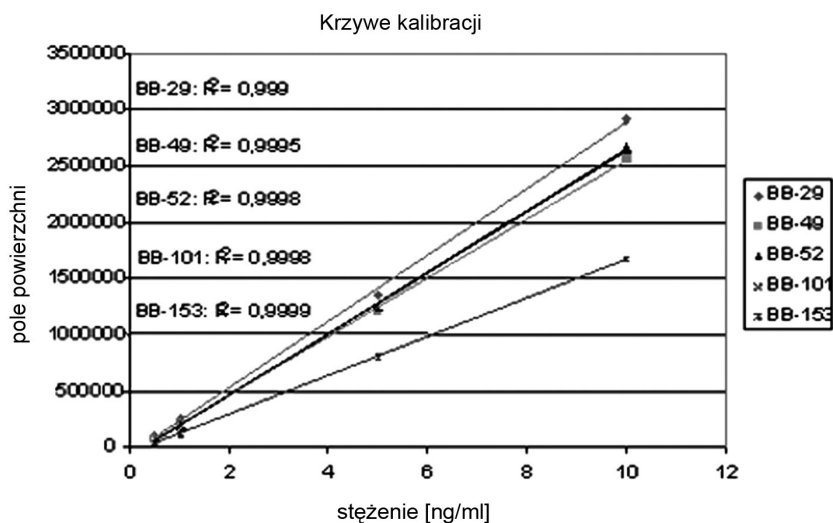
Rys. 4. Chromatogram PBB w próbce wieprzowej tkanki tłuszczowej w porównaniu z chromatogramem uzyskanym z analizy wzorca PBBmix

Fig. 4. Chromatogram of PBB in a beef sample compared with chromatogram of PBBmix standard



Rys. 5. Chromatogram PBB w próbce masła w porównaniu z chromatogramem uzyskanym z analizy wzorca PBBmix

Fig. 5. Chromatogram of PBB in a butter sample compared with chromatogram of PBBmix standard



Rys. 6. Krzywe kalibracyjne GC-ECD dla kongenerów BB-29, BB-49, BB-52, BB-101, BB-153

Fig. 6. GC-ECD calibration curves for BB-29, BB-49, BB-52, BB-101, BB-153 congeners

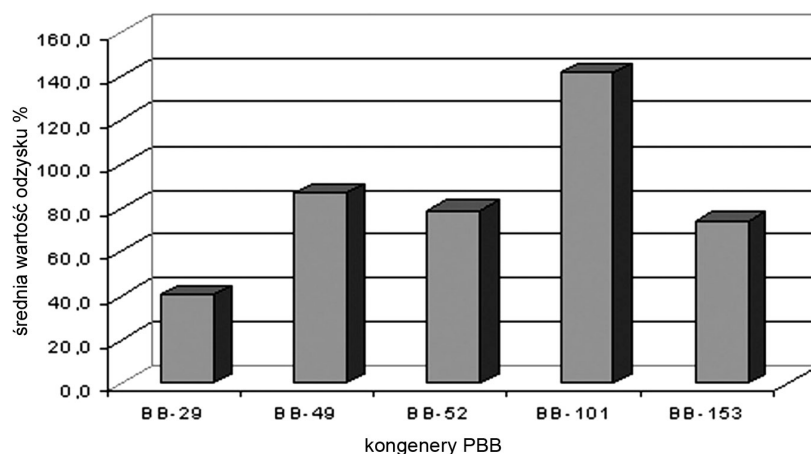
W celu kalibracji detektora ECD oraz opracowania i walidacji procedury analitycznej sporządzono roztwory wzorcowe PBBmix o stężeniach: 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml. Uzyskane krzywe wzorcowe w podanym zakresie stężeń analitów przedstawia rys. 6. Granicę wykrywalności (LOD) obliczono jako trzykrotną wartość odchylenia standardowego σ , a granicę oznaczalności (LOQ) jako trzykrotną wartość LOD [16]. Odchylenie standardowe σ obliczono dla średniej z pól powierzchni pod pikami otrzymanymi w dziesięciu analizach roztworu wzorcowego PBBmix o stężeniu 0,5 ng/ml. W tabeli 1 zestawiono uzyskane wartości LOD i LOQ oznaczanych PBB.

Tabela 1

Wartości granicy wykrywalności i oznaczalności wyznaczone dla GC-ECD

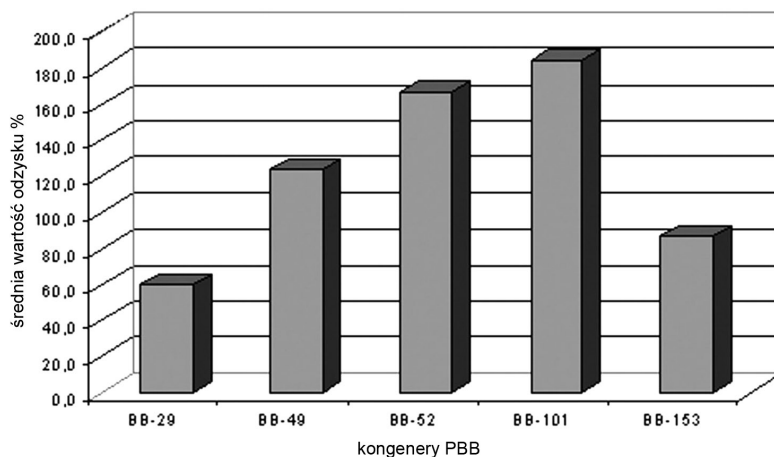
Kongener PBB	RSD [%]	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]
BB-29	2,5	0,04	0,11
BB-52	26	0,40	1,19
BB-49	7,0	0,11	0,33
BB-101	20	0,31	0,92
BB-153	17	0,26	0,76

Do oznaczeń ilościowych metodą GC-ECD sporządzono mieszaninę wzorcową zawierającą pięć kongenerów naturalnych PBB: BB-29, BB-49, BB-52, BB-101 i BB-153 oraz TBB o stężeniu każdego analitu 6,25 ng/ml w dekanie. Wartości odzysku analitów obliczono porównując pola powierzchni PBB i TBB w analizowanej próbce z polami powierzchni tych samych substancji znajdujących się w mieszaninie wzorcowej. Obliczone wartości odzysku PBB wynoszą odpowiednio: 40%–140% w przypadku próbki tkanki łososia, 60%–180% w przypadku próbki tkanki wieprzowej oraz 39%–116% w przypadku próbki masła. Wartości odzysku oznaczanych kongenerów PBB w poszczególnych próbkach przedstawiono na rys. 7–9.



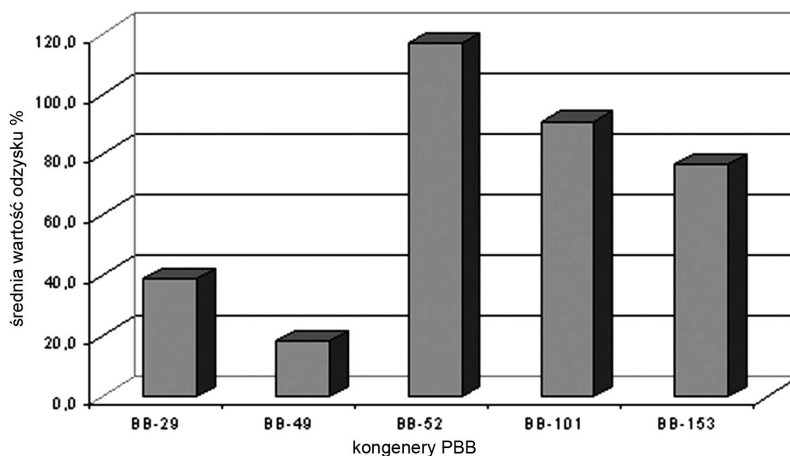
Rys. 7. Wartości odzysku dla oznaczanych kongenerów PBB w tkance łososia

Fig. 7. Recovery of PBB congeners determined in a salmon tissue



Rys. 8. Wartości odzysku dla oznaczanych kongenerów PBB w tkance wieprzowej

Fig. 8. Recovery of PBB congeners determined in a beef tissue



Rys. 9. Wartości odzysku dla oznaczanych kongenerów PBB w próbce masła

Fig.9. Recovery of PBB congeners determined in a butter sample

3. Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały dużą skuteczność wydzielenia analitu z matrycy tłuszczowej przy zastosowaniu chromatografii żelowej. Kopolimer Bio Beads S-X3 może być używany wielokrotnie bez pogorszenia selektywności w wydzieleniu PBB. Zastosowaną metodę oczyszczania ekstraktu można wykorzystać w analizie innych trwałych zanieczyszczeń organicznych. Metoda ta może być wykorzystana w rutynowym prowadzeniu oznaczania PBB w żywności jako metoda przesiewowa.

Oznaczanie PBB próbkach rzeczywistych metodą GC-ECD może powodować trudności w interpretacji uzyskanych sygnałów analitycznych ze względu na małą specyficzność tego detektora w analizie śladowej. W wyniku analizy uzyskano wartości odzysku niektórych związków powyżej 100% (np. dla BB-101 – rys. 8). Może to wskazywać na kolelucję innych kongenerów PBB lub związków interferujących trudnych do usunięcia na etapie procedury przygotowania próbek. Sugeruje się, aby w analizie próbek rzeczywistych, gdzie wymagane jest poznanie dokładnej zawartości PBB zastosować bardziej selektywne metody oznaczania jak np. GC-MS/MS [17].

Literatura

- [1] US ATSDR, *Toxicological Profile for Polybrominated Biphenyls and Polybrominated Diphenyl Ethers (PBBs and PBDEs)*, 2004, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp68.html>.
- [2] IPCS, *Environmental Health Criteria 152: Polybrominated biphenyls*, WHO Geneva 1994, <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc152.htm>.
- [3] Hites R.H., *Journal of Environmental Monitoring*, 2005, 7, 1033-1036.
- [4] Heat C.W., *Environmental Health Perspectives*, 197, 27, 7-10.
- [5] Hardy M.L., Biesemeier J., Manor C., Gentit W., *Environment International*, 2003, 29, 793-799.
- [6] De Wit C.A., Alaee M. i Muir D.C.G., *Chemosphere*, 2006, 64, 209-233.
- [7] De Boer J., Wester P.G. i van der Horst A., *Organohalogen Compounds*, 2000, 47, 85-88.
- [8] Darnerud P.O., *Environ. Internat*, 2003, 29, 841-853.
- [9] DeBoer J., Wester P.G., van der Horst A. i Leonards P.G., *Environ. Pollut*, 2003, 122, 63-74.
- [10] Klamer H.J.C., Leonards P.G. i Bakker J.F., *Organohalogen Compounds*, 2002, 59, 111-114.
- [11] De Wit C.A., *Chemosphere*, 2002, 46, 583-624.
- [12] Covaci A., Voorspoels S. de Boer J., *Environ. Internat*, 2003, 29, 735-756.
- [13] Klamer H.J.C., *Chemosphere*, 2005, 58, 1579-1587.
- [14] DeBoer J., Law R.J., *J. Chromatogr. A*, 2003, 1000, 223-251.
- [15] Rhind S.M., *Domestic Animal Endocrinol*, 2002, 23, 179-189.
- [16] *Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych*, pod red. P. Konieczki, J. Namieśnika, Warszawa 2007.
- [17] Gieron J., Grochowalski A., Chrzęszcz R., *Chemosphere* 78, 2010, 1272-1278.