

Joanna CEBULSKA<sup>1</sup>, Magdalena GEMBAL<sup>1</sup>, Beata FURGA<sup>1</sup>, Paweł MAŁAGOCKI<sup>1</sup>  
i Jadwiga PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA<sup>1</sup>

## ZAWARTOŚĆ DIOKSYN I ZWIĄZKÓW POKREWNYCH W MLEKU I PRODUKTACH MLECZNYCH OZNACZONA BIOLOGICZNĄ METODĄ PRZESIEWOWĄ

### CONTENT OF DIOXINS AND RELATED COMPOUNDS IN MILK AND DAIRY PRODUCTS DETERMINED BY BIOLOGICAL SCREENING METHOD

**Abstrakt:** Spośród wielu związków chemicznych obecnych w naturalnym środowisku duża część jest uwalniana z przemysłu oraz gospodarstw domowych. Tylko niewielka liczba zanieczyszczeń chemicznych jest regularnie badana i monitorowana. Do tej grupy zaliczają się związki chloroorganiczne określane terminem dioksyny. Związki te ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne podlegają kumulacji w bogatych w tłuszcz tkankach zwierząt hodowlanych, a w okresie laktacji przenikają do mleka. Mleko i jego przetwory, jako żywność pochodzenia zwierzęcego, uznawane są za jedno z głównych źródeł ekspozycji ludzi na dioksyny. W celu obniżenia narażenia populacji tą drogą ustalono dopuszczalne limity dioksyn dla mleka i produktów mlecznych. Żywność ta podlega systematycznym badaniom kontrolnym. W latach 2009-2010 wykonano 218 analiz mleka i przetworów mlecznych, poszukując dioksyn i związków pokrewnych, bazując na biologicznej metodzie przesiewowej. Próbkę zostały pobrane przez lokalnych próbkobiorców na terenach zakładów mleczarskich. Konieczność badania wynika z ustawy o bezpieczeństwie żywności oraz z indywidualnych wymagań krajów, do których te produkty są eksportowane. Wśród badanych materiałów znalazły się: mleko surowe (46 próbek), mleko w proszku pełne (20) i odtuszczone (78), sery (39) oraz masło (35). Stwierdzono, że dioksyny, furany i dl-PCB występowały w stężeniach niskich, nieprzekraczających dopuszczalnych limitów określonych w Rozporządzeniu Komisji Europejskiej (WE) 1881/2006 (limit dla sumy PCDD i PCDF wynosi 3 pg WHO-TEQ/g tł., limit dla sumy PCDD, PCDF i dl-PCB - 6 pg WHO-TEQ/g tł.). Spośród 218 próbek 198 zawierało dioksyny poniżej 50% dopuszczalnego limitu. Najwyższe oznaczone stężenie PCDD/PCDF wynosiło 2,22 pg WHO-TEQ/g tłuszczu w próbce pełnego mleka w proszku. Najwyższą zawartość badanych związków (suma PCDD, PCDF i dl-PCB) stwierdzono w próbce masła i wyniosła ona 3,73 pg WHO-TEQ/g tłuszczu. Dioksyny i związki pokrewne występowały na niskich poziomach stężeń w badanych próbkach mleka i produktów mlecznych, dlatego nie mogły stanowić zagrożenia dla konsumentów. Jednakże biorąc pod uwagę właściwości toksyczne badanych związków i ich tendencję do bioakumulacji w tkankach ludzi, mleko i jego produkty powinny podlegać stałej kontroli.

**Słowa kluczowe:** dioksyny, furany, PCB, mleko, przetwory mleczne

Spośród wielu związków chemicznych obecnych w środowisku naturalnym duża część jest uwalniana z przemysłu oraz gospodarstw domowych. Tylko niewielka liczba zanieczyszczeń chemicznych jest regularnie badana i monitorowana. Do tej grupy zaliczają się związki chloroorganiczne określane terminem dioksyny. Powstają w procesach spalania oraz jako produkty uboczne wielu procesów chemicznych. Większość z nich przedostaje się do środowiska wraz ze skażonym powietrzem, dlatego ich depozycja może być zarówno bliska, jak i odległa od miejsca emisji.

Powszechnie nazwą „dioksyny” określa się 29 związków chemicznych z grupy 419 chlorowanych węglowodorów aromatycznych. Są to dibenzo-*p*-dioksyny (PCDD),

<sup>1</sup> Zakład Radiobiologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, tel. 81 889 31 56, email: asia.cebulska@piwet.pulawy.pl, magdalena.gemba1@piwet.pulawy.pl, beata.furga@piwet.pulawy.pl, pawel.malagocki@piwet.pulawy.pl, jagoda@piwet.pulawy.pl

dibenzo-*p*-furany (PCDF), dioksynopodobne polichlorowane bifenyle (dl-PCB) o wspólnym mechanizmie działania toksycznego. Najbardziej toksycznym związkiem jest 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyna (2,3,7,8-TCDD). Spośród całej dużej grupy kongenerów polichlorowanych dioksyn, furanów i PCB tylko 29 ma znaczenie toksykologiczne i stanowi zagrożenie zdrowia. Działanie toksyczne dioksyn i związków pokrewnych odbywa się za pośrednictwem wewnątrzkomórkowego receptora (*receptora Ah*) i prowadzi ostatecznie do modyfikacji ekspresji genów w komórce [1]. Wszystkie związki tej grupy działają w taki sam sposób, a ponieważ zarówno w środowisku, jak i w żywności występują jako mieszaniny izomerów i kongenerów, jako klasa podlegają wspólnemu szacowaniu i wspólnym regulacjom prawnym [2, 3]. Związki te ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne podlegają kumulacji w bogatych w tłuszcz tkankach zwierząt hodowlanych, a w okresie laktacji przenikają do mleka. Mleko i jego przetwory, jako żywność pochodzenia zwierzęcego, uznawane są za jedno z głównych źródeł ekspozycji ludzi na dioksyny. W celu obniżenia narażenia populacji tą drogą ustalono dopuszczalne limity dioksyn dla mleka i produktów mlecznych [2]. Żywność ta podlega systematycznym badaniom kontrolnym.

Oznaczanie dioksyn w żywności z powodu bardzo niskich stężeń ( $10^{-12}$  g/g) należy do trudnych metod analitycznych. „Złoty standard”, jakim jest w oznaczaniu tych związków metoda HRGC-HRMS, jest kosztowny i czasochłonny, dlatego stale poszukuje się prostszych i tańszych metod oznaczania dioksyn, które znacząco obniżają koszty badań. Do takich należy korzystający ze zmodyfikowanych genetycznie komórek hepatomy mysiej biotest, dostępny w handlu pod nazwą CALUX. W związku z potrzebą prowadzenia badań monitoringowych różnych rodzajów żywności i pasz zaadaptowano wymieniony biotest, służący początkowo do badań środowiskowych, do przesiewowego badania żywności. Użycie biotestu pozwala na preselekcję próbek, w których stężenie dioksyn znajduje się poniżej dopuszczalnych limitów [2]. Po odpowiednich modyfikacjach etapów ekstrakcji i oczyszczania uzależnionych od rodzaju badanej matrycy metoda ta jest z powodzeniem stosowana jako metoda przesiewowa w badaniu mleka i jego przetworów. Pozwala ona oddzielnie oznaczyć zawartość PCDD/PCDF oraz dl-PCB, spełniając tym samym wymogi ustawodawcy [2, 3]. Próbki mleka i jego przetworów, w których stwierdzono dioksyny w stężeniach powyżej 75% dopuszczalnego limitu, są badane ponownie z zastosowaniem chemicznej metody potwierdzającej HRGC-HRMS [4].

## Material i metody

**Material.** Material badawczy stanowiły próbki mleka krowiego i przetworów mlecznych, pobranych w zakładach mleczarskich w celu sprawdzenia ich zgodności z prawem żywnościowym [5, 6]. Wśród badanych materialów znalazły się: mleko surowe (46 próbek), mleko w proszku pełne (20) i odtłuszczone (78), sery (39) oraz masło (35).

**Metoda.** Analizę w kierunku obecności dioksyn i związków pokrewnych wykonano zwalidowaną metodą [3] w laboratorium akredytowanym na zgodność z normą ISO 17025:2005 [7]. Oznaczano zawartość PCDD/PCDF i dl-PCB. Ekstrakcję dioksyn z badanego materialu oraz oczyszczanie ekstraktów prowadzono na kolumnach z żelom krzemionkowym modyfikowanym kwasem siarkowym, zaś separację PCDD/PCDF od dl-PCB wykonywano na kolumnie węglowej (XCARB). Oczyszczone ekstrakty

poddawano biotestowi XDS-CALUX, którego działanie polega na aktywacji ekspresji transgenu lucyferazy w komórkach mysiej hepatomy. Aktywacja jest wprost proporcjonalna do ilości dioksyn, furanów oraz dl-PCB obecnych w oczyszczonych ekstraktach próbek. Wykorzystując te właściwości, można mierzyć zawartość dioksyn zarówno w próbkach środowiskowych, jak i w żywności w WHO-TEQ na poziomie ppt. Odczyty luminescencji wykonywano w lumenometrze BDS Orion. Minimalna detekcja TCDD w komórkach wynosi 16 fg (femtogramów), zaś odzyski metody są na poziomie 80÷120%. W każdej próbce oznaczano grawimetrycznie zawartość tłuszczu, a wyniki oznaczania PCDD/PCDF oraz dl-PCB podawano w pg WHO-TEQ/g tłuszczu wraz z niepewnością rozszerzoną. Zapewnienie jakości badań (QA/QC) uzyskiwano, stosując wzorce wewnętrzne, ślepe próbki odczynnikowe, materiał referencyjny i krzywą kalibracyjną TCDD.

### Wyniki i ich omówienie

Generalnie dioksyny, furany i dl-PCB występowały w niskich stężeniach, nieprzekraczających dopuszczalnych limitów określonych w Rozporządzeniu Komisji Europejskiej (WE) 1881/2006 (limit dla sumy PCDD i PCDF w mleku wynosi 3 pg WHO-TEQ/g tłuszczu, zaś limit dla sumy PCDD, PCDF i dl-PCB - 6 pg WHO-TEQ/g tł.).

Średnie stężenia oraz zakresy dla poszczególnych grup badanych materiałów w pg WHO-TEQ/g tłuszczu przedstawiono w tabeli 1. Całkowita zawartość PCDD oraz PCDF w mleku wynosiła w pg WHO-TEQ od 0,06 do 1,99 pg/g tł., zaś stężenie dl-PCB od 0,10 do 1,92 pg/g. W produktach mleczarskich stężenia badanych związków były także niskie, znacznie poniżej dopuszczalnych limitów. Średnie stężenia badanych analitów nie różniły się między poszczególnymi grupami materiałów, zawartość zaś dioksyn w sproszkowanym mleku odtłuszczonym była 2-3 razy niższa niż w pozostałych grupach.

Tabela 1  
Zestawienie wyników uzyskanych biologiczną metodą przesiewową

Summary of results obtained using biological screening method

Table 1

Rodzaj materiału		Mleko pełne w proszku	Masło	Sery	Mleko surowe	Mleko odtłuszczone w proszku
		pg WHO-TEQ/g tłuszczu				
Związki badane	zakres	0,07÷2,22	0,05÷2,15	0,07÷1,83	0,01÷2,15	0,06÷1,99
	średnia ± SD	0,85 ± 0,61	0,86 ± 0,58	0,90 ± 0,50	0,18 ± 0,33	0,80 ± 0,57
dl-PCB	zakres	0,10÷1,62	0,06÷2,05	0,06÷1,01	0,03÷2,28	0,10÷1,92
	średnia ± SD	0,56 ± 0,37	0,45 ± 0,39	0,47 ± 0,24	0,21 ± 0,31	0,63 ± 0,47
Σ	zakres	0,31÷2,85	0,35÷3,73	0,24÷2,49	0,05÷3,20	0,40÷3,55
PCDD+PCDF +dl-PCB	średnia ± SD	1,41 ± 2,85	1,31 ± 0,83	1,38 ± 0,57	0,39 ± 0,54	1,43 ± 0,77

Najwyższe stężenie PCDD/PCDF oznaczono w próbce pełnego mleka proszku i wynosiło ono 2,22 pg WHO-TEQ/g tłuszczu, natomiast dioksynopodobnych PCB w mleku sproszkowanym odtłuszczonym (2,28 pg WHO-TEQ/g produktu). Najwyższą

zawartość sumy badanych związków (PCDD, PCDF i dl-PCB) stwierdzono w próbce masła i wyniosła ona 3,73 pg WHO-TEQ/g tłuszczu.

Oznaczone poziomy dioksyn i dl-PCB były podobne do poziomów tzw. tła występującego w innych krajach europejskich [1, 8, 9]. Dla przykładu, w monitoringu mleka krowiego w 2006 roku pochodzącego z 93 mleczarni we Francji poziomy były również podobne do oznaczonych w tej pracy i stwierdzono znaczne ich obniżenie w stosunku do badań przeprowadzonych we Francji z roku 1998 [8]. Zgodnie z raportem naukowym EFSA, opracowanym na podstawie badań w krajach unijnych i oceną poziomów skażenia żywności dioksynami, mleko w Europie zawiera około 1,05 pg WHO-PCDD/PCDF-TEQ/g tłuszczu oraz 2,42 pg WHO-PCDD/PCDF/PCB-TEQ/g tłuszczu [1].

## Dyskusja

Na podstawie badań wykonanych w tej pracy można stwierdzić, że dioksyny i związki pokrewne obecne w niskich stężeniach w krajowych próbkach mleka i jego produktów nie stanowiły zagrożenia dla zdrowia konsumentów. Jednakże biorąc pod uwagę właściwości toksyczne dioksyn i tendencję do bioakumulacji w tkankach ludzi, mleko i jego produkty powinny podlegać stałej kontroli. Kontrola mleka dostarcza informacji dotyczącej nie tylko jego zanieczyszczenia, ale również zanieczyszczeń przetworów mlecznych.

Stała kontrola łańcucha żywnościowego w Unii Europejskiej wymaga stosowania wiarygodnych i tanich metod przesiewowych. Przesiewowe metody wstępne, biologiczne i chemiczne są wykorzystywane w celu wydzielenia próbek o dopuszczalnej zawartości dioksyn. Do jednej z najszerzej stosowanych na świecie należą biotesty, bazujące na genetycznie modyfikowanych komórkach hepatomy mysiej lub szczurzej, dostępne komercyjnie od kilku lat. Jedną z takich metod jest opisany biotest CALUX, coraz częściej stosowany do przesiewowego badania próbek w laboratoriach na świecie. Pomimo wielu niewątpliwych wad jest on dobrym narzędziem analitycznym w badaniach monitoringowych dużej liczby próbek [10]. Do potwierdzania zaś skażenia próbek służy chemiczna metoda potwierdzająca HRGC/HRMS, która pozwala na identyfikację i ilościowe oznaczanie poszczególnych kongenerów. Zastosowanie obydwu technik wydaje się zadowalającym rozwiązaniem w monitorowaniu dużej liczby próbek w celu wyszukiwania skażeń dioksynami i ich źródeł.

## Literatura

- [1] Scientific Report of EFSA - Results of the monitoring of dioxin levels in food and feed. EFSA J. 2010;8(3):1385
- [2] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. DzU L.364/5.
- [3] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1883/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. DzU L 364/32.
- [4] Lizak R, Maszewski S, Piskorska-Pliszczyńska J. Occurrence and profile of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in Polish farm milk. B Vet I Pulawy. 2009;53:833-838.
- [5] Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 z dnia 28 stycznia 2002 r. DzU L 31/1.
- [6] Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. DzU 2006, Nr 171, poz. 1225.
- [7] PN-EN ISO/IEC 17025:2005. Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.

- [8] Durand B, Dufour B, Fraisse D, Defour S, Duhem K, Le-Barillec K. Levels of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in raw cow's milk collected in France in 2006. *Chemosphere*. 2008;70:689-693, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.06.057.
- [9] Windal I, Vandevijvere S, Maleki M, Gosciny S, Vinkx C, Focant JF, i in. Dietary intake of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs of the Belgian population. *Chemosphere*. 2010;79:334-340, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.01.031.
- [10] Małagocki P, Piskorska-Pliszczyńska J. Zalety i wady skryningowej metody oznaczania dioksyn, Konferencja Szkoleniowo-Naukowa PTTox „Toksykologia w służbie zdrowia publicznego”. Jurata, 19-22.09.2011. 20-27.

### **CONTENT OF DIOXINS AND RELATED COMPOUNDS IN MILK AND DAIRY PRODUCTS DETERMINED BY BIOLOGICAL SCREENING METHOD**

Department of Radiobiology, National Veterinary Research Institute, Puławy

**Abstract:** Of the many chemicals occurring in the natural environment a large part is released from the industry and households. Only a small number of chemical contaminants is regularly examined and monitored. This group includes chloroorganic compounds called dioxins. Due to their physico-chemical properties, these compounds may cumulate in animal tissues rich in fat and may pass to the milk during lactation. Milk and its products, similarly to the food of animal origin, are considered a major source of human exposure to dioxins. To reduce the exposure of the population, the maximum acceptable limits for dioxins in milk and dairy products were established. Food is subject to systematic control. In 2009 and 2010, 218 milk and milk products samples were analyzed for the presence of dioxins and related compounds using a biological screening method. Samples were collected from local dairies. The necessity of food control results from the law on food safety and the individual requirements of the countries to which the product is exported. Tested materials included: raw milk (46 samples), milk powder, full (20) and skimmed (78), cheese (39) and butter (35). It was found that dioxins, furans and dl-PCBS levels were low, and did not exceed the limits laid down in Commission Regulation (EC) 1881/2006 (the limit for the sum of PCDDs and PCDFs is 3 pg WHO-TEQ/g fat, and that for the sum of PCDDs, PCDFs and dl-PCBs is 6 pg WHO-TEQ/g fat). Of 218 samples examined, 198 contained dioxins below 50% of the permitted limit. The highest measured concentration of PCDD/PCDFs was 2.22 pg WHO-TEQ/g fat in a sample of whole milk powder. The highest content of the tested compounds (sum of PCDDs, PCDFs and dl-PCBs) was found in one butter sample (3.73 pg WHO-TEQ/g fat). Dioxins and related compounds found in samples of milk and dairy products were not a hazard to consumers because their concentrations are low. However, taking into account the toxicity of the tested compounds and their tendency to bioaccumulation in the tissues of humans, milk and dairy products should be subject to permanent monitoring.

**Keywords:** dioxins, furans, PCBs, milk, dairy products