

Oznaczenie polibromowanych eterów difenyłowych (PBDE) w żywności (cz. I)

Przygotowanie próbek

Leszek Ruchomski*

Polibromowane etery difenyłowe (ang. polybrominated diphenyl ethers – PBDE), należą do grupy bromowanych związków uniepalniających (ang. brominated flame retardants – BFR). Dodane do polimerów zmniejszają palność otrzymanego tworzywa sztucznego.

Ogólny wzór polibromowanego eteru difenyłowego przedstawiono na rys. 1. Doniesienia o toksycznym wpływie na ludzi skutkowało zakończeniem stosowania tera-BDE, penta-BDE, hepta-BDE oraz okta-BDE, poprzez wpisanie na listę Trwałych Zanieczyszczeń Środowiska Konwencji Sztokholmskiej [1]. Obecnie dozwolone jest stosowanie eteru dekabromodifenyłowego (BDE-209). Związki te, uwalniane są z tworzyw sztucznych podczas użytkowania sprzętu elektrycznego i elektronicznego (występują w kurzu [2]) oraz podczas niewłaściwego przetwarzania tych odpadów. Uwolnione PBDE przedostają się do środowiska, gdzie ulegają bioakumulacji w tkankach tłuszczowych żywych organizmów, ponadto mogą przenosić się wzdłuż łańcucha pokarmowego – biomagnifikacja. Z tych powodów niezmiernie ważne staje się określenie narażenia człowieka na PBDE występujące w powietrzu (inhalacja) oraz w żywności. Artykuł stanowi przegląd informacji na

temat całej procedury przygotowania próbek żywności do oznaczenia końcowego metodą chromatografii gazowej wraz z kontrolą i zapewnieniem jakości uzyskanych wyników.

Metody stosowane w analizie śladowej służące określeniu zawartości polibromowanych uniepalniaczy w różnych matrycach są bardzo czułe, a więc pozwalają na oznaczenie związków na niskich poziomach stężeń. Naczynia i roztwory powinny być chronione poprzez przykrycie i owinięcie folią aluminiową. Należy zwrócić szczególną uwagę na mycie i używanie szkła laboratoryjnego [3]. Podczas czynności przygotowawczych samych ekstraktów należy mieć na uwadze możliwość zaadsorbowania analitu na szkło, polibromowane bifenyly (PBB) oraz PBDE ulegają silniejszej adsorpcji niż polichlorowane bifenyly (PCB) [4]. Ponadto, istotne jest stosowanie oddzielnych zestawów szkła i urządzeń do ekstrakcji i oczyszczania ekstraktów dla wysokich i niskich stężeń [5].

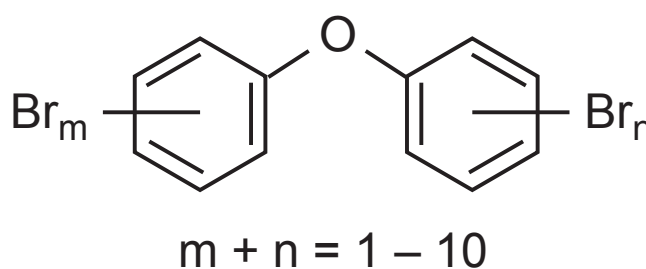
Pobieranie próbek

Nie ma szczegółowych wytycznych pobierania próbek żywności przeznaczonych do analizy zawartości PBDE. Zalecane jest stosowanie podstawowych wytycznych pobierania próbek żywności dotyczących dioksyn i dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli zgodnie z Rozporządzeniem Komisji Wspólnot Europejskich z dnia 19 grudnia 2006 roku [5,6]. Właściwe pobieranie próbek do analizy ma kluczowe znaczenie i musi być odpowiednio zaplanowane. Pobieranie próbek powietrza w pomieszczeniach może być wykonane metodą pasywną z zastosowaniem próbników dyfuzyjnych. Me-

tody dynamiczne poboru próbek dokonuje się pompując powietrze przez filtry szklane (BFR w pyłe zawieszonym) lub stosując adsorbenty w postaci m.in. pianki poliuretanowej (BFR obecnych w fazie gazowej) [7].

Suszenie próbek

Suszenie próbki służy usunięciu wody z matrycy, co wpływa na proces ekstrakcji. Nie powstaje wówczas układ dwufazowy: woda/rozpuszczalnik organiczny i nie ma podziału analitu pomiędzy te fazy. Poniżej znajduje się krótka charakterystyka najczęściej stosowanych metod suszenia, celem przygotowania próbki do ekstrakcji PBDE.



Rys. 1. Wzór polibromowanego eteru difenyłowego PBDE



- Mielenie z bezwodnym siarczanem(VI) sodu. Ucieranie przeprowadza się do uzyskania sypkiego homogenicznego proszku [3].
- Adsorpcja wody na żelu krzemionkowym lub tlenku glinu. Adsorbenty te nie wiążą trwale wody i podczas zastosowania polarnego rozpuszczalnika do ekstrakcji woda może ulegać desorpcji [3].
- Liofilizacja (suszenie sublimacyjne) [8].
- Suszenie w podwyższonej temperaturze. Podczas ogrzewania próbki może dochodzić do strat analitu, jak również do jego wychwycenia z otoczenia [9], metoda niezalecana.

Ekstrakcja próbek stałych

Wybór sposobu ekstrakcji zależy od masy próbki, która za-

wiera się w granicach od 0,5 g – 50 g. Próbki stałe, takie jak gleba, osady, osady ściekowe, złoża sorpcyjne stosowane do poboru próbek powietrza, również próbki biotyczne: tkanki, czy jaja przed ekstrakcją należy poddać suszeniu. Ekstrakcja ciecz-ciało stałe z użyciem aparatu Soxhleta jest powszechnie stosowaną techniką ze względu na swoją ogólną dostępność i niski koszt inwestycyjny. Do ekstrakcji są stosowane rozpuszczalniki: n-heksan, toluen, mieszanina n-heksan/acetone lub dichlorometan. Czas ekstrakcji powinien wynosić około 6 – 24 godzin [3]. Nowe techniki ekstrakcyjne, jak przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem (ASE) lub ekstrakcja wspomagana mikrofalami (MAE) są

wprowadzane w wielu laboratoriach, jednakże wiążą się z wyższymi kosztami inwestycyjnymi w porównaniu z ekstrakcją przy użyciu aparatu Soxhleta. Zaletą stosowania ASE lub MAE jest mniejsze zużycie rozpuszczalników, co umożliwia obniżenie kosztów długoterminowych. Całe procedury są bardziej przyjazne dla środowiska, spełniają wymagania Zielonej Chemii. Skróceniu ulega również czas ekstrakcji. Techniki mogą być całkowicie zautomatyzowane, ale należy mieć na uwadze, że elementy z tworzyw sztucznych mogą adsorbować lub uwalniać BFR, co będzie wpływać na uzyskany wynik.

Ekstrakcję prowadzoną za pomocą fazy (płynu) w stanie nadkrytycznym (SFE) można zasto-

sować do izolowania PBB, PCB oraz PBDE. Stosowaną fazą nadkrytyczną jest dwutlenek węgla [10], której polarność może być modyfikowana poprzez dodatek metanolu, acetonu lub dietyloaminy. Otrzymywane ekstrakty z SFE są wystarczająco czyste, można więc pominąć kolejne etapy oczyszczania i poddać oznaczeniu końcowemu [3]. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami – sonifikacja (UAE) wymaga około 24 godzin. Poziom odzysku BFR jest niższy niż przy zastosowaniu ekstrakcji za pomocą aparatu Soxhleta. Z tych powodów jest rzadko stosowana w laboratorium [3].

Ekstrakcja próbek ciekłych

Opisana została metoda ekstrakcji próbek ludzkiego mleka n-heksanem, po uprzedniej

UNI-EXPORT Instruments Polska



Agilent Technologies



NanoMEGAS
Advanced Tools for electron diffraction

MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA

- Skaningowe mikroskopy elektronowe: wyposażone w katodę wolframową, LaB6 lub emisję polową
- Systemy FIB, litografia elektronowa
- Systemy SEM/FIB z działem plazmowym
- Zintegrowane systemy analityczne SEM TOF-SIMS
- Stoliki specjalne
- Detektory EDS, WDS, EBSD, EBIC, CL, BSE/CL, TE
- Modernizacja starszych urządzeń SEM i EDS
- Systemy automatycznej analizy orientacji ziaren i tworzenia map fazowych metodą precesji w TEM

ANALIZA MATERIAŁÓW POROWATYCH PROSZKÓW I PIANEK

- Analizatory sorpcji gazów i par cieczy
- Pomiar powierzchni właściwej (BET) i porowatości
- Porozymetry rtęciowe do pomiaru dystrybucji wielkości porów
- Płknometry helowe do pomiaru gęstości rzeczywistej ciał stałych i proszków
- Pomiar zawartości komórek otwartych i zamkniętych w sztywnych piankach

TECHNIKA PRÓŻNIOWA

- Pompy próżniowe (rotacyjne, bezolejowe typu scroll, turbomolekularne, dyfuzyjne i jonowe)
- Detektory helowe i kompletne stanowiska do testowania szczelności
- Głowice próżniowe i próżniomierze
- Kontrolery i mierniki przepływu gazów - MFC
- Spektrometry masowe, analizatory gazów: RGA, FTIR, NDIR
- Zawory i armatura próżniowa
- Dedykowane systemy próżniowe
- Regeneracja pomp próżniowych

CHARAKTERYZOWANIE WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNYCH ZAWIESIN, EMULSJI I PIAN

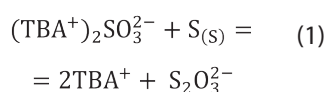
- Stabilność – wykrywanie i identyfikacja wszystkich rodzajów niestabilności: śmietankowanie, sedymentowanie, flokulacja, agregowanie, flotacja, demulgowanie
- Ocena właściwości lepko-sprężystych – płynięcie, smarowność, stabilność kształtu, żelowanie, czas relaksacji, stabilność

04-369 Warszawa, ul. Ludwika Kickiego 4A, lok. 50 www.uni-export.com.pl

saponifikacji (zmydleniu) alkoholowym roztworem KOH [11]. Mieszanka chloroform/metanol/woda jest wykorzystywana do ekstrakcji PBDE z mały [12]. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE) została zastosowana do izolowania BFR z ludzkiego osocza [13,14]. Osocze w pierwszym etapie jest mieszane z kwasem mrówkowym i izopropanolem, po czym poddawane jest sonifikacji. Przygotowany ekstrakt rozcieńcza się i przenosi do uprzednio kondycjonowanej kolumny SPE, gdzie fazę stanowi kopolimer polistyren-diwinylbenzen. Z krążków lub kolumny BFR ekstrahowane są mieszaniną dichlorometanu/metanol. Faza stała kolumny SPE w postaci diwinylbenzen-N-winylopirolidon została zastosowana do ekstrakcji próbek mleka [15]. Kopolimer ten daje większy odzysk fenolowych uniepalniaczy. Ekstrakcja do fazy stałej dla matryc innych niż osocze krwi, wymaga dalszego oczyszczania ekstraktu ze względu na współekstrakcję tłuszczów [3].

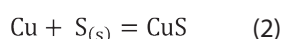
Oczyszczanie ekstraktu

„Surowy” ekstrakt należy poddać dalszej procedurze oczyszczania ze względu na współekstrakcję innych związków: tłuszczów z tkanki zwierzęcej, kwasów humusowych z osadów dennych i ściekowych. Ekstrakty mogą zawierać siarkę, którą również należy usunąć. Można tego dokonać poprzez reakcje z siarczanem(IV) tetra-n-butyloamonu [16] zgodnie z reakcją [17]:



gdzie TBA^+ to jon tetra-n-butyloamonu.

Drugą metodą chemiczną jest związanie siarki na aktywowanej powierzchni miedzi, po uprzednim usunięciu tlenków z jej powierzchni (aktywowana powierzchnia) [18]:



PBDE oraz inne polibromowane uniepalniacze mają charakter lipofilowy, ulegają bioakumulacji w tłuszczach, z tego powodu ich zawartość jest zależna od ilości tłuszczu. Określenie masy tłuszczu w próbce jest bardzo ważne, szczególnie wtedy, gdy wynik jest podany w przeliczeniu na tłuszcz badanej próbki. Podczas ekstrakcji tłuszcze przechodzą wraz z analitem do rozpuszczalnika organicznego, następnie powinny zostać usunięte z próbki przed oznaczeniem chromatograficznym, w tym celu stosowane są dwie metody: nieniszcząca i niszcząca tłuszcze.

Metody nieniszczące tłuszcze

Do metod nieniszczących należy między innymi: chromatografia żelowa (GPC), cieczowa chromatografia kolumnowa (z zastosowaniem sorbentów obojętnych chemicznie) oraz techniki membranowe (SPM). GPC może być również stosowana do początkowego oczyszczania próbek biologicznych [19]. W technice tej można zastosować żel, jakim jest kopolimer styrenu-diwinylbenzenu, np. żel Bio-Beads S-X3 [20]. W cieczowej chromatografii kolumnowej stosowane są

obojętne adsorbenty [21]: tlenek glinu, żel krzemionkowy oraz Florisil (żel krzemionkowy/tlenek magnezu) [22]. Jako eluentu można użyć dichlorometanu, mieszaniny dichlorometanu/octanu etylu/n-heksanu lub cykloheksanu. Należy podkreślić, że metoda ta nie oddziela BFR od innych związków halogenoorganicznych. Koniecznym staje się kolejny etap oczyszczania lub frakcjonowanie [23]. Frakcjonowanie ekstraktu według polarności różnych klas związków można dokonać za pomocą żelu krzemionkowego lub tlenku glinu. Do matryc niskotłuszczowych zalecane jest stosowanie żelu krzemionkowego lub Florisil, natomiast do matryc bogatych w tłuszcz – tlenek glinu [9].

Membrany wykorzystywane do oczyszczania ekstraktów wykonane są z folii polietylenowej niskiej gęstości (LDPE). Wojtalewicz i in. [24] zastosowali membranę w kształcie rękawa zamkniętego na jednym końcu o długości 300 mm i średnicy około 25 mm, średnica porów wynosiła 1 nm. Przed użyciem membrana była kondycjonowana w n-heksanie przez 72 godziny. Jako rozpuszczalnik odbierający zastosowano n-heksan, dializę prowadzono przez 72 godziny, przy czym po upływie 24 godzin wymieniano rozpuszczalnik odbierający.

Metody niszczące tłuszcze

W metodzie tej stosowana jest technika adsorpcyjnej cieczowej chromatografii kolumnowej. Zastosowanie znajduje kwas siarkowy(VI). Można go

bezpośrednio dodać do ekstraktu [9], albo modyfikować nim żel krzemionkowy [25]. Żel krzemionkowy modyfikowany kwasem siarkowym(VI) zawiera 45% tego kwasu na sorbencie [26]. Przeprowadzone badania [9,18] pozwoliły stwierdzić, że PBDE, PBB oraz heksabromocyklododekan (HBCD) są trwałe w silnie kwasowym środowisku. Zniszczenie matrycy za pomocą stężonego kwasu może umożliwić usuwanie większej ilości tłuszczów niż zastosowanie chromatografii adsorpcyjnej i GPC. Podobne rozwiązanie umożliwia użycie żelu krzemionkowego modyfikowanego alkoholowym lub wodnym roztworem KOH, czy NaOH [27,28]. W środowisku zasadowym PBDE, PBB i tetrabromobisfenol A (TBBP-A) są trwałe, natomiast HBCD ulega degradacji [9,18]. Można zastosować również kolumnę wypełnioną żelem krzemionkowym modyfikowanym kwasem siarkowym(VI) oraz wodorotlenkiem sodu jednocześnie (tzw. kolumna mieszana) [18]. Saponifikacja alkoholowym roztworem KOH w podwyższonej temperaturze może powodować degradację wyżej bromowanych kongenerów PBDE i PBB [9], co będzie skutkowało zaniżeniem wyników. Kongener BDE-209 najlepiej eluować toluenem, dichlorometanem lub mieszaniną acetonu i heksanu. Nie jest dobrze rozpuszczalny w izooktanie. Należy również unikać całkowitego odparowania ekstraktów podczas zatężania [3] lub zmiany rozpuszczalnika.

* mgr inż. Leszek Ruchomski
leszekruchomski@gmail.com