

Oznaczania polibromowanych eterów difenylowych (PBDE) w żywności (cz. III)

Kontrola i zapewnienie jakości

Leszek Ruchomski*

Zapewnienie jakości (ang. quality assurance – QA) jest zbiorem procedur obejmujących kontrolę jakości (ang. quality control – QC) podejmowanych w celu potwierdzenia uzyskanych danych. Szacowany czas poświęcony na zapewnienie jakości stanowi 20% – 25% walidacji metody [3]. W tym celu należy zweryfikować między innymi: kalibrację, kontrolę procedury analitycznej oraz stabilność metody.

Wzorce chromatograficzne

Obecnie dostępne są certyfikowane wzorce PBDE oraz wzorce znakowane izotopami węgla ^{13}C -PBDE. Światowymi liderami w ich dostawie są: Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA), Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada) oraz AccuStandard (New Haven, CT, USA). Wzorce chromatograficzne powinny być odpowiednio przechowywane,

aby nie dochodziło do zmiany stężenia; w szczelnie zamkniętych ampułkach, ciemnym i chłodnym miejscu. Utrata związku nie powinna przekroczyć 2% w ciągu 6 – 9 miesięcy [41]. W laboratoriach do tego typu wzorców stosowane są specjalne ampułki o pojemności od 1,5 ml do 10 ml o nazwie. Temperatura dla przechowywania wzorca BDE-209 powinna wynosić $+4^{\circ}\text{C}$. De Boer i in. [42] zale-

cają wagowe kontrolowanie użytych rozpuszczalników organicznych ze względu na rozszerzalność termiczną cieczy. Znana ilość wzorca wewnętrznego (ang. *internal standard* – IS) dodana na początku procedury analitycznej pozwala na kontrolowanie strat analitu podczas przygotowania próbek. Wzorec odzysku, zwany wzorcem strzykawkowym (ang. *syringe standard* – SS) dodany do oczyszczonego ekstraktu przed oznaczeniem służy określeniu strat wzorca wewnętrznego. Stosowane wzorce IS oraz SS nie powinny znajdować się w próbce badanej oraz charakteryzować się zbliżonymi właściwościami fizykochemicznymi, ale nie powinny współteluować. Niektóre kongenery, takie jak BDE-77, BDE-116 oraz BDE-126 można zastosować jako wzorce [43]. Najczęściej stosowane wzorce zestawiono w tabeli 3.

Walidacja

Walidacja metody analitycznej powinna być przeprowadzona osobno dla każdej matrycy

(poznanie efektów matrycowych). Skuteczność metody oczyszczania uważa się za wystarczającą, gdy odzysk analitu jest wysoki, na poziomie powyżej 70%, korzystnie, gdy wynosi powyżej 90% [3]. Należy przy tym wziąć pod uwagę: stabilność linii bazowej chromatogramów, kształt pików oraz rozdzielczość.

Istotnymi parametrami jest wyznaczenie krzywej kalibracyjnej, granicy wykrywalności (LOD) oraz oznaczalności (LOQ) oraz pomiar ślepych próbek (ang. *blanks*). Krzywa kalibracyjna może być sporządzona z roztworów wzorcowych lub z dodatkiem wzorca wewnętrznego. Granica wykrywalności (LOD) stanowi najmniejszą ilość (stężenie) analitu, którą można wykryć za pomocą danej metody z określonym prawdopodobieństwem [48,49]. Najczęściej granica wykrywalności stanowi trzykrotny stosunek sygnału analitycznego (S) do poziomu szumu (N) i jest określona wzorem [49]:

$$\text{LOD} = 3 \left(\frac{S}{N} \right) \quad (3)$$

Tabela 3. Zestawienie stosowanych wzorców IS oraz SS [9,13,27,44,45,46,47]

Wzorec IS naturalny	Wzorec IS znakowany izotopowo
BDE-71	$[^{13}\text{C}]_{12}$ -BDE-28
BB-77	$[^{13}\text{C}]_{12}$ -BDE-47
BB-209	$[^{13}\text{C}]_{12}$ -BDE-77
CB-112	$[^{13}\text{C}]_{12}$ -BB-157
pentachlobenzen (PCB)	$[^{13}\text{C}]_{12}$ -BC-180
Wzorec SS naturalny	Wzorec SS znakowany izotopowo
BDE-15	$[^{13}\text{C}]_{12}$ -BDE-28
BDE-138	$[^{13}\text{C}]_{12}$ -BDE-47
BB-209	$[^{13}\text{C}]_{12}$ -BDE-154
CB-30	$[^{13}\text{C}]_{12}$ -BDE-183
CB-198	$[^{13}\text{C}]_{12}$ -CB-111
1,3,5-tribromobenezn (TBB)	$[^{13}\text{C}]_{12}$ -CB-180
2,4,6-tribromofenol (TBP)	$[^{13}\text{C}]_{12}$ -CB-194



Granica oznaczalności (LOQ) stanowi najmniejszą ilość (stężenie) analitu, którą można oznaczyć za pomocą określonej metody z określonym prawdopodobieństwem [48,49]. Wielkość ta może być szacowana jako dziesięciokrotny stosunek sygnału analitycznego (S) do poziomu szumu (N), co określa wzór [49]:

$$LOQ = 10 \left(\frac{S}{N} \right) \quad (4)$$

Wyznaczanie LOD i LOQ przy użyciu roztworów wzorcowych jest odradzane. Ekstrapolacja wyników jest zalecana dla niskiego poziomu analitu lub wzbogaconej próbki. W innych przypadkach LOQ należy szacować ze ślepych próbek [3].

Pomiar tła

Oznaczanie PBDE w ślepych próbkach, czyli pomiar tła (ang. *blanks*) należy przeprowadzać z zachowaniem szczególnej ostrożności. Podczas wykonywania pomiarów może dojść do utraty analitu lub jego zwiększenia na skutek zanieczyszczenia próbki. Obecnie dużo uwagi w literaturze jest poświęcone zanieczyszczeniom krzyżowym (ang. *cross contamination*). Nie zaleca się stosowania naczyń z tworzyw sztucznych, ponieważ może dochodzić do uwalniania BFR [3], bądź ich adsorpcji.

Szczególnie krytycznie należy podchodzić do uzyskanych wyników oznaczeń dwu związków BDE-47 oraz BDE-99 ze ślepych próbek wyników oznaczeń próbek ślepych. Kongenery te są najbardziej rozpowszechnionymi

w środowisku [50] i mogą występować w powietrzu laboratoryjnym [51]. Wyniki próbek ślepych pozwalają na korygowania uzyskanych wyników oznaczania PBDE w próbkach rzeczywistych. Dodder i in. [33] uwzględniali wyniki pomiaru tła, gdy zawartość PBDE w ślepych próbkach była na poziomie 10% – 20% wartości mierzonej w próbkach rzeczywistych. W razie uzyskania zawartości w ślepych próbkach mniejszych niż 10% wartości próbek rzeczywistych nie korygowano. Dane z oznaczeń zostały wyłączone, jeśli wyniki pomiaru tła wynosiły powyżej 30% wartości w próbkach badanych.

Precyzja

Precyzja zależy od oznaczanego analitu i waha się między 10% i 20% dla kongenerów od tri-BDE do hepta-BDE i około 25% w odniesieniu do BDE-209. Pierwsze międzynarodowe badania międzylaboratoryjne w zakresie oznaczania BFR wykazały, że laboratoria powinny skupić się na precyzji uzyskiwanych wyników [43]. Stabilność i odporność metody powinna być oceniana poprzez regularne analizy roztworów wzorcowych oraz ślepych prób (*blanks*). Pomocne w tym celu są Certyfikowane Materiały Odniesienia (CRM).

Zestawienie procedur analitycznych

Podsumowanie

Polibromowane etery difenylowe stanowią antropogeniczne zanieczyszczenia środowiska, akumulują się w tkankach tłuszczowych żywych organizmów, ponadto są prze-

noszone wzdłuż łańcucha pokarmowego. Analityka występujących w żywności PBDE rozpoczyna się od pobrania próbki, ekstrakcji, oczyszczenia otrzymanego ekstraktu, a kończy na oznaczeniu najczęściej z wykorzystaniem chromatografii gazowej. Każdy etap wymaga odpowiedniego zaplanowania i poprawnego przeprowadzenia, aby uzyskany wynik przedstawiał rzeczywistą zawartość PBDE w danym produkcie spożywczym. Szczególną uwagę należy zwrócić na zmianę stężenia analitów na skutek degradacji oraz zanieczyszczenia próbki związkami występującymi w laboratorium. Z tego powodu niezmiennie ważne jest prowadzenie pomiaru tła laboratoryjnego, które może prowadzić do fałszywych wyników. Walidacja całej metody jest pracochłonna i kosztowna, sprawdzenie stworzonej opracowanej metody można przeprowadzić poprzez zastosowanie Certyfikowanych Materiałów Odniesienia. Nieocenionym staje się również udział w porównaniach międzylaboratoryjnych. Stworzona i sprawdzona metodyka analityczna pomaga w określeniu narażenia człowieka na związki z grupy PBDE przyjmowane wraz z pożywieniem.

Literatura

- [1] *Listing of POPs in the Stockholm Convention*, chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/ListingofPOPs/tabid/2509/Default.aspx (dostęp 15.07.2015)
- [2] Ruchomski L., *Zanieczyszczenia w naszym otoczeniu*.

Nieznane oblicze kurzu, LAB, 2015, 2: 15–20

[3] Covaci A., Voorspoels S., de Boer J., *Determination of brominated flame retardants, with emphasis on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental and human samples – a review*, Environ. Int., 2003, 29: 735–756

[4] de Boer J., *Capillary gas chromatography for the determination of halogenated microcontaminants*, J. Chromatogr. A, 1999, 843: 179–198

[5] *Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food*, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, 2011

[6] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1883/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. *ustanawiające metody pobierania próbek i metody analizy do celów urzędowej kontroli dioksyn i dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB) w środkach spożywczych*

[7] Sjödin A., Carlsson H., Thureson K., Sjölin S., Bergman A., *Flame retardants in indoor air at an electronics recycling plant and at other work environments*, Environ. Sci. Technol., 2001, 35: 448–454

[8] Smedes F., de Boer J., *Determination of PCBs in sediments – analytical methods*, Trends. Anal. Chem., 1997, 16: 503–517

[9] de Boer J., Allchin C., Law R., Zegers B., Booij J.P., *Method for the analysis of polybrominated diphenyl ethers in sediments and biota*, Trends. Anal. Chem., 2001, 20: 591–599

[10] Hartonen K., Bowadt S., Hawthorne S.B., Riekkola M.L.,

Tabela 4. Zestawienie czynności związanych z przygotowaniem i analizą PBDE [9,11,25,33,47,52,53]

Matryca	Przygotowanie	Ekstrakcja	Oczyszczanie	Detekcja
Ryby	homogenizacja	ekstrakcja ciecz–ciało stałe Hx/Ac, następnie, Hx	1. stężony H ₂ SO ₄ , 2. Florisil, elucja Hx	ECD lub EI–MS
Ryby	suszenie: Na ₂ SO ₄	ekstrakcja Soxhlet (6h) Hx/Ac 3:1	1. GPC – usunięcie tłuszczów 2. żel krzemionkowy, elucja Hx 3. stężony H ₂ SO ₄	ECNI–MS
Ryby	suszenie: Na ₂ SO ₄	ekstrakcja Soxhlet (24h) Hx/Ac 1:1	1. GPC – usunięcie tłuszczów 2. żel krzemionkowy, elucja DCM	EI–MS lub ECNI–MS
Jaja	suszenie: Na ₂ SO ₄	ASE, 3× 15 min, Hx/Ac 1:1	1. GPC – usunięcie tłuszczów 2. żel krzemionkowy, elucja Hx/Tol 6:4	EI–LRMS
Ryby, jaja, warzywa	liofilizacja	1. saponifikacja KOH/EtOH (2h) 2. ekstrakcja Hx 3. ekstrakcja Soxhlet (5h) Tol	1. kolumna mieszana z AgNO ₃ , elucja DCM/Hx 5:95 2. węgiel aktywny, elucja DCM/Hx 1:3	EI–HRMS
Tłuszcz	suszenie: Na ₂ SO ₄	ekstrakcja Soxhlet (2h) Hx/DCM/Ac 3:1:1	1. kwaśny żel krzemionkowy 2. kwaśny żel/ tlenek glinu, elucja Hx	EI–MS
Mleko	saponifikacja KOH/EtOH	ekstrakcja ciecz–ciecz Hx	1. kolumna: żel kwaśny, obojętny i alkaliczny, elucja Hx	EI–HRMS
Mleko	–	Ekstrakcja ciecz–ciecz Hx/Ac	1. stężony H ₂ SO ₄ 2. GPC – usunięcie tłuszczów 3. Florisil, elucja Hx	EI–HRMS

Supercritical fluid extraction with solid phase trapping of chlorinated and brominated pollutants from sediment samples, J. Chromatogr., A, 1997, 774: 229–242

[11] Ohta S., Ishizuka D., Nishimura H., Nakao T., Aozosa O., Shimidzu Y., Ochiai F., Kida T., Nishi M., Miyata H., *Comparison of polybrominated diphenyl ethers in fish, vegetables, and meat and levels in human milk of nursing women in Japan*, Chemosphere, 2002, 46: 689–696

[12] Booij K., Zegers B.N., Boon J.P., *Levels of some polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants along the Dutch Coast as derived from their accumulation in SPMDs and blue mussels (Mytilus edulis)*, Chemosphere, 2002, 46: 683–688

[13] Thomsen C., Lundanes E., Becher G., *A simplified method for determination of tetrabro-*

mobisphenol A and polybrominated diphenyl ethers in human plasma and serum, J. Sep. Sci., 2001, 24: 282–290

[14] Thomsen C., Lundanes E., Becher G., *Brominated flame retardants in plasma samples from three different occupational groups in Norway*, J. Environ. Monit., 2001, 3: 366–370

[15] Thomsen C., Leknes H., Lundanes E., Becher G., *A new method for determination of halogenated flame retardants in human milk using solidphase extraction*, J. Anal. Toxicol., 2002, 26: 129–138

[16] Jensen S., Renberg L., Reutergerd L., *Residue analysis of sediment and sewage sludge for organochlorines in the presence of elemental sulfur*, Anal. Chem., 1997, 49: 316–318

[17] Crompton T.R., *Determination of Organic Compounds in Soils, Sediments and Sludges*, CRC Press, 2000

[18] Ruchomski L., *Analiza chromatograficzna produktów dehalogenacji redukcyjnej polibromowanych uniepalniaczy*, Praca inżynierska, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Kraków, 2014

[19] Alaee M., Sergeant D.B., Ikononou M.G., Luross J.M., *A gas chromatography/ high resolution mass spectrometry (GC/HRMS) method for determination of polybrominated diphenyl ethers in fish*, Chemosphere, 2001, 44: 1489–1495

[20] Kuc J., Gieroń J., Grochowalski A., *Oznaczanie polibromowanych bifenyli w wybranych próbkach żywności*, Czasopismo Techniczne, 2010, 10: 151–159

[21] Law R.J., Alchin C.R., Bennet M.E., Morris S., Rogan E., *Polybrominated diphenyl ethers in two species of marine top predators from England and Wales*, Chemosphere, 2002, 46: 673–681

[22] Florisil, www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/288705?lang=pl®ion=PL (dostęp: 14.07.2015)

[23] Asplund L., Athanasidou M., Sjödin A., Bergman A., Börjeson H., *Organohalogen substances in muscle, egg and blood from healthy Baltic Salmon (Salmo salar) and Baltic Salmon that produced offspring with the M74 syndrome*, Ambio, 1999, 28: 67–76

[24] Wojtalewicz D., Grochowalski A., Węgiel M., *Determination of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) as Persistent Organic Pollutants (POPs) in Polish Food using Semipermeable Membranes (SPMs)*, The Fate of Persistent Organic Pollutants in the Environment, Springer, 2008: 459–469

[25] Covaci A., de Boer J., Ryan J.J., Voorspoels S., Schepens P., *Determination of polybrominated diphenyl ethers and*



- polychlorinated biphenyls in human adipose tissue by large-volume injection-narrow-bore capillary gas chromatography/electron impact low-resolution mass spectrometry*, *Anal. Chem.*, 2002, 74: 790–798
- [26] Covaci A., Voorspoels S., Vetter W., Gelbin A., Jorens P.G., Blust R., Neels H., *Anthropogenic and Naturally Occurring Organobrominated Compounds in Fish Oil Dietary Supplements*, *Environ. Sci. Technol.*, 2007, 41: 5237–5244
- [27] Christensen J.H., Platz J., *Screening of polybrominated diphenyl ethers in blue mussels, marine and freshwater sediments in Denmark*, *J. Environ. Monit.*, 2001, 3: 543–547
- [28] Wojtalewicz D., *Badania nad oznaczaniem polibromowanych eterów difenylowych w próbkach żywności zawierających tłuszczy*, Rozprawa doktorska, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Kraków, 2006
- [29] Misselwitz M., Cochran J., Thomas J., *Half the column, same chromatogram: maintain resolution of BDE-49 and BDE-71 with proper method translation after trimming an Rtx-1614 column for maintenance*, Environmental Applications, 2014, www.restek.com/pdfs/EVAN1890-UNV.pdf (dostęp 10.07.2015)
- [30] Tollback P., *Large volume injection and hyphenated techniques for gas chromatographic determination of PBDEs and carbazoles in air*, Rozprawa doktorska, Uniwersytet Sztokholmski, Sztokholm, 2005
- [31] Müller H.M., Stan H.J., *Thermal degradation observed with different injection techniques: quantitative estimation by the use of thermolabile carbamate pesticides*, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1990, 13: 759–763
- [32] Cole J., Phillips E., Conoley M., *Quadrupole GC/MS analysis of polybrominated diphenyl ethers (PBDE) in environmental samples*, Thermo Fisher Scientific, Austin, Texas, USA
- [33] Dodder N., Strandberg B., Hites R.A., *Concentrations and spatial variations of polybrominated diphenyl ethers in fish and air from the North-Eastern United States*, *Environ. Sci. Technol.*, 2002, 36: 146–151
- [34] Allchin C.R., Law R.J., Morris S., *Polybrominated diphenyl ethers in sediments and biota downstream of potential sources in the UK*, *Environ. Pollut.*, 1999, 105: 197–207
- [35] Björklund J., Hiärne C., Dyremark E., Östman C., *Evaluation of the gas chromatographic separation system for determination of polybrominated diphenyl ethers*, poster, Holandia, IJmuiden, 2000
- [36] EPA Method 1614, *Brominated Diphenyl Ethers in Water Soil, Sediment and Tissue by HRGC/HRMS (EPA-821-R-07-005)*, 2007
- [37] Phillips J.B., Gaines R.B., Blomberg J., van der Wielen F.M., Dimandja J.M., Green V., *A robust thermal modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography*, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1999, 22: 3–10
- [38] Kinghorn R.M., Marriott P.J., Dawes P.A., *Design and implementation of comprehensive gas chromatography with cryogenic modulation*, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 2000, 23: 245–252
- [39] Ledford E.B., Billesbach C., *Jet-cooled thermal modulator for comprehensive multidimensional gas chromatography*, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 2000, 23: 202–204
- [40] Sellström U., *Determination of some polybrominated flame retardants in biota, sediment and sewage sludge*, Rozprawa doktorska, Uniwersytet Sztokholmski, Sztokholm, 1999
- [41] Wells D.E., Maier E.A., Griepink B., *Calibrants and calibration for chlorobiphenyl analysis*, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1992, 46: 255–264
- [42] de Boer J., van der Meer J., Brinkman U.A.Th., *Determination of chlorobiphenyls in seal blubber, marine sediment, and fish: interlaboratory study*, *J. AOAC Int.* 1996, 79: 83–96
- [43] de Boer J., Cofino W.P., *First world-wide interlaboratory study on PBDEs*, *Chemosphere*, 2002, 46: 625–633
- [44] Hale R.C., La Guardia M.J., Harvey E.P., Mainor T.M., Duff W.H., Gaylor W.O., *Polybrominated diphenyl ether flame retardants in Virginia freshwater fishes (USA)*, *Environ. Sci. Technol.*, 2001, 35: 4585–4591
- [45] Öberg K., Warman K., Öberg T., *Distribution and levels of brominated flame retardants in sewage sludge*, *Chemosphere* 2002, 48: 805–809
- [46] Bureau S., Zebühr Y., Ishaq R., Broman D., *Comparison of biomagnification of PBDEs in food chains from the Baltic Sea and the Northern Atlantic Sea*, *Organohalog. Compd.*, 2000, 47: 253–255
- [47] Ryan J.J., Patry B., *Determination of brominated diphenyl ethers (BDEs) and levels in Canadian human milks*, *Organohalog. Compd.*, 2000, 47: 57–60
- [48] International Union of Pure and Applied Chemistry, Gold Book, International Union of Pure and Applied Chemistry, *Gold Book, limit of detection*, goldbook.iupac.org/L03540.html (dostęp 04.07.2015)
- [49] Konieczka P., Namieśnik J., Zygmunt B., Bulska E., Świątaj-Zawadka A., Naganowska A., Kremer E., Rompa M., *Oceń i kontrola jakości wyników analitycznych*. CEEAM, Gdańsk, 2004
- [50] Bonin P.M.L., Edwards P., Bejan D., Lo C.C., Bunce N.J., Konstantinov A., *Catalytic and electrocatalytic hydrogenolysis of brominated diphenyl ethers*, *Chemosphere*, 2005, 58: 961–967
- [51] Thomsen C., Leknes H., Lundanes E., Becher G., *Brominated flame retardants in laboratory air*, *J. Chromatogr. A*, 2001, 923: 299–304
- [52] Watanabe I., Kashimoto T., Tatsukawa R., *Polybrominated diphenyl ethers in marine fish, shellfish and river and marine sediments in Japan*, *Chemosphere*, 1987, 16: 2389–2396
- [53] Herzke D., Kallenborn R., Vetter W., Nygard T., *Determination of bioaccumulative brominated flame retardants and natural halogenated compounds in eggs of Norwegian birds of prey*, *Organohalog. Compd.*, 2001, 51: 264–268

* mgr inż. Leszek Ruchomski – leszekruchomski@gmail.com