



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Karla Jagić

**IZAZOVI U ANALIZI POLIBROMIRANIH
DIFENIL ETERA SUPSTITUIRANIH S
VEĆIM BROJEM Br ATOMA U HRANI**

Kemijski seminar 1

Poslijediplomski sveučilišni studij Analitička kemija

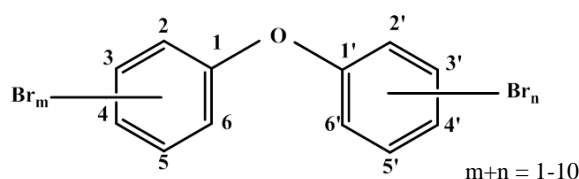
Zagreb, 2020

Sadržaj

§ 1. UVOD.....	1
§ 2. KEMIJSKA ANALIZA.....	6
2.1. Prehodna obrada uzoraka	7
2.2. Ekstrakcijske tehnike	8
2.3. Pročišćavanje uzoraka	10
2.4. Kromatografsko određivanje spojeva PBDE	12
2.4.1. Kolone za plinsku kromatografiju	12
2.4.2. Injektiranje	14
2.4.3. Kvalitativna i kvantitativna analiza	15
2.5. Maseni udjeli polibromiranih difenil etera u hrani	20
§ 3. ZAKLJUČAK	23
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	25

§ 1. UVOD

Polibromirani difenil eteri (engl. *Polybrominated Diphenyl Ethers*, PBDE) pripadaju skupini bromiranih usporivača gorenja (engl. *Brominated Flame Retardants*, BFR), odnosno, upotrebljavali su se kao aditivi raznovrsnim materijalima i opremi kako bi smanjili njihovu zapaljivost, spriječili nastanak požara ili usporili njegovo širenje. Ekonomični su i imaju mali utjecaj na mehanička svojstva polimera, a dodavali su se tekstilnim materijalima, plastičnim materijalima korištenim za izolaciju električne i elektronske opreme i izradu njihovih kućišta te poliuretanskim pjenama korištenim kao punila za namještaj i sjedala u automobilima i avionima. Skupina spojeva PBDE zaokupili su pozornost znanstvenika jer su od početka upotrebe 1960-ih i 1970-ih njihovi maseni udjeli u okolišu i ljudima naglo rasli. Postoji 209 homologa i izomera spojeva PBDE, odnosno kongenera, ovisno o broju i položaju bromovih atoma na dvama benzenskim prstenovima spojenih kisikovim atomom (slika 1).¹ U polibromirane difenil etere supstituirane s većim brojem Br atoma svrstavamo kongenere sa osam, devet i deset Br atoma, odnosno okta-, nona- i deka-bromirane difenil etere (BDE). Polibromirani difenil eter sa maksimalnim brojem supstituiranih Br atoma, odnosno deka-bromirani difenil eter (BDE-209) se u prisutnosti UV svjetlosti raspada na hepta-, okta- i nona-BDE te bromirane dibenzofurane. Kongeneri okta- i nona-BDE su glavni razgradni produkti kongenera BDE-209 i mogu se pod utjecajem UV svjetlosti dalje raspadati na stabilnije kongenere PBDE supstituirane s manjim brojem Br atoma.²



Slika 1. Općenita struktura kongenera polibromiranih difenil etera

Na tržištu su spojevi PBDE bili dostupni kao tri glavne formulacije: „penta“, „okta“ i „deka“, koje su se sastojale od relativno malog broja kongenera navedenih spojeva, a nazvane su prema stupnju bromiranosti najzastupljenije skupine kongenera.

Obzirom da su polibromirani difenil eteri vrlo postojani u okolišu, sklони bioakumulaciji i biomagnifikaciji u kopnenim i morskim hranidbenim lancima, toksični za ljude i životinje te je dokazana njihova prisutnost u svim dijelovima svijeta, dodani su na popis spojeva obuhvaćenih *Stockholmskom konvencijom o postojanim organskim onečišćujućim tvarima*. Konvencijom se propisuju uvjeti koje svaka stranka Konvencije treba ispuniti kako bi se na globalnoj razini ukinula proizvodnja, uporaba, uvoz i izvoz postojanih organskih zagađivala (engl. *Persistent Organic Pollutants*, POPs) u cilju zaštite ljudskog zdravlja i okoliša. Formulacije „penta“ i „okta“ dodane su na popis Stockholmske konvencije 2009. godine. Daleko najveći udio na tržištu imala je formulacija „deka“ čija je proizvodnja i upotreba na europskom i američkom tržištu najkasnije zabranjena, 2017. godine. Formulacija „deka“ sastoji se skoro isključivo (>97 %) od kongenera BDE-209, potpuno bromiranog difenil etera. Koristila se u različite svrhe, kao dodatak tekstilnim materijalima, plastičnim materijalima za izolaciju žica, mobilnim telefonima, hladnjacima, televizorima te ostaloj električnoj i elektronskoj opremi, ali i građevnom i konstrukcijskom materijalu.

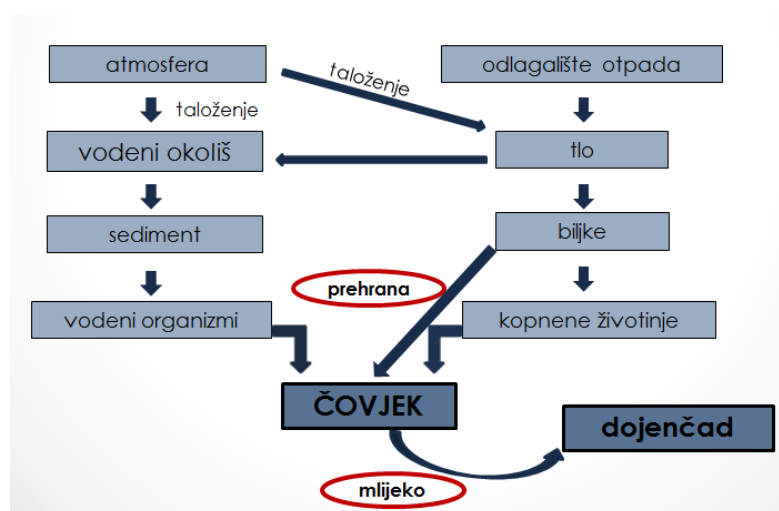
Polibromirani difenil eteri nisu kemijski vezani u materijalima u koje su dodavani, a kao posljedica toga, dolazi do njihovog otpuštanja u okolni zrak, prašinu, vodu i tlo. Proizvodi koji sadrže materijale tretirane ovim spojevima predstavljaju njihov izvor tijekom cijelog svog vijeka trajanja: od procesa proizvodnje, preko upotrebe/primjene, pa sve do odlaganja na odlagalištima otpada i tijekom procesa recikliranja.^{1,3,4}

Kongeneri polibromiranih difenil etera razlikuju se po svojim fizikalno-kemijskim svojstvima što dovodi do razlika u njihovom ponašanju u okolišu. Spojevi PBDE su hidrofobni sa logaritamskim vrijednostima koeficijenta razdjeljenja između *n*-oktanolu i vode ($\log K_{ow}$) u rasponu od 5,08 za mono-BDE do 8,70 za deka-BDE. Porastom broja bromovih atoma povećavaju se vrijednosti $\log K_{ow}$, dok se topljivost u vodi i tlak pare snižavaju. Dakle, povećanjem stupnja bromiranosti smanjuje se sposobnost kongenera da se otopi u vodi ili zadrži u plinovitom obliku u atmosferi, odnosno spojevi PBDE supstituirani s većim brojem Br atoma lakše se sorbiraju na čestice u zraku ili na čestice u vodi. Mogućnost transporta zrakom na veće udaljenosti viša je za spojeve PBDE supstituirane s manjim brojem Br atoma zbog većeg tlaka pare, dok je za spojeve PBDE supstituirane s većim brojem Br atoma prijenos na veće udaljenosti povezan s udaljenošću koju čestice mogu prijeći u atmosferi.⁵ Taloženjem iz zraka, ali i direktnim onečišćenjem tla u slučaju primjerice odlagališta otpada, polibromirani difenil eteri se vežu za organsku tvar u tlu koje onda postaje sekundarni izvor

onečišćenja ovim spojevima. Biljke u manjoj mjeri mogu putem korijena apsorbirati spojeve PBDE te su posljedično i kopnene životinje, posebno biljojedi, u manjoj mjeri izložene navedenim spojevima u odnosu na morske organizme.

U vodenom okolišu polibromirani difenil eteri se adsorbiraju na suspendirane čestice u vodi, organski dio sedimenata, i/ili ulaze u morske organizme. Tamo se bioakumuliraju u tkivima bogatim lipidima različitih organizama i biomagnificiraju duž hranidbenog lanca. Zbog toga vodeni organizmi, posebno vrste na vrhu hranidbenog lanca, često imaju visoke razine razmatranih spojeva. Ovisno o vrsti organizma, njegovim prehranbenim navikama, udjelu masti u organizmu te staništu, maseni udjeli polibromiranih difenil etera variraju od nekoliko ng g^{-1} do nekoliko $\mu\text{g g}^{-1}$ mase masti uzorka.^{6,7}

Dva osnovna puta unosa polibromiranih difenil etera u ljude su putem hrane i putem prašine – ingestijom, inhalacijom te putem kože, iako se smatra da ovaj posljednji put unosa nije od većeg značaja. Prema Europskoj agenciji za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA)³ glavni izvor izloženosti ljudi je putem hrane životinjskog podrijetla s većim udjelom masti (riba, meso i mlijeko/mliječni proizvodi), gdje se navedeni spojevi akumuliraju zbog njihove lipofilnosti (slika 2). Mnogobrojnim znanstvenim istraživanjima potvrđena je povezanost nađenih povišenih masenih udjela spojeva PBDE u određenim populacijama ljudi sa konzumacijom hrane kontaminirane ovim spojevima. Posljedično se zaključuje da izloženost ljudi spojevima PBDE putem hrane značajno ovisi o osobnim prehranbenim navikama pojedinaca te regiji u kojoj se ispitivanje provodi. Također, upravo je paralelna analiza hrane i bioloških uzoraka dovela do važne spoznaje da je unos spojeva PBDE putem prašine značajan, a u nekim slučajevima i glavni put unosa ovih spojeva u ljudski organizam. Zato je analiza polibromiranih difenil etera u hrani važna i omogućuje procjenu izloženosti ljudi ovim štetnim spojevima, na temelju koje se mogu procijeniti dozvoljeni dnevni ili tjedni unosi te pokušati smanjiti potencijalni štetni učinci na ljudsko zdravlje.^{1,3,4}



Slika 2. Shema putova unosa polibromiranih difenil etera u ljude putem prehrane

Prema preporuci 2014/118/EU Europske komisije, potrebno je analizirati deset kongenera polibromiranih difenil etera (BDE-28, -47, -49, -99, -100, -138, -153, -154, -183 i -209) pomoću analitičkih metoda s granicom određivanja (engl. *Limit of Quantification*, LOQ) ne većom od $0,01 \text{ ng g}^{-1}$ mokre mase uzorka, ili nižom, u jajima i proizvodima od jaja, mlijeku i mliječnim proizvodima, mesu i mesnim proizvodima, životinjskim i biljnim mastima i uljima, ribi i drugim morskim plodovima, proizvodima za posebne prehrambene uporabe i hrani za dojenčad i malu djecu.⁸

Uz navedene skupine prehrambenih namirnica, potrebno je ovdje zasebno naglasiti posebnu vrstu hrane – ljudsko mlijeko. Prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) ono bi trebalo biti jedina prehrana djece do šestog mjeseca starosti. Mnoga istraživanja su potvrdila da je u odnosu na druga životna razdoblja, dojenaštvo razdoblje kada je ljudski organizam u najvećoj mjeri izložen unosu organskih zagađivala putem hrane iz razloga što se tada navedeni spojevi direktno unose u dojenče koje zbog svoje male mase na taj način dobiva najveću dozu izraženu po kilogramu tjelesne mase. Na razine polibromiranih difenil etera u ljudskom mlijeku utječe više faktora, a u najvećoj mjeri prehrambene navike majke. Najviše razine ispitivanih spojeva u uzorcima ljudskog mlijeka opće populacije (isključeni slučajevi profesionalne izloženosti i izloženosti zbog blizine direktnom izvoru zagađenja) nađene su kod majki koje su pojačano konzumirale hranu kao što su riba i riblji proizvodi za koje se zna da sadrže veće masene udjele polibromiranih difenil etera u odnosu na druge skupine namirnica.^{3,4}

Iako su u ljudskim tkivima, pa tako i u mlijeku, pronađeni mjerljivi maseni udjeli spojeva PBDE, o mehanizmu njihovog toksičnog djelovanja i o štetnom utjecaju na ljudsko zdravlje malo se zna. Procjena toksičnosti ovih spojeva uglavnom se temelji na životinjskim modelima, a u nekoliko epidemioloških studija procjenjivala se povezanost nađenih povišenih masenih udjela razmatranih spojeva u ljudskom tkivu (npr. u krvi, mlijeku) sa njihovim štetnim učincima na zdravlje. Studije na životinjskim modelima pokazale su da formulacije „penta“ i „okta“ već pri nižim masenim udjelima (od 0,6 do 2 mg kg⁻¹) pokazuju različite negativne utjecaje, npr. formulacija „penta“ utječe na razine hormona štitnjače i neurobihevioralne poremećaje, a formulacija „okta“ povećava fetalnu toksičnost i teratogenost. Formulacija „deka“ pri većim masenim udjelima (80 mg kg⁻¹) utječe na morfološke promjene štitnjače, jetre i bubrega. Epidemiološke studije pokazale su da je izloženost polibromiranim difenil eterima tijekom prenatalnog perioda povezana sa nižom razinom tireoidnog stimulirajućeg hormona (TSH), nižim kvocijentom inteligencije i smanjenim razvojem kognitivnih i motoričkih sposobnosti. Postnatalna izloženost povezana je također sa nižim kvocijentom inteligencije te uvećanom učestalosti hiperaktivnog i agresivnog ponašanja.

Jedno od mogućih objašnjenja za navedene učinke je promjena statusa hormona štitnjače. Naime, razvoj neurološkog sustava u velikoj mjeri ovisi o hormonima štitnjače, posebice tiroksinu (T4), koji ima sličnu stereokemijsku strukturu kao spojevi PBDE te se njihovim vezanjem na receptore hormona štitnjače ometa proizvodnju hormona.⁴

Kako bi se zaštitilo ljudsko zdravlje i spriječilo prekomjerno unošenje polibromiranih difenil etera u organizam putem hrane, 2011. godine EFSA Panel o onečišćujućim tvarima u hranidbenom lancu (engl. *EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain*, CONTAM Panel) osam je kongenera polibromiranih difenil etera (BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154, -183 i -209) proglasio spojevima od primarnog interesa za praćenje izloženosti ljudi putem hrane. Kasnije su na popis dodana još dva kongenera, BDE-49 i BDE-138. Na temelju toga donesena je prije spomenuta preporuka 2014/118/EU Europske komisije kojom se preporuča praćenje razina navedenih deset kongenera polibromiranih difenil etera u hrani.³

Prema europskoj direktivi 2013/39/EU iz 2013. godine maksimalni dopušteni maseni udio polibromiranih difenil etera u ribama je 0,0085 µg kg⁻¹ mokre mase uzorka.⁴ Trenutno

nema drugih zakona koji bi regulirali dozvoljene vrijednosti masenih udjela spojeva PBDE u hrani.

U ovom seminarskom radu bit će prikazani analitički postupci koji se koriste za određivanje polibromiranih difenil etera supstituiranih s većim brojem Br atoma u hrani životinjskog podrijetla, ali i ljudskom mlijeku koje je primarna hrana dojenčadi. Analitika polibromiranih difenil etera supstituiranih s većim brojem Br atoma, posebice kongenera BDE-209 na kojem će biti naglasak, ne razlikuje se u potpunosti od analitike polibromiranih difenil etera supstituiranih s manjim brojem Br atoma, međutim potreban je drugačiji pristup koji će se pobliže objasniti.

§ 2. KEMIJSKA ANALIZA

Analiza tragova polibromiranih difenil etera, a time i kongenera supstituiranih s većim brojem Br atoma u uzorcima hrane životinjskog podrijetla vrlo je zahtjevna, od same pripreme uzorka, ekstrakcije analita, pročišćavanja ekstrakta pa do instrumentne analize. Kao što je rečeno, iako postoji 209 kongenera polibromiranih difenil etera, određivanje pojedinačnih kongenera ovisi o njihovoj prisutnosti u uzorcima i dostupnosti standarda. Prema podacima iz literature, kongeneri koji se najčešće analiziraju su BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154, -183 i -209.

Analiza kongenera BDE-209 je posebno izazovna zbog njegovih fizikalno-kemijskih svojstava. U većini otapala se ne otapa lako, nije hlapljiv, i općenito je reaktivan, a posebice jer se raspada pri visokim temperaturama ili u prisutnosti UV svjetlosti na hepta- (BDE-183), okta- (BDE-196, BDE-197) i nona- (BDE-207, BDE-208) bromirane difenil etere od kojih su kongeneri okta- i nona-BDE njegovi glavni razgradni produkti. Posljedica njegove nestabilnosti je da se postepeno razgrađuje tijekom cijelog analitičkog postupka, od ekstrakcije, pročišćavanja pa sve do instrumentne analize. Stoga je dobivanje pouzdanih i ponovljivih rezultata jedan od većih izazova u analizi kongenera BDE-209. Njegova razgradnja također predstavlja problem u analizi kongenera okta- i nona-BDE čiji su maseni udjeli u uzorcima hrane manji od masenih udjela potpuno bromiranog kongenera BDE-209 te ukoliko dođe do njegovog raspada, analize će pokazat previsoke masene udjele kongenera

okta- i nona-BDE, a preniske masene udjele kongenera BDE-209. Posljedično, jedan od temeljnih zahtjeva u analizi spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma je smanjiti razgradnju potpuno bromiranog kongenera BDE-209. Uzorci i ekstrakti bi trebali tijekom cijelog postupka biti zaštićeni od UV svjetlosti, npr. koristeći posuđe i viala od tamnog stakla ili zamatanjem posuđa u aluminijsku foliju.

Kongener BDE-209 se u okolišnim uzorcima pronalazi u masenim udjelima širokog raspona. Kada su maseni udjeli vrlo niski, kao na primjer u biološkim uzorcima, uzorcima tla i sedimenta te u zraku, moraju se primijeniti određene mjere kako bi se smanjile pozadinske kontaminacije tijekom skupljanja uzorka i same analize u laboratoriju. Maseni udjeli kongenera BDE-209 mogu biti i visoki, npr. u ribi i morskim plodovima, mesu, mliječnim proizvodima, što zajedno sa slabom topljivošću u vodi spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma može dovesti do unakrsne kontaminacije putem staklenog pribora, opreme i instrumenta. Stoga, za analizu tragova spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma potrebno je koristiti posebno stakleno posuđe samo za njihovu analizu. Rizik od kontaminacije može se smanjiti zagrijavanjem staklenog posuđa na 450 °C i ispiranjem sa otapalom prije same upotrebe. Treba obratiti pažnju i na plastične materijale koji su dio opreme nekih instrumenata, a koji također mogu biti izvor kontaminacije.^{2,5}

2.1. Prethodna obrada uzoraka

Skupljanje uzoraka, priprema i njihovo skladištenje važni su koraci kod kojih također treba uzimati u obzir smanjenje mogućnosti kontaminacije ili razgradnje pojedinih kongenera osjetljivih na UV svjetlo.

Najčešće se analizira hrana životinjskog podrijetla s većim udjelom masti u čvrstom ili polučvrstom stanju. Kod većine metoda iz uzoraka se uklanja voda liofilizacijom ili dodatkom anhidridnog natrijevog sulfata. Suhi uzorci ili uzorci liofilizata se mogu skladištiti u frižideru ili pri sobnoj temperaturi zaštićeni od UV svjetlosti.¹

2.2. Ekstrakcijske tehnike

Temelj uspješnosti svake analitičke metode je selektivna i iscrpna ekstrakcija ciljanih spojeva iz uzorka što izravno utječe na kvalitetu rezultata. O tome koja će se ekstrakcijska tehnika primijeniti ovisi o tipu uzorka i dostupnosti laboratorijske opreme. Kongeneri polibromiranih difenil etera imaju široki raspon molekulskih masa ($328 - 959 \text{ g mol}^{-1}$) i razlikuju se međusobno po fizikalno-kemijskim svojstvima tako da je potrebna pažljiva optimizacija ekstrakcijskog procesa. Učinkovitost ekstrakcije ovisi o vrsti otapala, vremenu ekstrakcije, temperaturi, tlaku, a potrebno je uzeti u obzir i ekonomičnost samog postupka. Visoka temperatura će u većini slučajeva povisiti učinkovitost ekstrakcije sniženjem viskoznosti otapala i povećanjem topljivosti analita u otapalu. Međutim, visoka temperatura može dovesti do razgradnje okta-, nona- i deka-bromiranih difenil etera zbog čega ekstrakcijska tehnika neće biti učinkovita za navedene skupine kongenera.

Organska otapala koja se najčešće koriste za ekstrakciju lipofilnih spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma iz uzoraka hrane su *n*-heksan, diklormetan, aceton, dietil eter, etil acetat, acetonitril ili smjese navedenih otapala u različitim omjerima.

Ekstrakcijske tehnike koje se najviše koriste su: ekstrakcija otapalom, ekstrakcija po Soxhletu, ekstrakcija otapalom potpomognuta visokim tlakom (engl. *Pressurized Liquid Extraction*, PLE), ekstrakcija čvrsto-tekuće potpomognuta ultrazvukom (engl. *Ultrasound - Assisted Leaching*, USAL), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *Microwave-Assisted Extraction*, MAE), ekstrakcija raspršenjem uzorka kroz čvrstu fazu (engl. *Matrix Solid Phase Dispersion*, MSPD).^{1,3,5}

Ekstrakcija otapalom ne zahtijeva skupu ili suvremenu instrumentaciju, što ju čini relativno jeftinom tehnikom, no zbog potrebe višekratnog ponavljanja postupka dugotrajna je i potrebne su velike količine reagensa.

Ekstrakcija po Soxhletu klasična je tehnika koja se koristi u analizi postojanih organskih zagađivala zbog njene visoke učinkovitosti. Najveća mana ove tehnike je da je dugotrajna i zahtijeva veće volumene otapala.

Tehnika PLE koristi povišenu temperaturu ($80 - 130 \text{ }^{\circ}\text{C}$) i povišeni tlak ($100 - 200 \text{ bar}$) kako bi se povećala učinkovitost otapala da ekstrahira analite iz uzorka. Aparatura omogućuje učinkovitu i brzu ekstrakciju, primjenom 2 ili 3 ekstrakcijska ciklusa u manje od 30 minuta. Uz to što je automatizirana, pruža mogućnost istovremenog pročišćavanja

ekstrakta. Može se na dno ekstrakcijske ćelije dodati prikladni sorbens, npr. kiseli silikagel za oksidaciju masti, i pročistiti ekstrakt u istoj ćeliji. Ponekad je potrebno ekstrakte dodatno pročistiti, međutim u većini slučajeva mogu se direktno analizirati. U obzir treba uzeti činjenicu da su sama aparatura, ali i njeno korištenje i održavanje relativno skupi.

Tehnika USAL pogodna je za obradu krutih uzoraka, a koristi ultrazvučne valove koji uzrokuju kavitaciju i mehaničko miješanje što posljedično omogućuje bolju ekstrakciju željenih spojeva iz uzorka u otapalo. Na taj način izbjegnuta je razgradnja termički nestabilnih spojeva. Ispiranje (engl. *leaching*) zapravo je naziv za ekstrakciju čvrsto-tekuće gdje se ciljani analiti otapaju u organskim otapalima što čini ovu tehniku selektivnom.

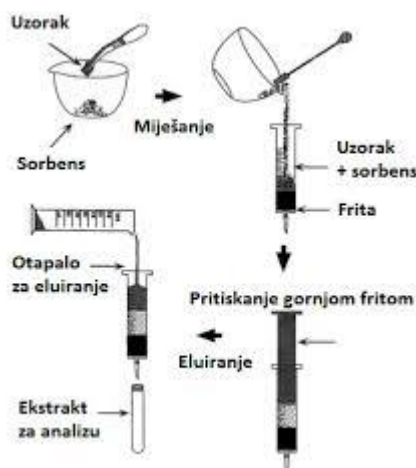
Tehnika MAE podrazumijeva ekstrakciju otapalom ubranu i pospješenu mikrovalnom energijom kojom se grije uzorak i otapalo (slika 3). Glavne prednosti ove tehnike su: smanjena upotreba otapala, smanjeno vrijeme ekstrakcije, povećanje prinosa analita, automatizacija i obrada većeg broja uzoraka istovremeno. Nedovoljno se koristi zbog nepoznatog učinka mikrovalova na analite i potrebe za polarnim otapalom koje je nužno kako bi došlo do apsorpcije mikrovalne energije. Također, ekstrakti zahtijevaju daljnje pročišćavanje.



Slika 3. Uređaj za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima

Ekstrakcija raspršenjem uzorka kroz čvrstu fazu je modificirana ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *Solid Phase Extraction*, SPE) razvijena s ciljem pojednostavljenja pripreme uzorka s visokim udjelom masnoća. Temelji se na miješanju male količine uzorka s većom količinom sorbensa u keramičkom tarioniku. Nakon miješanja, uzorci se prebacuju u koloniju i analiti se eluiraju odgovarajućim otapalom. Nečistoće se zadržavaju na sorbentu i na taj način dolazi do istovremene ekstrakcije i pročišćavanja uzorka (slika 4). Iako je ova tehnika razvijena u svrhu

analize pesticida, sve češće se koristi i u analizi drugih organskih zagađivala u hrani, ali i u tlu i sedimentu.^{1,5}



Slika 4. Shema ekstrakcije raspršenjem uzorka kroz čvrstu fazu

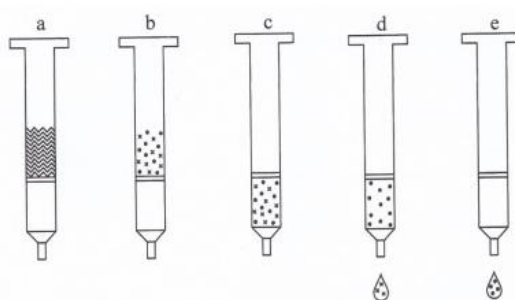
Najčešća tehnika koja se koristila u analizi spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma u hrani je ekstrakcija po Soxhletu, a u novije vrijeme više se koriste tehnike PLE te USAL i MSPD. Navedene tehnike pogodne su za analizu čvrstih i polučvrstih uzoraka hrane. Tehnika MSPD razvijena je za analizu uzoraka sa visokim udjelom masnoća, npr. riba, škampi, jegulja i ostalih morskih plodova. Tehnika PLE ima prednost pred drugim tehnikama ekstrakcije jer pruža mogućnost istovremenog pročišćavanja uzorka. U analizi tekućih uzoraka, npr. ljudskog mlijeka, može se koristiti tehnika PLE, ali prethodno je uzorke potrebno liofilizirati. Iako se nedovoljno koristi, tehnika MAE se uspješno može primijeniti u analizi čvrstih i polučvrstih uzoraka hrane, ali i za analizu tekućih uzoraka.

2.3. Pročišćavanje uzoraka

Ekstrakti uzoraka hrane uz željene lipofilne spojeve koji se nakupljaju u masti sadrže i druge nepolarne i poluhlapljive spojeve te sastojke matrice što može dovesti do koeluiranja sa analitima i dobivanja lažnih rezultata, prouzročiti neželjeni utjecaj matrice u ionskom izvoru, ili čak promijeniti rad kolone za plinsku kromatografiju i injektorskog sustava. Najvažniji koraci u postupku pročišćavanja su uklanjanje matrice i odvajanje željenih polibromiranih difenil etera iz masti i od drugih interferirajućih spojeva što često stvara probleme u postupku

pročišćavanja i potreban je vrlo selektivan postupak. Uklanjanje masti koja se ekstrahira zajedno sa ispitivanim spojevima iz većine uzoraka hrane, posebno životinjskog porijekla, može se provesti destruktivnim ili nedestruktivnim tehnikama. Dodatak koncentrirane sumporne kiseline ili impregnacija silikagela sa koncentriranom sumpornom kiselinom destruktivne su tehnike koje se često koriste u analizi spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma. Često se koriste i višeslojne kolone koje sadrže kiseli, neutralni i lužnati silikagel. Druga mogućnost uklanjanja masti je nedestruktivnim tehnikama kromatografijom isključenjem (engl. *Size Exclusion Chromatography*, SEC) ili gel propusnom kromatografijom (engl. *Gel Permeation Chromatography*, GPC) gdje se organsko otapalo koristi kao mobilna faza.

Također, odvajanje polibromiranih difenil etera od ostalih postojećih organskih zagađivala, kao što su poliklorirani dibenzo-*p*-dioksini i dibenzofurani (PCDD/Fs) ili polibromirani dibenzo-*p*-dioksini i dibenzofurani (PBDD/Fs), najbolje se postiže pomoću tehnike SPE, korištenjem alumine kao sorbensa. Spojevi PBDE se dodaju na kolonu otopljeni u *n*-heksanu i eluiraju diklormetanom ili smjesom *n*-heksana i diklormetana (od 20 % do 50 % diklormetana). Odvajanje se također može postići na Florisilu s *n*-heksanom kao eluensom (slika 5). Učinkovito odvajanje polibromiranih difenil etera od ostalih halogeniranih spojeva posebno je važno kada se za detekciju koristi detektor zahvata elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD) obzirom na njegovu smanjenu selektivnost.



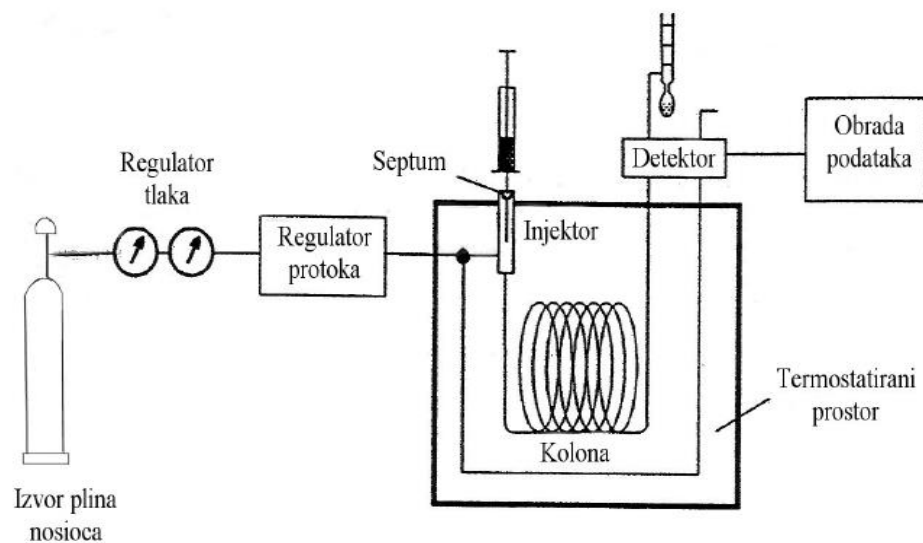
Slika 5. Shema pročišćavanja uzorka na sorbensu: a) kondicioniranje kolone; b) nanošenje uzorka; c) vezanje željenih spojeva na sorbens; d) ispiranje nečistoća; e) eluiranje željenih spojeva

Analiza spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma ne zahtijeva dodatno pročišćavanje ekstrakta obzirom da ti spojevi imaju duža vremena zadržavanja od ostalih

spojeva, odnosno njihovi pikovi se nalaze u dijelu kromatograma gdje gotovo da i nema drugih spojeva.^{1,5}

2.4. Kromatografsko određivanje spojeva PBDE

S obzirom na fizikalno-kemijska svojstva polibromiranih difenil etera, za njihovo određivanje najčešće se koristi plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) uz detektor spektrometrije masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS) i detektor zahvata elektrona. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) uz detektor spektrometrije masa koristi se puno manje. Razlog tome je što nije dovoljno osjetljiva za analizu kongenera BDE-209 u tragovima, usprkos činjenici da se koristi u analizi termički nestabilnih spojeva.^{1,5}



Slika 6. Dijelovi sustava plinske kromatografije

2.4.1. Kolone za plinsku kromatografiju

Polibromirani difenil eteri su spojevi niske polarnosti i stoga su za njihovo učinkovito odvajanje i određivanje najprikladnije nepolarne i srednje polarne kolone za plinsku

kromatografiju s nepokretnom fazom dimetilpolisiloksanom koji sadrži 1 do 5 % fenilnih skupina.

Koeuliranje s drugim halogeniranim spojevima primijećeno je samo za kongenere BDE-28 i BDE-49. Međutim, za odvajanje i točno određivanje kongenera BDE-153 i BDE-183 od ostalih bromiranih spojeva kao što su heksabromociklododekani, polibromirani bifenili, tetrabromobisfenol-A ili tetrabromobisfenol-A dimetil eter, potrebna je spektrometrija masa kao detektor.

Obzirom da se spojevi PBDE supstituirani s većim brojem Br atoma dulje zadržavaju u koloni i samim time su duže vrijeme izloženi visokoj temperaturi, može doći do njihove termičke razgradnje. Dok su nepolarne kolone ili kolone srednje polarosti duljine 30 m optimalne za odvajanje spojeva PBDE supstituiranih s manjim brojem Br atoma, analiza spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma, posebice kongenera BDE-209, zahtijeva drugačije instrumentne uvjete. Temperatura koja je potrebna za hlapljenje kongenera BDE-209 u injektoru i koloni preklapa se s rasponom temperature u kojem dolazi i do njegovog raspada. Razgradnja u koloni može se uočiti kao podignuta bazna linija prije izlaska pika, dok razgradnja u injektoru rezultira pikovima njegovih razgradnih produkata, većinom okta- i nona-bromiranih difenil etera. Često kromatogrami pokazuju mješavinu ovih pokazatelja razgradnje kongenera BDE-209. Kako bi se smanjila termička razgradnja navedenog kongenera, potrebno je smanjiti vrijeme njegovog zadržavanja u injektoru i u koloni. Kako bi se smanjila njegova interakcija sa stacionarnom fazom izbor pada na kraće kolone (npr. 15 m ili manje) sa tankim slojem stacionarne faze (npr. 0,1 μm). Raspad kongenera BDE-209 može se dodatno smanjiti gradijentnim povišenjem temperature i brzim protokom (3 mL min⁻¹) mobilne faze. Također, što je kolona starija dolazi do povećanja broja aktivnih mjesta na stacionarnoj fazi te samim time i jače interakcije navedenog kongenera sa stacionarnom fazom što pogoduje njegovoj razgradnji.

Tip kolone koji omogućuje analizu spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma, a i onih supstituiranih s manjim brojem Br atoma je kolona s uskim promjerom cijevi (engl. *narrowbore*) od 0,25 mm i 0,32 mm koja ima mogućnost visoke rezolucije u kombinaciji sa brzim analizom. Nadalje, pikovi su uži, povećan je omjer signala i šuma, što u konačnici smanjuje granicu detekcije.^{1,5}

2.4.2. Injektiranje

Za analizu polibromiranih difenil etera preporuča se korištenje injektora za djelomično unošenje uzorka u kapilarnu kolonu („split/splitless“ injektor), injektor sa programiranom temperaturom isparavanja (engl. *Programmable Temperature Vaporization*, PTV), ili „on-column“ injektiranje uzorka. Najčešće se koristi tzv. „split/splitless“ injektiranje čime se omogućuje visoka osjetljivost, ali uz nekoliko nedostataka. Previsoka temperatura može uzrokovati razgradnju spojeva PBDE većih molekulskih masa, posebice kongenera BDE-209 koji ima procijenjenu temperaturu tališta između 300 °C i 310 °C i temperaturu razgradnje iznad 320 °C. Različiti utjecaj temperature može se ograničiti pravilnom kontrolom protoka plina u injektor ili upotrebom posebnog moda injektiranja, npr. „pressure pulse“. Uz pulsirajuće „split“ injektiranje (1:5 „split“ omjer) dobiju se simetrični pikovi te bolje odjeljivanje kongenera, ali manja osjetljivost. Ukoliko se koriste obložene unutarnje cjevčice (engl. *liner*) u injektorskom dijelu, razgradnja spojeva PBDE većih molekulskih masa može se dogoditi ako se analiti dugo zadržavaju u injektoru, uslijed interakcije sa aktivnom površinom u injektoru. U slučaju tzv. „splitless“ i injektora PTV koriste se obložene unutarnje cjevčice i uz povišenu temperaturu veća je mogućnost razgradnje. Stoga se kod analize kongenera BDE-209 njegovo izlaganje mogućim aktivnim mjestima može izbjeći malom površinom unutarnje cjevčice u kombinaciji sa djelotvornom deaktivacijom aktivnih mjesta. Preciznom optimizacijom injektora PTV, npr. bržim prolaskom uzorka skraćuje se vrijeme kontakta uzorka sa površinom unutarnje cjevčice i reducira utjecaj viših temperatura.

Kod uzoraka sa niskom koncentracijom spojeva najčešće je potrebno ukoncentrirati uzorak uparavanjem na niži volumen kako bi se spojevi mogli uspješno kvantificirati. Injektiranje velikih volumena (engl. *Large Volume Injection*, LVI) omogućuje injektiranje većih koncentracija spojeva u kolonu bez potrebe za smanjenjem volumena, čime se postižu niže granice kvantifikacije. Kombinacija sustava LVI-PTV omogućuje injektiranje do 125 µL spojeva PBDE, uključujući i kongener BDE-209 koji je termički nestabilan. Za kongener BDE-209 sustav LVI najbolje funkcionira s otapalom koje isparava pri višim temperaturama, prijenosom analita uz visoki tlak i krajnjom temperaturom dovoljno visokom da se postigne učinkovit prijenos u kolonu bez induciranja razgradnje.

Kod sustava „on-column“ injektiranja utjecaj više temperature nije prisutan jer se uzorak injektira na pretkolonu bez stacionarne faze pri temperaturi nižoj od vrelišta otapala.

Na taj način ne dolazi do gubitaka analita ili razgradnje. Ova vrsta injektiranja zahtijeva vrlo čiste ekstrakte, a ograničen je i volumen injektiranja, obično na manje od 1 μL . Ukoliko se uzastopno injektiraju nedovoljno pročišćeni ekstrakti, brzo dolazi do pogoršanja stanja kolone što rezultira pružanjem ili razvlačenjem pika i naposljetku znatnim gubitkom kongenera BDE-209. Za pripremu čistih ekstrakta često je potrebno provesti više koraka pročišćavanja što je kontradiktorno pokušaju smanjenja broja koraka pročišćavanja kako bi se smanjio gubitak analita.

Zaključno, činjenica je da je vrijeme eluiranja spojeva sa kolone vremenski puno dulje od zadržavanja uzorka u injektoru što temperaturu kolone čini ipak važnijim parametrom.^{1,5}

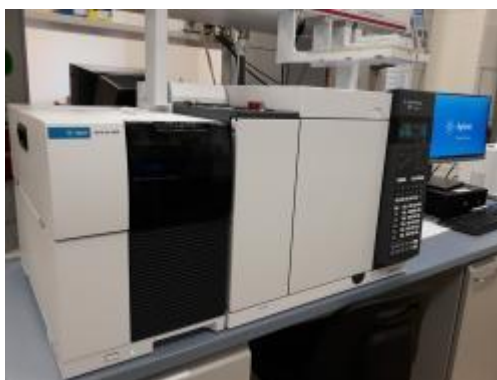
2.4.3. Kvalitativna i kvantitativna analiza

Prema preporuci 2014/118/EU Europske komisije za određivanje polibromiranih difenil etera u hrani potrebno je koristiti analitičke metode sa granicom određivanja 0,01 ng g^{-1} mokre mase uzorka ili niže, a koje dokazano daju pouzdane rezultate. Maseni udjeli spojeva PBDE mogu se, i često se normaliziraju prema određenom sadržaju masti u uzorku i izražavaju kao ng g^{-1} mase masti.

Plinska kromatografija sa detektorom zahvata elektrona često se koristi u analizi halogeniranih spojeva u hrani zbog relativno niske cijene opreme i njenog održavanja. Tehnika GC-ECD najčešće se koristi u analizi spojeva PBDE supstituiranih s manjim brojem Br atoma, ali se uspješno može koristiti i za analizu spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma u različitim uzorcima hrane sa granicom detekcije u pg g^{-1} . Glavni nedostatak ove tehnike je mala selektivnost ukoliko se u uzorku nalaze drugi spojevi koji sadrže visoko elektronegativne atome te je velika mogućnost njihovog koeluiranja i u većini slučajeva je potrebno potvrditi rezultate, npr. s tehnikom plinske kromatografije uz detektor spektrometrije masa. Kod analize spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma manja je vjerojatnost koeuliranja s drugim spojevima koji sadrže elektronegativne atome jer navedeni spojevi imaju duža vremena zadržavanja na koloni od većine drugih spojeva. Za tri-do nona-bromirane kongenere najniže vrijednosti granice detekcije u hrani postignute su upravo pomoću detektora zahvata elektrona.

Spektrometrija masa omogućuje kvantitativno i kvalitativno određivanje spojeva na temelju dobivenih omjera mase i naboja (m/z) fragmenata analiziranih kongenera polibromiranih difenil etera. Najčešće tehnike spektrometrije masa koje se koriste za analizu spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma u hrani su spektrometrija masa niske rezolucije (engl. *Low Resolution Mass Spectrometry*, LRMS) uz ionizaciju elektronima (engl. *Electron Ionization*, EI), negativnu kemijsku ionizaciju (engl. *Negative Chemical Ionization*, NCI) ili puno češće uz ionizaciju niskoenergijskim elektronima (engl. *Electron Capture Negative Ionization*, ECNI) te spektrometrija masa visoke rezolucije (engl. *High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS) uz ionizaciju elektronima koja se često naziva i „zlatnim standardom“ u analizi postojanih organskih zagađivala koji se u uzorcima nalaze u ultratragovima.

Spektrometrija masa niske rezolucije je jednostavna tehnika sa relativno pristupačnom cijenom opreme i njenog održavanja te je zato i jedna od najpopularnijih u analizi spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma (slika 7). Uz kvadrupolni analizator mase s tehnikama ionizacije EI, NCI i ECNI, tehnika LRMS uspješno je prilagođena za kvantifikaciju polibromiranih difenil etera u hrani životinjskog podrijetla. Moguće je kvantificirati i kongener BDE-209 unatoč slabom prijenosu iona veće mase kroz kvadrupolni analizator mase.



Slika 7. Spektrometar masa niske rezolucije

Ionizacija niskoenergijskim elektronima je jedna od najosjetljivijih tehnika ionizacije za određivanje polibromiranih difenil etera sa granicom detekcije instrumenta od < 1 fg do 400 fg za kongenere di- do deka-BDE. Selektivna je za bromirane spojeve, ali ne daje informacije o strukturi pojedinih spojeva. Određivanje spojeva temelji se samo na razlikama u

vremenima zadržavanja, a odziv se smanjuje sa povećanjem broja Br atoma. Karakteristični fragment koji nastaje ionizacijom kongenera BDE-209 je bromirani fenoksidni ion $[C_6H_{(5-x)}Br_xO]^-$, dok se za kvantitativno određivanje okta- (BDE-196 i BDE-197), odnosno nona- (BDE-206, BDE-207 i BDE-208) bromiranih difenil etera koriste tetrabromofenoksidni i pentabromofenoksidni ion. Stvaranje fenoksidnog iona ovisi o broju i položaju bromovih atoma, pa prema tome nastali fenoksidni ioni omogućuju razlikovanje izomera, kao što su na primjer kongeneri okta-BDE sa tri i pet bromovih atoma vezanih na dva benzenska prstena ili četiri bromova atoma vezanih na svakom prstenu. Temperatura izvora iona ima značajan utjecaj na prinos iona viših m/z koji nastaju iz kongenera BDE-209. Temperatura izvora je također važna kako bi se izbjegla njegova kondenzacija na površinama izvora iona što može izazvati širenje pikova. Kombinacijom tehnika ECNI-LRMS postižu se vrijednosti granice detekcije za kongenere tri- do deka-BDE u rasponu od 0,01 do 10 ng g⁻¹ mase masti uzorka te se stoga tehnika spektrometrije masa s jednim kvadrupolom može uspješno primijeniti u rutinskoj analizi polibromiranih difenil etera u hrani.

Spektrometri masa visoke rezolucije mogu postići rezoluciju veću od 4000 (slika 8). Osjetljivost za spojeve većih molekulskih masa nije smanjena jer učinkovitost prijenosa iona kroz kvadrupolni analizator masa nije ovisna o masi zbog dodatnih magnetskih i električnih komponenti. Specifični ion $[M-2Br]^+$ koji nastaje od kongenera BDE-209 omogućuje granice detekcije u rasponu od 78 do 197 pg g⁻¹ mase masti uzorka. Kako ne bi nastale interferencije zbog prisutnosti polikloriranih bifenila (engl. *Polychlorinated Biphenyls*, PCB), polikloriranih dibenzofurana i polikloriranih naftalena u uzorku, potrebno je odvojiti spojeve u različite frakcije tijekom pročišćavanja prije same instrumentne analize. Tehnika GC-HRMS je prikladnija za određivanje masenih udjela polibromiranih difenil etera u ultra-tragovima u uzorcima hrane od tehnike GC-LRMS.



Slika 8. Spektrometar masa visoke rezolucije

Ionizacija elektronima je tehnika ionizacije koja se često koristi bilo u tehnici LRMS ili HRMS. Iako tehnike NCI i ECNI imaju 15 puta veću osjetljivost od tehnike EI za spojeve PBDE supstituirane s većim brojem Br atoma, tehnika EI je selektivnija zato što daje više informacija o strukturi ioniziranih spojeva. Nastaju karakteristični ioni $[M]^+$ i $[M-2Br]^+$ te je moguće razlikovati kongenere polibromiranih difenil etera unutar homolognih grupa kao i druge vrste bromiranih spojeva. Granice detekcije za spojeve PBDE supstituirane s većim brojem Br atoma nešto su više kod kombinacije tehnika EI-HRMS nego u slučaju kombinacije tehnika ECNI-LRMS. Što se tiče kombinacije tehnika EI-LRMS, granice detekcije su za barem jedan red veličine veće nego uz tehniku ECNI uz smanjenje osjetljivosti povećanjem stupnja bromiranosti spojeva.

Spektrometrija masa uz analizator vremena leta (engl. *Time of Flight*, TOF) uspješno se može primijeniti u analizi hrane koja sadrži veće masene udjele polibromiranih difenil etera kao što je riba. Za određivanje navedenih spojeva prisutnih u tragovima u nekoj drugoj vrsti hrane ipak je potrebna osjetljivija tehnika.

Tandemna spektrometrija masa (MS/MS) omogućuje granice detekcije za kongenere tri- do deka-BDE u pg g^{-1} mase masti uzorka. Uz tehniku kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) povećava se osjetljivost tehnike te su granice detekcije instrumenta manje od 10 fg. Međutim, granice detekcije za kongener BDE-209 su deset puta veće nego one kod tehnike MS/MS uz ionizaciju elektronima. Razlog tome je vjerojatno nedostatak prikladnog unutarnjeg standarda.

Općenito, tehnika GC-MS/MS je zadovoljavajuća za kvantifikaciju spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma u hrani životinjskog podrijetla.

Tekućinska kromatografija u kombinaciji sa spektrometrijom masa nije uobičajena analitička tehnika za određivanje spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma. Ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray*, ESI) i tehnika kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku su najčešće tehnike ionizacije u tehnici LC-MS, ali u analizi spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma daju nizak odziv ili uopće ne detektiraju spojeve. Tehnika fotoionizacije pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI) pokazala se učinkovitom u analizi razmatranih spojeva. Mogu se postići granice detekcije od 500 do 1500 pg za kongenere heksa- do deka-BDE. Iako su granice određivanja više nego kod tehnika ECNI-LRMS ili EI-HRMS, moguće ju je koristiti u analizi tragova kongenera BDE-209 u hrani.

Za kongenere tri- do nona-BDE najniže vrijednosti granica detekcije u hrani postignuti su pomoću detektora zahvata elektrona, a nešto više uz tehniku spektrometrije masa visoke rezolucije. S druge strane za tandemnu spektrometriju masa granica detekcije je za dva reda veličine veća nego za tehnike ECD i HRMS te jedan red veličine veća od tehnike LRMS. Velika molekulska masa i osjetljivost na termičku i fotolitičku razgradnju čine kongener BDE-209 najproblematičnijim za analizu u usporedbi s analizom ostalih kongenera polibromiranih difenil etera. Općenito su, uzimajući u obzir sve analitičke tehnike, granice detekcije za kongener BDE-209 značajno veće nego za ostale kongenere, osim u slučaju korištenja tehnike ECD gdje su postignute jednako niske granice detekcije. Nešto malo više vrijednosti granice detekcije za kongener BDE-209 od tehnike ECD postignute su sa tehnikom HRMS. Za određivanje kongenera BDE-209 najmanje osjetljive tehnike su LRMS i MS/MS i stoga se one i najmanje koriste. U posljednje vrijeme se sve češće koristi kombinacija tehnika APCI-MS/MS za analizu spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma u hrani jer nema gubitka osjetljivosti.^{1,5}

Zaključak je da su tehnike ECNI-LRMS, EI-HRMS i ECD najosjetljivije u analizi spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma u hrani. Tehnika HRMS je najselektivnija, zatim slijedi tehnika ECNI, dok je tehnika ECD najmanje selektivna i trebala bi se primjenjivati za analizu dobro poznatih matrica hrane kod kojih je poznato koji spojevi bi mogli koeluirati s polibromiranim difenil eterima.

Za točnu kvantifikaciju spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma koriste se prikladni unutarnji i vanjski standardi. Kao unutarnji standardi za koriste se spojevi PBDE supstituirani s manjim brojem Br atoma ili spojevi PCB supstituirani s većim brojem Cl atoma za koje se pouzdano zna da nisu prisutni u uzorku. Idealan izbor su ^{13}C -obilježeni standardi, međutim njihovo korištenje je ograničeno samo na tehniku spektrometrije masa uz ionizaciju elektronima ili ionizaciju niskoenergijskim elektronima za kongenere iz kojih nastaju fragmenti iona s visokim omjerom m/z , a predstavljaju i značajan finansijski trošak. Korištenje obilježenog standarda u kombinaciji sa tehnikom ionizacije elektronima niske energije (35 eV) omogućila je granice detekcije od 100 pg g^{-1} mokre mase uzorka za kongener BDE-209.⁵

Komercijalno je dostupno otprilike 60-tak različitih neobilježenih standardnih otopina kongenera polibromiranih difenil etera, dok obilježenih ima 30-tak.

2.5. Maseni udjeli polibromiranih difenil etera u hrani

Hrana u kojoj se najviše analiziraju polibromirani difenil eteri je riba i morski plodovi, zatim meso i mesni proizvodi, jaja te mlijeko i mliječni proizvodi. Kongeneri polibromiranih difenil etera koji se najčešće pronalaze su BDE-47, -99, -100 koji su sastojci formulacije „penta“ te u manjoj mjeri i kongeneri BDE-49, -153 i -154. Od kongenera supstituiranih s većim brojem Br atoma dominira potpuno bromirani kongener BDE-209 u svim vrstama hrane, vjerojatno zato jer je upotreba formulacije „deka“ najkasnije zabranjena te još u velikoj mjeri dolazi do otpuštanja njenih sastojaka u okoliš.

U Europi su analizom različite vrste hrane najveći maseni udjeli spojeva PBDE nađeni u ribi i morskim plodovima s rasponom sume masenih udjela spojeva PBDE od $0,02$ do $1,37 \text{ ng g}^{-1}$ mokre mase uzorka, uz iznimku podataka za Norvešku u kojoj je detektirana suma masenih udjela spojeva PBDE od 11 ng g^{-1} mokre mase u uzorcima ribe. Uz kongenere BDE-47, -99, -100 i -209, najzastupljeniji kongeneri su i BDE-49 te BDE-154. Iako su i u Italiji najveći maseni udjeli spojeva PBDE također pronađeni u ribi, kongener BDE-209 je detektiran samo u dvije riblje vrste.^{4,9-11}

Analiza različitih vrsta hrane u Kini pokazala je da meso i mesni proizvodi sadrže najveće sume masenih udjela spojeva PBDE ($0,024$ – $13,3 \text{ ng g}^{-1}$ mokre mase uzorka), iza čega

slijede riba i morski proizvodi ($0,042\text{--}7,6\text{ ng g}^{-1}$ mokre mase) te jaja ($0,759\text{--}2,47\text{ ng g}^{-1}$ mokre mase). Kongener BDE-209 je najzastupljeniji u ukupnoj sumi masenih udjela detektiranih kongenera polibromiranih difenil etera, s doprinosom sumi od čak 85 %, a zatim slijede kongeneri BDE-153, -47, -183, -154, -28 i -99.¹²

Analizom ribe (lat. *Micropogonias furnieri*) rasprostranjene duž cijele jugozapadne obale Atlanskog oceana koja je dobar pokazatelj onečišćenja okoliša ovim spojevima, a također se koristi u prehrani ljudi, nađeno je da su najzastupljeniji kongeneri BDE-47, -99, -100, -153 i -154, dok je kongener BDE-209 detektiran u nižim masenim udjelima.¹³ Polibromirani difenil eteri su pronađeni i u ribi (lat. *Pungitius pungitius*) s Aljaske, gdje su najzastupljeniji kongeneri BDE-47, -99 i -100, a kongener BDE-209 je također pronađen u puno manjim masenim udjelima. Kongeneri supstituirani s većim brojem Br atoma su doprinijeli sumi masenih udjela spojeva PBDE sa svega 3 %, tako da je njihov unos preko riba u organizam ljudi s tog područja znatno niži.¹⁴

Analizom spojeva PBDE u ribama iz sjevernog i sjeverozapadnog Atlanskog oceana, zapadnog Indijskog oceana te Sredozemnog mora zaključeno je da ribe iz Sredozemnog mora sadrže najveće masene udjele analiziranih spojeva. Razlog tome je položaj i poluotvoreni oblik Sredozemnog mora zbog kojeg je ograničeno strujanje vode, a time i slabija izmjena voda. Uz to, velika naseljenost, industrija i turizam čine ovo područje jednim od najonečišćenijih područja u svijetu.⁹

Općenito, najveći maseni udjeli spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma u hrani pronađeni su Kini, zatim u Sjevernoj Americi, a najmanji u Europi. Uz to što je u Kini proizvodnja formulacije „deka“ najkasnije zabranjena, kontinuirani izvor izloženosti razmatranim spojevima predstavljaju mnogobrojna legalna ali i ilegalna odlagališta elektroničke opreme.

Iako uzorci ljudskog mlijeka sadrže znatno niže razine spojeva PBDE u usporedbi sa ostalim vrstama hrane, zbog spoznaja vezanih uz unos i utjecaj ovih spojeva na dojenčad, to je jedan od najčešće analiziranih uzoraka. Najveći maseni udjeli navedenih spojeva detektirani su u Sjevernoj Americi sa medijanima sume masenih udjela spojeva PBDE od $19,9$ do $54,5\text{ ng g}^{-1}$ mase masti, zatim u Aziji od $1,5$ do $11,5\text{ ng g}^{-1}$ mase masti, a najniže u Europi s rasponom od $0,4$ do $6,3\text{ ng g}^{-1}$ mase masti.

Najzastupljeniji kongeneri u ljudskom mlijeku su BDE-47, -99, -153 i -209. Obzirom da se kongener BDE-209 zadržava u ljudskom organizmu samo do 15 dana prije nego se raspadne, njegova zastupljenost u uzorcima mlijeka roditelja upućuje na njihovu nedavnu i kontinuiranu izloženost „deka“ formulaciji. Uz to, izloženost ovom spoju značajno doprinosi povećanju udjela ostalih kongenera koji nastaju njegovim raspadom, a koji su čak i toksičniji.^{4,10,12,15}

§ 3. ZAKLJUČAK

Analiza polibromiranih difenil etera supstituiranih s većim brojem Br atoma, okta-, nona- i deka-bromiranih difenil etera, zahtjevnija je od analize spojeva polibromiranih difenil etera supstituiranih s manjim brojem Br atoma i potreban je drugačiji pristup. Velika molekulska masa te dodatno i osjetljivost na termičku i fotolitičku razgradnju čine tu skupinu kongenera polibromiranih difenil etera najproblematičnijima za analizu. Stoga je tijekom cijelog analitičkog postupka, od skupljanja uzoraka i skladištenja, ekstrakcije i pročišćavanja pa sve do kvalitativne i kvantitativne analize potrebno uložiti maksimalne napore da se spriječi njihov raspad. Dodatni problem je što se potpuno bromiranog kongenera BDE-209 u uzorcima hrane pronalazi u većim masenim udjelima od okta- i nona-bromiranih difenil etera koji su njegovi glavni razgradni produkti te ukoliko dođe do njegovog raspada, maseni udjeli kongenera okta- i nona-BDE će biti lažno previsoki, a maseni udjeli kongenera BDE-209 lažno preniski. Posljedično, dobivanje pouzdanih i ponovljivih rezultata jedan je od većih izazova u analizi polibromiranih difenil etera supstituiranih s većim brojem Br atoma.

Spektrometrija masa visoke rezolucije je nedvojbeno najselektivnija i najosjetljivija tehnika u analizi spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma u hrani i smatra se referentnom tehnikom. Međutim, oprema i njeno održavanje je vrlo skupo. S druge strane, detektor zahvata elektrona ima visoku osjetljivost, ali zbog manjka selektivnosti poliklorirani bifenili i ostali halogenirani spojevi prisutni u hrani životinjskog podrijetla mogu interferirati sa kongenerima ispitivanih spojeva te je potrebno potvrditi rezultate nekom drugom tehnikom. Tehnika GC-MS/MS uz kemijsku ionizaciju pri atmosferskom tlaku jedna je od najosjetljivijih tehnika u određivanju spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma u hrani te je izgledno da će u budućnosti njena primjena rasti.

Vrijednost granice određivanja od $0,01 \text{ ng g}^{-1}$ mokre mase uzorka ili niža, definirana preporukom 2014/118/EU Europske komisije za određivanje 10 kongenera polibromiranih difenil etera (BDE-28, -47, -49, -99, -100, -138, -153, -154, -183 i -209) u hrani često nije dostižna u laboratoriju, osobito za kongener BDE-209. Samo nekoliko metoda koje zahtijevaju skupe i vremenski duge analize mogu postići ove vrijednosti.

Obzirom da su polibromirani difenil eteri supstituirani s većim brojem Br atoma najčešće u hrani prisutni u tragovima, njihovo određivanje i dalje predstavlja zahtjevan i opsežan analitički zadatak. Prema tome potrebno je optimirati uvjete pripreve i obrade uzorka

te poboljšati tehnike instrumentne analize za što točniju i pouzdaniju analizu, a poželjno je i da je ekonomski pristupačna.

§ 4. LITERATURNI IZVORI

1. W. J. Pietroń, P. Małagocki, *Talanta* **167** (2017) 411–427.
2. E. Van den Steen, A. Covaci, V. L. B. Jaspers, T. Dauwe, S. Voorspoels, M. Eens, R. Pinxten, *Environ Pollut* **148** (2007) 648-653.
3. *Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food*, EFSA, Parma, Italy, 2011
4. D. Klinčić, M. Dvorščak, K. Jagić, G. Mendaš, S. Herceg Romanić, *Environ Sci Pollut Res* **27**(6) (2020) 5744-5758.
5. A. Kierkegaard, U. Sellström, M. S. McLachlan, *J Chromatogr A*, **1216** (2009) 364–375.
6. Y. Jiang, L. Yuan, Q. Li, S. Ma, Y. Yub, *Sci Total Environ* **696** (2019) 133902.
7. H. A. Currier, K. M. Fremlin, J. E. Elliott, K. G. Drouillard, T. D. Williams, *Chemosphere* **238** (2020) 124577.
8. *Preporuka Europske komisije (2014/118/EU)*, Službeni list Europske Unije, 2014.
9. T. Tavoloni, A. Stramenga, T. Stecconil, M. Siracusa, S. Bacchiocchi, A. Piersanti, *Anal Bioanal Chem* **412** (2020) 397-411.
10. D. Zacs, I. Perkons, V. Volkovs, V. Bartkevics, *Chemosphere* **230** (2019) 396-405.
11. M. Garcia Lopez, M. Driffield, A. R. Fernandes, F. Smith, J. Tarbin, A. S. Lloyd, J. Christy, M. Holland, Z. Steel, C. Tlustos, *Chemosphere* **197** (2018) 709-715
12. J. Wang, X. Zhao, Y. Wang, Z. Shi, *Sci Total Environ* **666** (2019) 812–820.
13. A. C. Pizzochero, A. de la Torre, P. Sanz, I. Navarro, L. N. Michel, G. Lepoint, K. Das, J. G. Schnitzler, S. R. Chenery, I. D. McCarthy, O. Malma, P. R. Dorneles, M. Ángeles Martínez, *Sci Total Environ* **682** (2019) 719–728.
14. G. Zheng, P. Miller, F. A. von Hippel, C. L. Buck, D. O. Carpenter, A. Salamova, *Environ Pollut* **259** (2020) 113872.
15. H. Matovu, M. Sillanpää, P. Ssebugere, *Sci Total Environ* **692** (2019) 1106–1115.