



Sveučilište u Zagrebu

Izazovi u analizi polibromiranih difenil etera supstituiranih s većim brojem Br atoma u hrani

Karla Jagić

Kemijski seminar 1

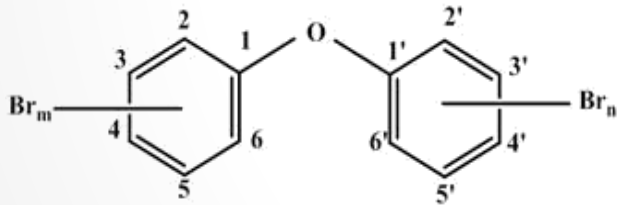
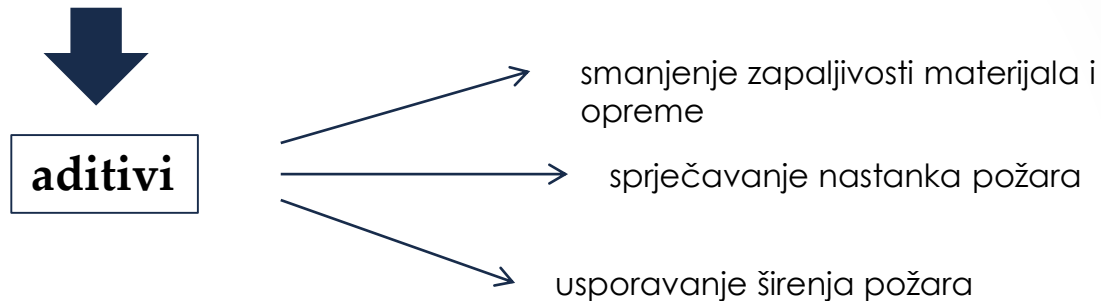
Poslijediplomski sveučilišni studij Analitička kemija

Prirodoslovno-matematički fakultet

Polibromirani difenil eteri (engl. *Polybrominated Diphenyl Ethers*, PBDE)



Bromirani usporivači gorenja (engl. *Brominated Flame Retardants*, BFR) – 1960-ih i 1970-ih



Slika 1. Općenita struktura kongenera polibromiranih difenil etera

209 izomera
10 homolognih grupa

deka-bromirani difenil eter (BDE-209)


- tri komercijalno dostupne formulacije: „penta“, „okta“ i „deka“



- spojevi PBDE: vrlo postojani u okolišu
skloni bioakumulaciji i biomagnifikaciji
toksični za ljude i životinje
prisutni u svim dijelovima svijeta



- *Stockholmska konvencija o postojanim organskim onečišćujućim tvarima*

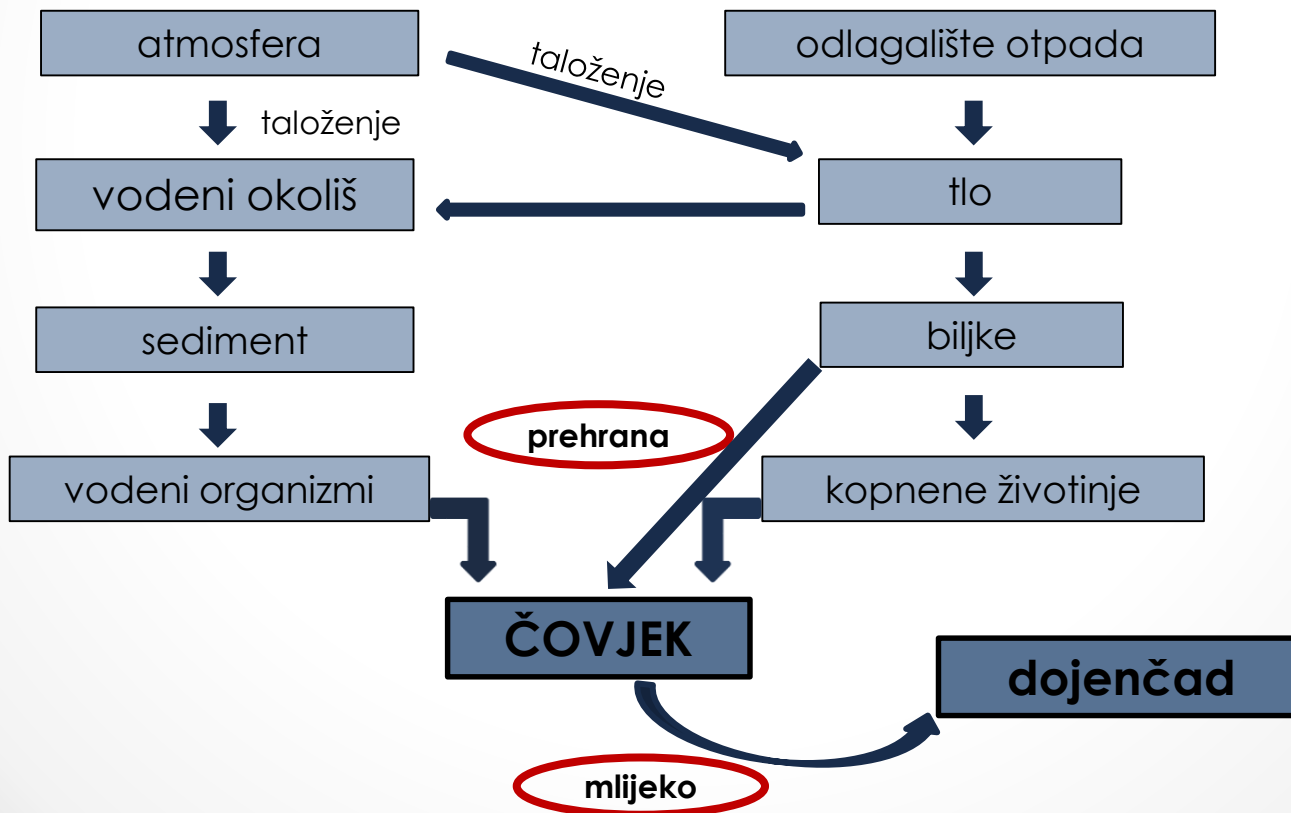
„penta i „okta“ – 2009. godine
„deka“ (> 97 % BDE-209) – 2017. godine 



- spojevi PBDE susplituirani s većim brojem Br atoma: **okta-, nona- i deka-BDE kongeneri**



- Unos u ljude putem prehrane**



- preporuka 2014/118/EU Europske komisije



jaja i proizvodi od jaja, mlijeko i mliječni proizvodi, meso i mesni proizvodi, životinjske i biljne masti i ulja, riba i drugi plodovi mora, proizvodi za posebne prehrambene uporabe, hrana za dojenčad i malu djecu

BDE-28, -47, -49, -99, -100, -153, -154, -138, -183, -209

Analitičke metode – LOQ $\leq 0,01 \text{ ng g}^{-1}$

- maksimalni dopušteni maseni udio spojeva PBDE **u ribama - $0,0085 \mu\text{g kg}^{-1}$ mokre mase**
- drugih zakona nema
- procjene toksičnosti spojeva PBDE – uglavnom životinjski modeli

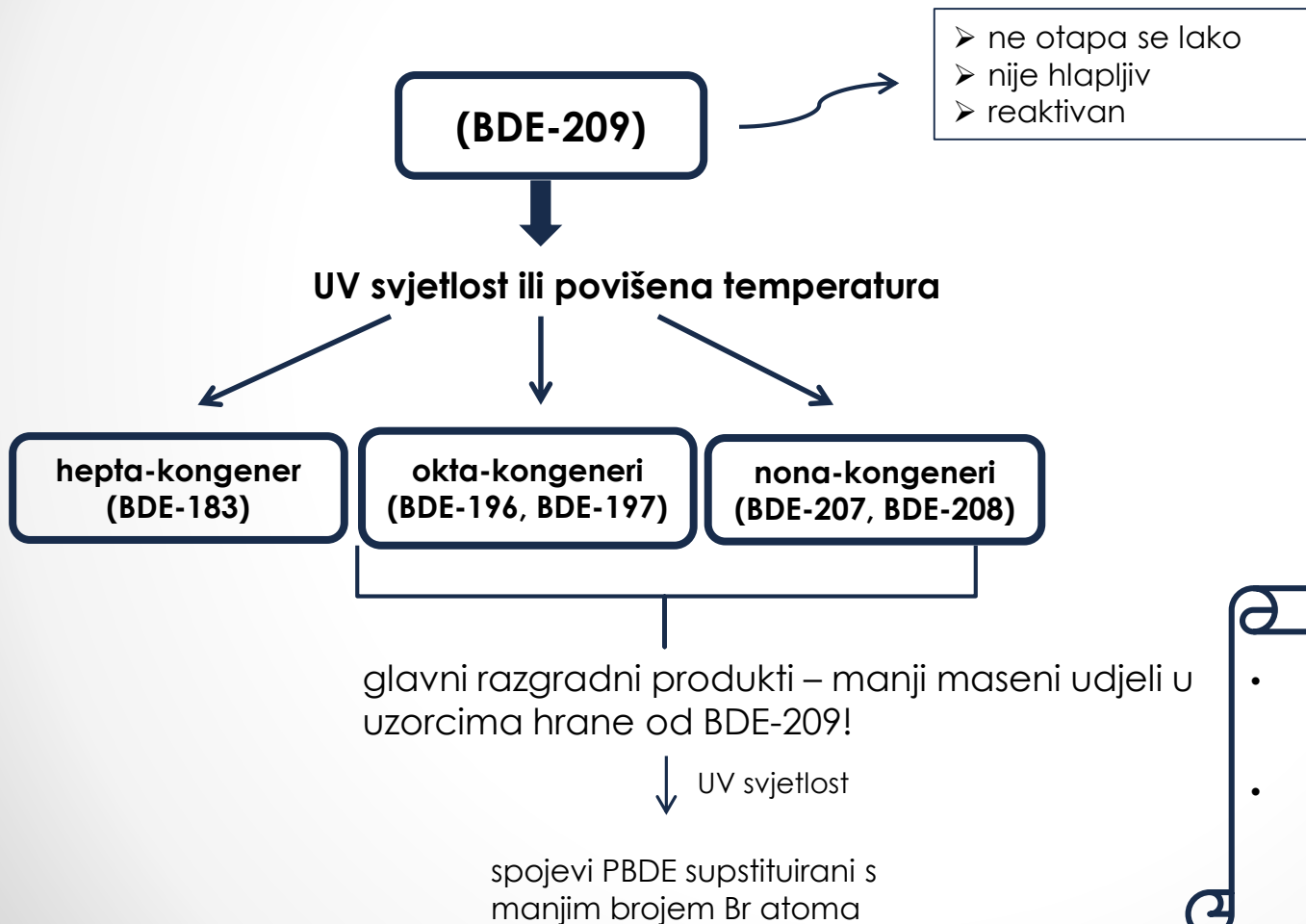
formulacija „penta“ - utječe na razine hormona štitnjače i neurobihevioralne poremećaje

formulacija „okta“ - povećava fetalnu toksičnost i teratogenost

formulacija „deka“ - utječe na morfološke promjene štitnjače, jetre i bubrega

Kemijska analiza

- najčešće se analiziraju kongeneri BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154, -183 i -209
- analitika spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma - zahtjevna i potreban je drugačiji pristup



- **smanjiti razgradnju kongenera BDE-209!**
- **uzorke i ekstrakte zaštititi od UV svjetlosti**

Prethodna obrada uzorka



- najčešće se analizira hrana životinjskog podrijetla s većim udjelom masti u čvrstom ili polučvrstom stanju
- uklanjanje vode: liofilizacijom ili dodatkom anhidridnog natrijevog sulfata
- skladištenje: u frižidere ili pri sobnoj temperaturi zaštićeni od UV svjetlosti

Ekstrakcijske tehnike

- učinkovitost ekstrakcije: vrsta otapala, vrijeme ekstrakcije, **temperatura!**, tlak, ekonomičnost
- organska otapala: *n*-heksan, diklormetan, aceton, dietil eter, etil acetat, acetonitril ili smjese navedenih otapala u različitim omjerima

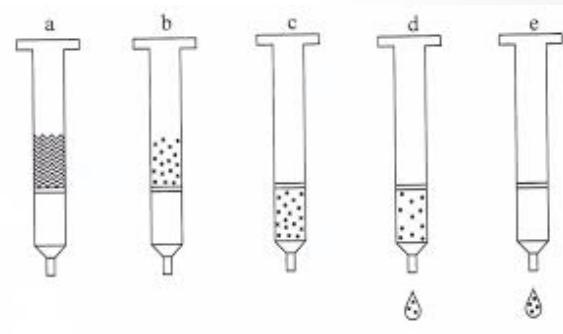
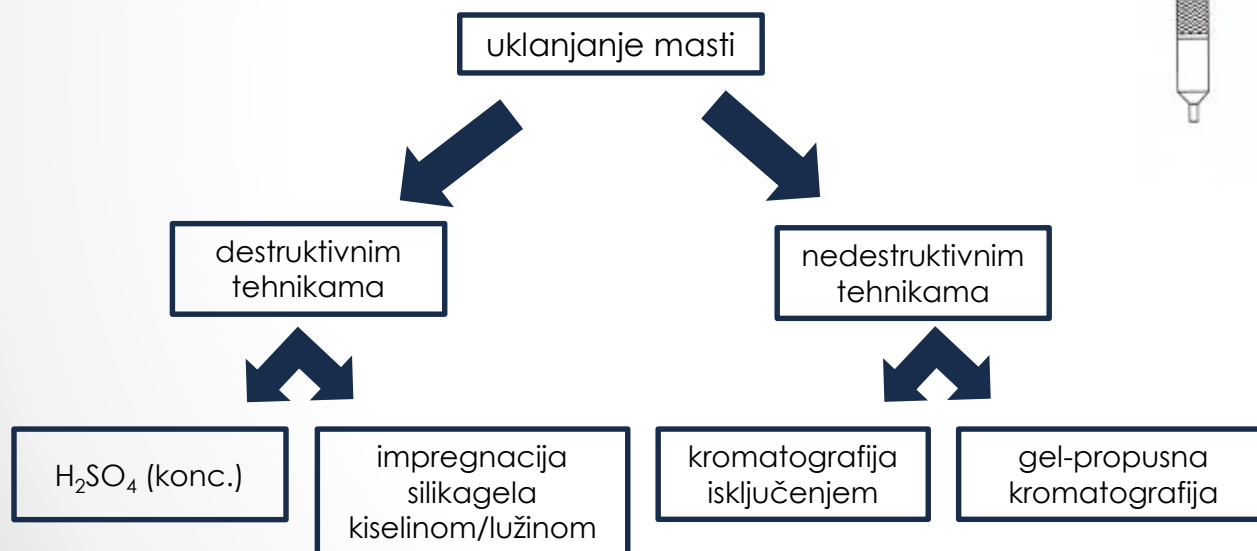
- **ekstrakcija otapalom** – potrebne velike količine otapala
- **ekstrakcija po Soxhletu** – učinkovita, ali dugotrajna i zahtijeva velike volumene otapala
- **ekstrakcija otapalom potpomognuta visokim tlakom (engl. *Pressurized Liquid Extraction, PLE*)**
 - koristi povišenu temperaturu (80 - 130 °C) i povišeni tlak (100 – 200 bar)
 - učinkovita i brza ekstrakcija u 2 ili 3 ekstrakcijska ciklusa
 - mogućnost istovremenog pročišćavanja ekstrakta
 - skupa
- **ekstrakcija čvrsto-tekuće potpomognuta ultrazvukom (engl. *Ultrasound -Assisted Leaching, USAL*)**
 - ultrazvučni valovi uzrokuju kavitaciju i mehaničko miješanje
 - nema razgradnje termički nestabilnih spojeva
 - ispiranje (engl. *leaching*) - ekstrakcija čvrsto-tekuće
 - selektivna
- **ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *Microwave-Assisted Extraction, MAE*)**
 - smanjena upotreba otapala, smanjeno vrijeme ekstrakcije, povećanje prinosa analita, automatizacija i obrada većeg broja uzoraka istovremeno
 - ekstrakti zahtijevaju daljnje pročišćavanje
 - može se koristiti za tekuće uzorke

➤ **ekstrakcija raspršenjem uzorka kroz čvrstu fazu (engl. *Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD*)**

- za uzorke s većim udjelom masnoće
- miješanje male količine uzorka s većom količinom sorbensa te eluiranje s kolonice pogodnim otapalom
- mogućnost istovremene ekstrakcije i pročišćavanja uzorka

Pročišćavanje uzoraka

- potreban je vrlo selektivan postupak



* spojevi PBDE supstituirani s većim brojem Br atoma imaju duža vremena zadržavanja od ostalih spojeva

Kromatografsko određivanje spojeva PBDE

➤ Kolone za plinsku kromatografiju

- spojevi PBDE (niska polarnost) → nepolarne i srednje polarne kolone (dimetilpolisiloksan s 1 - 5 % fenil)
- kongeneri supstituirani s većim brojem Br atoma, **posebice BDE-209** → potrebni drugačiji instrumentni uvjeti

duljina kolone: 30 m

dulje vrijeme zadržavanja



mogućnost termičke razgradnje



podignuta bazna linija prije izlaska pika i/ili pojava pikova razgradnih produkata (okta- i nona-BDE)

duljina kolone: 15 m ili manje

kraće vrijeme zadržavanja



smanjena interakcija sa stacionarnom fazom



smanjenje raspada: povišenjem temperature ili bržim protokom (3 mL min⁻¹) mobilne faze

- kolone s uskim promjerom cijevi (engl. *narrowbore*)- analiza spojeva PBDE supstituiranih s većim i manjim brojem Br atoma

visoka rezolucija, brza analiza, uži pikovi, povećan S/N → niže granice detekcije

➤ Injektiranje

a) injektor za djelomično unošenje uzorka u kapilarnu kolonu („split/splitless“ injektor)

- visoka osjetljivost
- previsoka temperatura → razgradnja spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma !



kontrolirani protok plina u injektor ili upotreba „pressure pulse“ injektiranja



- ✓ simetrični pikovi
- ✓ bolje odvajanje
- ✓ manja osjetljivost

b) injektor sa programiranom temperaturom isparavanja (engl. *Programmable Temperature Vaporization*, PTV)

- u kombinaciji s injektiranjem velikih volumena (engl. *Large Volume Injection*, LVI)



- ✓ injektiranje uzoraka većih koncentracija
- ✓ nema potrebe za ukoncentriravanjem uzorka smanjenjem volumena
- ✓ niže granice kvantifikacije
- ✓ mogućnost injektiranja do 125 µL (čak i kongenera BDE-209)

Obložene cjevčice (engl. *liner*)– aktivna površina i visoka temperatura → razgradnja!



- ✓ mala površina cjevčice
- ✓ djelotvorna deaktivacija aktivnih mjesta

c) „on-column” injektiranje

- uzorak se injektira na pretkolonu bez stacionarne faze → nema utjecaja viših temperatura

- ✓ nema gubitaka analita i razgradnje
- potrebni čisti ekstrakti
- × ograničen volumen injektiranja (do 1 μ L)

* zadržavanje uzorka u injektoru je puno kraće od vremena eluiranja spojeva sa kolone



temperatura kolone važniji parametar

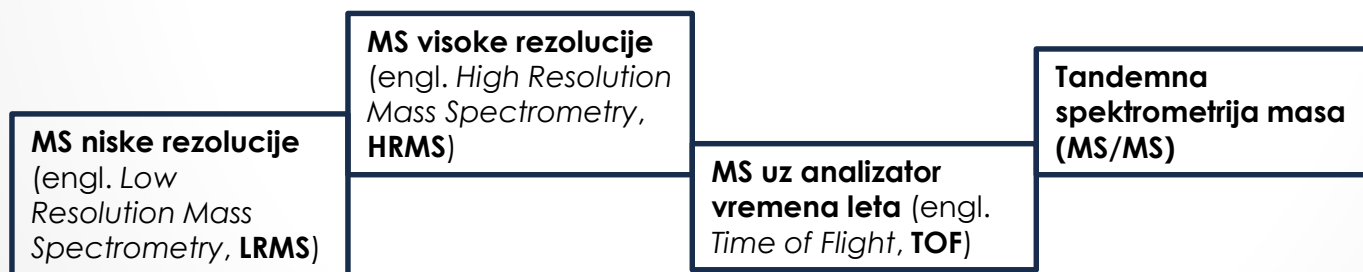
➤ Kvalitativna i kvantitativna analiza

- fizikalno kemijska svojstva spojeva PBDE → plinska kromatografija (engl. Gas Chromatography, **GC**)
 - tekućinska kromatografija (engl. Liquid Chromatography, **LC**) – manje se koristi

1) **GC-detektor zahvata elektrona** (engl. *Electron Capture Detector*, **ECD**)

- ✓ uspješno se koristi u analizi višebromiranih BDE-a
- ✓ granica detekcije: pg g^{-1}
- × smanjena selektivnost
- × potrebno potvrditi rezultate

2) **GC-detektor spektrometrije masa** (engl. *Mass Spectrometry*, **MS**)



2.a.) GC-LRMS

- ✓ jednostavna tehnika
- ✓ pristupačna cijena



Tehnike ionizacije:

- ionizacija elektronima (engl. *Electron Ionization*, **EI**)
- negativna kemijska ionizacija (engl. *Negative Chemical Ionization*, **NCI**)
- ionizacija niskoenergijskim elektronima (engl. *Electron Capture Negative Ionization*, **ECNI**) → najčešća

ECNI-LRMS

- ✓ jedna od najosjetljivijih tehnika ionizacije
- ✓ granica detekcije od 0,01 do 10 ng g⁻¹ mase masti uzorka (od tri- do deka-BDE)
- ✓ selektivna
 - razlike u vremenu zadržavanja – određivanje spojeva
 - × ne daje informacije o strukturi spojeva
 - × odziv se smanjuje povećanjem broja bromovih atoma

Karakteristični ioni:

BDE-209 → $[\text{C}_6\text{H}_{(5-x)}\text{Br}_x\text{O}]^-$

okta-BDE (-196, -197) → **tetrabromofenoksidni ion**

nona-BDE (-206, -207, -208) → **pentabromofenoksidni ion**

Fenoksidni ioni - omogućuju razlikovanje izomera!

2.b.) GC-HRMS

- ✓ može postići rezoluciju veću od 4000
- ✓ nema smanjenja osjetljivosti spojeva većih M_r
- ✓ granice detekcije od 78 do 197 pg g⁻¹ mase masti uzorka za BDE-209

➔ Tehnika ionizacije: **EI**

→ često se naziva „**zlatnim standardom**” u analizi postojećih organskim zagađivača koji se u uzorcima nalaze u ultra-tragovima

EI

- ✓ selektivnija od NCI i ENCI → daje informacije o strukturi
 - ✓ mogućnost razlikovanja kongenera unutar istih homolognih grupa
 - ✓ koristi se u tehnikama LRMS i HRMS
 - ✓ granice detekcije: EI-HRMS > ENCI-LRMS
EI-LRMS > ENCI-LRMS
- ↪ smanjena osjetljivost povećanjem stupnja bromiranosti

Karakteristični ioni:

[M]⁺ i [M-2Br]⁺

2.c.) GC-TOF

- ✓ prikladna za uzorke hrane s većim masenim udjelima spojeva PBDE(npr. riba)

2.d.) GC-MS/MS

- ✓ granice detekcije u pg g⁻¹ mase masti uzorka (od tri- do deka-BDE)



UZ **kemijsku ionizaciju pri atmosferskom tlaku**
(engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, **APCI**)

- ✓ granice detekcije instrumenta od 10 fg
- × granice detekcije za BDE-209 10× veće nego kod tehnike EI-MS/MS

3) LC-MS

- nije uobičajena metoda za analizu spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma



uz tehniku **fotoionizacije pri atmosferskom tlaku** (engl. *Atmospheric Pressure Photoionization*, **APPI**)

- ✓ granice detekcije od 500 do 1500 pg (od heksa- do deka-BDE)
- ✓ za analizu tragova kongenera BDE-209 u hrani

Granice detekcije za od tri- do nona-BDE:

- **ECD** (NAJNIŽE granice detekcije) < HRMS < LRMS < MS/MS

Granice detekcije za BDE-209

- **ECD** (NAJNIŽE granice detekcije) < HRMS

najmanje osjetljive: LRMS, MS/MS

→ **APCI-MS/MS** – sve češće se koristi u analizi spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma u hrani - nema gubitka osjetljivosti!

Unutarnji standardi → spojevi PBDE supstituirani s manjim brojem Br atoma ili spojevi PCB supstituirani s većim brojem Cl atoma

¹³C-obilježeni standardi → MS uz EI ili ECNI

→ s EI niske energije (35 eV) - granice detekcije od 100 pg g⁻¹ mokre mase uzorka za BDE-209

Maseni udjeli spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma u hrani



- najčešće se pronalaze kongeneri: BDE-47, -99, -100, 49, -153, -154 i **-209**

Europa

- najveći maseni udjeli u ribama i morskim plodovima (Σ PBDE od **0,02** do **1,37 ng g⁻¹** mokre mase)
- izuzetak: Norveška (Σ PBDE od **11 ng g⁻¹** mokre mase)
- Najzastupljeniji kongeneri: BDE-47, -99, -100, -209, BDE-49, BDE-154
- izuzetak Italija: BDE-209 detektiran u samo 2 riblje vrste

Kina

- meso i mesni proizvodi (Σ PBDE od **0.024** do **13.3 ng g⁻¹** mokre mase) > ribe i morski plodovi (Σ PBDE od 0.042 do 7.6 ng g⁻¹ mokre mase) > jaja (Σ PBDE od 0.759 do 2.47 ng g⁻¹ mokre mase)
- najzastupljeniji kongeneri: **BDE-209 (85 %)**, zatim BDE-153, -47, -183, -154, -28 i -99

Riba → Atlanski ocean (Južna Amerika, zapad)

- najzastupljeniji kongeneri: BDE-47, -99, -100, -153 i -154
- BDE-209 → detektiran u nižim masenim udjelima

Riba → Aljaska

- najzastupljeniji kongeneri: BDE-47, -99 i -100
- udio spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma samo 3 % → niski maseni udjeli kongenera BDE-209

Ribe → sjeverni i sjeverozapadni Atlanski ocean, zapadni Indijski ocean, Sredozemno more)

- Sredozemno more: najveći maseni udjeli spojeva PBDE



- poluotvoreni oblik
- ograničeno strujanje vode
- velika naseljenost, industrija i turizam

**Maseni udjeli spojeva PBDE
supstituiranih s većim brojem Br
atoma u hrani:**

Kina > Sjeverna Amerika > Europa

- formulacija „deka“ najkasnije zabranjena
- mnogobrojna (i)legalna odlagališta elektroničke opreme

Ljudsko mlijeko

- maseni udjeli spojeva PBDE ovise o izvorima izloženosti, regiji, prehrambenim navikama
- najzastupljeniji kongeneri: BDE-47, -99, -153 i -209

Medijani $\sum w(\text{PBDE})$:

Sjeverna Amerika (19,9 do 54,5 ng g⁻¹ mase masti) >

Azija (1,5 do 11,5 ng g⁻¹ mase masti) >

Europa (0,4 do 6,3 ng g⁻¹ mase masti)

- kongener BDE-209 se zadržava u ljudskom organizmu samo do 15 dana



nedavna i kontinuirana izloženost formulaciji „deka“

Zaključak

- spojevi PBDE supstituirani s većim brojem Br atoma najproblematičniji za analizu: velika molekulska masa i osjetljivost na termičku i fotolitičku razgradnju
- maseni udjeli kongenera BDE-209 veći u uzorcima hrane od okta- i nona-BDE → mogućnost pogrešnih rezultata ukoliko dođe do raspada BDE-209!
- tehnika HRMS → najselektivnija, smatra se referentnom metodom
- tehnika GC-MS/MS uz tehniku ionizacije APCI → jedna od najosjetljivijih, njena primjena raste
- LOQ od 0,01 ng g⁻¹ mokre mase uzorka, ili niža, definirana preporukom 2014/118/EU Europske komisije za određivanje 10 kongenera (BDE-28, -47, -49, -99, -100, -138, -153, -154, -183 i -209) u hrani → često ispod laboratorijskih mogućnosti, osobito za BDE-209
- spojevi PBDE supstituirani s većim brojem Br atoma - u tragovima u hrani → zahtjevan i opsežan analitički zadatak



- optimirati uvjete pripreve i obrade uzorka
- poboljšati tehnike instrumentne analize za što točniju i pouzdaniju analizu
- ekonomska isplativost

Literatura

- W. J. Pietroń, P. Małagocki, *Talanta* **167** (2017) 411–427.
- E. Van den Steen, A. Covaci, V. L. B. Jaspers, T. Dauwe, S. Voorspoels, M. Eens, R. Pinxten, *Environ Pollut* **148** (2007) 648–653.
- *Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food*, EFSA, Parma, Italy, 2011
- D. Klinčić, M. Dvorščak, K. Jagić, G. Mendaš, S. Herceg Romanić, *Environ Sci Pollut Res* **27**(6) (2020) 5744–5758.
- A. Kierkegaard, U. Sellström, M. S. McLachlan, *J Chromatogr A*, **1216** (2009) 364–375.
- Y. Jiang, L. Yuan, Q. Li, S. Ma, Y. Yub, *Sci Total Environ* **696** (2019) 133902.
- H. A. Currier, K. M. Fremlin, J. E. Elliott, K. G. Drouillard, T. D. Williams, *Chemosphere* **238** (2020) 124577.
- *Preporuka Europske komisije (2014/118/EU)*, Službeni list Europske Unije, 2014.
- T. Tavoloni, A. Stramenga, T. Stecconil, M. Siracusa, S. Bacchiocchi, A. Piersanti, *Anal Bioanal Chem* **412** (2020) 397–411.
- D. Zacs, I. Perkons, V. Volkovs, V. Bartkevics, *Chemosphere* **230** (2019) 396–405.
- 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.
- J. Wang, X. Zhao, Y. Wang, Z. Shi, *Sci Total Environ* **666** (2019) 812–820.
- 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. Angeles Martínez, *Sci Total Environ* **682** (2019) 719–728.
- G. Zheng, P. Miller, F. A. von Hippel, C. L. Buck, D. O. Carpenter, A. Salamova, *Environ Pollut* **259** (2020) 113872.
- H. Matovu, M. Sillanpää, P. Ssebugere, *Sci Total Environ* **692** (2019) 1106–1115.