

METHOD FOR DETERMINATION OF PHTHALATE ACID ESTERS IN FEED MIXTURES

METODA PRO STANOVENÍ OBSAHU ESTERŮ KYSELINY FTALOVÉ V KRMNÝCH SMĚSÍCH

Malyszová J., Jarošová A.

Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita
v Brně, Zemědělská 1, 61300 Brno, Česká Republika

E-mail: janamal@seznam.cz

ABSTRACT

Two most toxic phthalates, di-n-buthyl phthalate and di-2-ethylhexyl phthalate, which are most used and widespread, are determined by high performance liquid chromatography (HPLC)/mass spectrometry (MS). Phthalate acid esters (PAEs) are extracted by organic solvent mixture, from coextracts are separated by size exclusion chromatography (SEC) on column Bio-Beads S-X3 (dichlormethan:cyklohexan, 50:50), eluate is cleaned by concentrated sulphuric acid. PAEs are separated by HPLC on column Cogent C18 (4,6 x 150 mm, particle size 5 µm) using isocratic mobile phase containing 90% acetonitrile and 10% water. After all PAEs are analysed by mass spectrometer.

Keywords: phthalate acid esters, feed mixtures, determination method

ABSTRAKT

Dva nejtoxičtější ftaláty, di-n-butyl ftalát a di-2-ethylhexyl ftalát, které patří mezi nejvíce používané a rozšířené, se stanoví pomocí vysoko-účinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS). Estery kyseliny ftalové (PAE) se extrahují ze vzorku směsí organických rozpouštědel, od koextraktů se separují gelovou permeační chromatografií (GPC) na koloně Bio-beads S-X3 (dichlormethan:cyklohexan, 50:50), eluát se dočistí koncentrovanou kyselinou sírovou. PAE jsou separovány HPLC na koloně Cogent C18 (4,6 x 150 mm, velikost částic 5 µm) při použití mobilní fáze obsahující 90 % acetonitrilu a 10% vody. Poté jsou PAE detekovány hmotnostním spektrometrem.

Klíčová slova: estery kyseliny ftalové, krmiva, metoda stanovení

ÚVOD

Základem chemické struktury esterů kyseliny ftalové (PAE) je kyselina ftalová $C_6H_4(COOH)_2$, na jejíž karboxylové skupiny jsou esterovou vazbou vázány alkoholy.

V chemickém průmyslu se nejčastěji používají tyto PAE : dimethyl ftalát, diethyl ftalát, di-n-butyl ftalát (DBP), di-n-octyl ftalát, di-2-ethylhexyl ftalát (DEHP), butylbenzyl ftalát.

PAE jsou hojně používány jako plastifikátory PVC a dalších hmot, přídavky do barev, inkoustů, laků, nátěrových hmot, lepidel, kosmetických přípravků, filmů, repelentů, pesticidů apod. Mezi nejvíce používané a nejtoxičtější ftaláty patří DEHP a DBP.

PAE nejsou v plastech chemicky vázány. Vypařují se do atmosféry, přecházejí do půdy a vody. Uvolňují se z podlahových krytin, nátěrových hmot, migrují z plastových odpadů do půdy a následně do vody. Rezidua PAE byla prokázána ve všech složkách životního prostředí, v živých organismech, krmivech, surovinách a potravinách. Vyluhovatelnost PAE se zvyšuje za přítomnosti proteinů, tuků a některých chemikálií (např. léků-cyklosporin A) (PEARSON a TRISSEL, 1993) a souvisí také s chemickou strukturou, přičemž zkracováním postranních řetězců se zvyšuje vyluhovatelnost PAE do vodního prostředí (GROUP, 1986).

Akutní toxicita PAE je nízká. Délka a větvení postranního řetězce při dlouhodobé expozici zvyšují intenzitu nežádoucích vedlejších účinků PAE na lidský organismus. PAE jsou lipofilního charakteru a při dlouhodobé expozici se kumulují v tucích. V pokusech in vitro nebo in vivo byly reprodukovatelně prokázány teratogenní, embryotoxické, spermiotoxické, hepatotoxické, nefrotoxické a karcinogenní účinky. Dále je prokazatelný vliv PAE na membránové funkce a pozorovány jsou i jiné nežádoucí účinky.

DBP je teratogenní, embryotoxický aerosol, dráždící sliznici. Toxická dávka pro člověka je $0,14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (MARHOLD, 1986).

DEHP má při vyšších dávkách hepatotoxický účinek a poškozuje varlata. Je teratogenní a karcinogenní. Pro krysou je akutní toxicita LD_{50} per os $10 - 100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Má vliv na játra, metabolismus a imunitní systém (MARHOLD, 1986).

Evropská komise pro potraviny určila $0,025 \text{ mg DEHP}$ a $0,050 \text{ mg DBP}$ na kg živé hmotnosti a den u člověka jako tolerovatelnou denní dávku (TDI) (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES DG III/C/1,1991).

V České republice dosud nebyly vypracované hygienické limity pro obsah ftalátů v krmivech pro hospodářská zvířata. Příпустné množství sumy DEHP a DBP v potravinách bylo do 6. května 2004 určeno vyhláškou Ministerstva zdravotnictví č. 53/2002 Sb. na 2 nebo $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tuku na hmotnost jedlého podílu (v závislosti na druhu potraviny), u lihovin na $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, vyjádřeno jako suma DEHP a DBP. Nová vyhláška Ministerstva zdravotnictví 305/2004 Sb. nejvyšší přípustná množství ftalátů neuvádí.

METODIKA

Před každou analýzou se kontroluje použité sklo a chemikálie na přítomnost PAE pro vyloučení sekundární kontaminace. Všechny laboratorní pomůcky a potřeby se opláchnou a promyjí hexanem a acetonem.

Homogenizovaný vzorek se třikrát extrahuje na třepačce směsí organických rozpouštědel hexan : aceton (1:1). Spojené hexanové extrakty se zahustí na RVO při teplotě vodní lázně do 40°C a odpaření do sucha se provádí pod mírným proudem dusíku, aby nedocházelo ke ztrátám PAE.

Separace od koextraktů se dále provádí metodou gelové permeační chromatografie (GPC) na koloně Bio-beads S-X3. Na kolonu se dává smyčkou objem 1 ml, což reprezentuje 0,25 g extrahovaného tuku nebo alikvotní množství extraktu vzorku rozpuštěného v mobilní fázi dichlormethan : cyklohexan (1:1) při průtoku 1 ml/min. Množství tuku dávkované na kolonu se řídí parametry kolony, je přímo úměrné hmotnosti náplně gelu. Proto je nutné pro každou kolonu otestovat navážku tuku, průtok mobilní fáze pro účinné dělení PAE od tuků a eluční čas PAE frakce. Mobilní fáze musí být shodná s organickou fází, ve které byl gel Bio-beads S-X3 bobtnán a plněn do kolony. Účinnost separace PAE od tuků vyžaduje přesné nastavení všech parametrů, jinak dochází k přechodu tuků do frakce PAE.

Frakce PAE se zahustí na RVO při 40°C a proudem dusíku odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v acetonitrilu pro HPLC stanovení.

Při nedokonalém oddělení PAE od tuku u živočišných matric a při analýze rostlinných materiálů a krmných směsí se provádí dočištění koncentrovanou kyselinou sírovou.

Z frakce obsahující PAE se odpaří mobilní fáze, odparek se převede hexanem do zkumavky s uzávěrem a objem hexanu se adjustuje na 1 ml, přidá se 1 ml konc. H_2SO_4 a obsah se intenzivně třepé 10 minut. Fáze se oddělí odstředěním (10 min, 3000 rpm, 4°C, Hettich, Universal 32R, s rotorem č. 1624, radius 134 mm, Německo) a hexanová fáze se odstraní. Ke konc. H_2SO_4 se přidají 2 ml vychlazené hydratované 65% H_2SO_4 . PAE se extrahují 1 ml hexanu za intenzivního třepání 10 min. Fáze se oddělí odstředěním a hexanová fáze se převede do zkumavky. Extrakce PAE se opakuje ještě dvakrát vždy 1 ml hexanu. Spojené extrakty se odpaří pod dusíkem a rozpustí v acetonitrilu pro HPLC/MS stanovení.

Při analýze vzorku s nízkým obsahem tuku může být vynechána separace GPC a extrakt se čistí od koextraktů koncentrovanou H_2SO_4 .

Eluát je separován na kapalinovém chromatografu HP 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) na koloně Cogent C18 (4,6 x 150 mm, velikost částic 5 μm) při použití

mobilní fáze obsahující 90 % acetonitrilu a 10% vody, objemová průtoková rychlost je 0,8 ml·min⁻¹. PAE jsou následně analyzovány hmotnostním spektrometrem LC/MSD VL (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) s použitím elektrosprejové ionizace (ESI).

ZÁVĚR

Metoda je vhodná pro kvantitativní stanovení di-2-ethylhexyl ftalátu a di-n-butyl ftalátu v krmných směsích a krmných doplňcích. V současné době je prováděna optimalizace metody na sestavě HPLC/MS.

LITERATURA

GROUP, E.F. Environmental fate and aquatic toxicology studies on phthalate esters. *Environ. Health Perspect.*, 65, 1986, s. 337-340

MARHOLD, J. Přehled průmyslové toxikologie, organické látky. *Svazek 1*, 1986, s.385-390

PEARSON, S.D., TRISSEL, L.A. Leaching of diethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride containers by selected drugs and formulation components. *Am. J. Hosp. Pharm.*, 58, 1993, s. 1405-1409