

THE OCCURENCE OF PHTHALIC ACID ESTERS IN FEEDSTUFFS

VÝSKYT ESTERŮ KYSELINY FTALOVÉ V KRMIVECH

Krátká L., Jarošová A.

Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: xkratka2@node.mendelu.cz, ualja@mendelu.cz

ABSTRACT

Phthalic acid esters (PAEs) rang among the ubiquitous organic environmental contaminants. PAEs leak in the environment during manufacturing process, use and disposal of products. Phthalates are contained in consumer products like plastics, rubber gloves, cosmetics, pharmaceuticals, children's toys, food packaging. The most common and toxic phthalates are di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP). Acute toxicity is low. PAEs are markedly lipophilic, therefore their water-solubility is low. This is due to their chemical structure. The aim of this study was to investigate the occurrence and contents of PAEs in feedstuffs stored in different packages, which can get in contact with meat and food. Samples of feedstuffs, premixes and feed additives for livestock were collected by ÚKZUZ from the store of received feeds, dispatch stores, reception stores and from multicomponent scales. Before starting the analyses, glass and laboratory materials are washed and rinsed with acetone. Feeds were homogenized properly, extracted by shaking with mixture of organic solvents (hexane:acetone 1:1). Co-extracts were removed by gel permeation chromatography (GPC) in a Bio-beads S-X3 filling. After GPC, the eluate was cleaned with hydrated sulphuric acid. PAEs were determined by HPLC and UV detection at 224 nm in a column filled with Separon SX C 18, using acetonitrile:water (9:1) as the mobile phase. The detection limit for PAEs in feeds is 0,03 mg.kg⁻¹. There were 59 samples analysed. DBP and DEHP were demonstrated in amount lower than detection limit (< 0,03 mg.kg⁻¹) to 26,63 mg.kg⁻¹ and 18,89 mg.kg⁻¹. Feed additives were low in phthalates as well as raw materials except colza-oil. DBP in feed additives ranged from levels below the detection limit to 0,62 mg.kg⁻¹, DEHP ranged from levels below the detection limit to 2,98 mg.kg⁻¹, except Alimet, where the levels measured were 1,29 mg.kg⁻¹ DBP and 3,23 mg.kg⁻¹ DEHP. High levels in colza-oils (raw material) were due to high levels of lipids and the lipophilic character of phthalates. DBP levels were between 0,1 mg.kg⁻¹ and 26,63 mg.kg⁻¹, DEHP levels were between 1,24 mg.kg⁻¹ and 18,89 mg.kg⁻¹. In feedstuffs, different levels of phthalates were found. They are transferred to animals and then to people. The highest levels were found in feeds with high fat contents.

Key words: phthalic acid esters, contaminant, feed

ÚVOD

Estery kyseliny ftalové (PAE) patří do skupiny prakticky všudypřítomných organických kontaminantů životního prostředí. Příčinou jejich hojného rozšíření do všech složek životního prostředí jsou jejich vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti. Díky nim se uplatňují jako změkčovadla plastických hmot, která ale nejsou v polymeru chemicky vázána, takže může docházet k jejich uvolňování do okolního prostředí a materiálu. Z těchto měkčených plastických hmot se vyrábí řada běžných potřeb pro domácnost jako gumové rukavice, dětské hračky, oblečení, kosmetika, léky, potravinářské obaly, fólie a uzávěry, ale také např. injekční stříkačky, části dialyzačních jednotek (Velíšek, 2002).

Výskyt di-(2-ethylhexyl) ftalátu (DEHP) zaujímá přes 50 % z celkového množství všech esterů kyseliny ftalové. Dalšími běžně se vyskytujícími ftaláty jsou butyl-benzyl ftalát (BBP) a di-*n*-butyl ftalát (DBP) (Lopez-Jimenez *et al.*, 2005). Jsou to organické sloučeniny, které vznikají syntézou kyseliny ftalové s alifatickými alkoholy. Estery kyseliny ftalové jsou biologicky aktivní sloučeniny, které se štěpí hydrolýzou na různé stupně podle konfigurace a délky esterických řetězců (Howart *et al.*, 1984).

Akutní toxicita ftalátů je nízká (Shibko a Blumenthal, 1973). Projevuje se jako podráždění GIT, nevolnost, ospalost, snížení krevního tlaku, závratě, halucinace (Velíšek, 2002). Při dlouhodobém působení podněcuje délka řetězce a jeho postranní větve vzrůst nežádoucích vedlejších účinků esterů kyseliny ftalové na lidský organismus. Byly zjištěny následující nežádoucí účinky po dlouhotrvající expozici ftalátům: teratogenita a embryotoxicita, spermiotoxicita, hepatotoxicita, nefrotoxicita a karcinogenita (Wormuth *et al.*, 2006). Dimethyl ftalát společně s benzylbutyl ftalátem jsou estery s nejvyššími estrogenními účinky (Holadová *et al.*, 2007).

DBP je teratogenní, embryotoxický aerosol, dráždící sliznici. Toxická dávka pro člověka je $0,14 \text{ g.kg}^{-1}$ (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 g.kg^{-1} . Má vliv na játra, metabolismus a imunitní systém (Marhold, 1986).

Diestery kyseliny ftalové jsou v organismu metabolizovány stejně bez ohledu na živočišný druh. Během metabolismu DEHP se uvolňuje MEHP a 2-ethyl-hexanol, který je karcinogenní. Monoestery jsou po reabsorbci z GIT rozváděny do jater, ledvin a močového měchýře, poté jsou přeměněny izoenzymem cytochromem P450 na různé oxidované metabolity. Množství těchto metabolitů a druh exkrece se u různých zvířat liší (Keller *et al.*, 1991).

Cílem toho výzkumu bylo studovat vznik a obsah esterů kyseliny ftalové v krmivech skladovaných v různých obalech, z nichž se mohou dostat do masa a do potravin.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky krmiv, premixů a doplňkových látek pro hospodářská zvířata byly odebrány kvalifikovaným pracovníkem ÚKZUZU, oddělení krmiv, Národní referenční laboratoří, Regionální oddělení Opava. Vzorky byly odebírány do mikrotenových sáčků a zábrusových lahví. Byly odebírány od výrobců krmiv, nebo u evidovaných výrobních provozů ze skladu přijatých krmiv, expedičních skladů, příjmových skladů a vícekomponentních vah. Vzorky byly získány v roce 2005 a 2006. Skladovány byly v různých obalech – papír, plastová fólie, hliníková fólie, PVC, sklo. Krmiva s vyšším obsahem tuků byla skladována v ledničce.

Vzorky krmiva byly homogenizovány, třikrát extrahovány směsí organických rozpouštědel (hexan:aceton 1:1) a spojené extrakty zahuštěny na rotační vakuové odparce při 40°C. Takto byly uchovány v mrazničce. Koextrakty byly separovány gelovou permeační chromatografií na gelu Bio-beads S-X3. Na kolonu se smyčkou nadávkoval vzorek o objemu 1 ml, což představuje 0,25 g extrahovaného tuku, rozpuštěného v mobilní fázi dichlormethan:cyklohexan (1:1). Při průtoku 1 ml.min⁻¹ se PAE eluovaly v době od 10 do 18 minut. Ze vzorku se odpařila mobilní fáze, odparek se převedl do zkumavky hexanem a provedlo se dočištění, k němuž se použila koncentrovaná kyselina sírová. Extrakty se odpařily dusíkem a rozpustily v acetonitrilu pro HPLC stanovení na koloně Separon SGX C 18 s UV detekcí při 224 nm. Mobilní fáze byl acetonitril: voda (9:1), průtok 0,5 ml.min⁻¹. Detekční limit pro PAE v krmivech je 0,03 mg.kg⁻¹.

Pro výpočet výsledků byly měřeny plochy píků a koncentrace PAE byla odečtena z kalibrační přímky. Kalibrační přímka byla kontrolována s každou sérií analyzovaných vzorků nástřikem standardních roztoků sledovaných analytů. Koncentrace PAE je vyjádřena na původní vzorek v mg.kg⁻¹. K vyhodnocení výsledků byl použit program Agilent Chemstation for LC and LC/MS systems. K analýze se použily standardy o čistotě nad 99,9 %: di-2-ethylhexyl ftalát (DEHP), dibutyl ftalát (DBP) od SUPELCO, Inc. (U.S.A.). Před analýzou je nutné sklo a laboratorní materiál umýt a vypláchnout acetonem. Pro kontrolu čistoty skla a ke stanovení chromatografického pozadí se s každou sérií vzorků provedl slepý vzorek. Všechny vzorky se dělaly paralelně.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Bylo analyzováno 59 vzorků krmiv pro hospodářská zvířata (doplňkových látek, premixů, doplňkových krmiv a krmných surovin). DEHP a DBP byly stanoveny ve všech vzorcích. Jejich koncentrace je vyjádřena v mg.kg⁻¹. Výsledky analýzy jsou uvedeny v Tab. 1, Tab. 2, Tab. 3. Hodnoty DBP a DEHP se pohybovaly od hodnot nižších než je detekční limit (< 0,03 mg.kg⁻¹) po 26,63 mg.kg⁻¹ a 18,89 mg.kg⁻¹. Doplňkové látky stejně jako krmné suroviny obsahují nízké hodnoty ftalátů, s výjimkou řepkového oleje. DBP v doplňkových látkách se pohyboval od hodnot nižších než detekční limit po 0,62 mg.kg⁻¹, DEHP od hodnot nižších než detekční limit po 2,98 mg.kg⁻¹, kromě Alimetu, kde byly naměřeny hodnoty 1,29 mg.kg⁻¹ DBP a 3,23 mg.kg⁻¹ DEHP. U krmných surovin se DBP pohyboval v množství od 0,1 mg.kg⁻¹ do 26,63 mg.kg⁻¹, DEHP od 1,24 mg.kg⁻¹ do 18,89 mg.kg⁻¹. Vysoké hodnoty u řepkového oleje byly způsobeny vysokým obsahem tuku a lipofilním charakterem ftalátů (DPB 26,63 mg.kg⁻¹, DEHP 18,89 mg.kg⁻¹).

Tab. 1 Obsahy ftalátů v doplňkových látkách

vzorek č.	název krmiva	mg.kg ⁻¹	
		DPB	DEHP
1	vitamín D3	0,08	0,28
2	Vitamín A - La Roche	<0,03	0,12
3	Vitamín A - Adisseo Francie	<0,03	0,06
4	vitamín E	0,13	0,44
5	L-lysin	<0,03	1,86
6	vitamín K3	<0,03	0,19
7	síran měďnatý pentahydrát	<0,03	1,12
8	seleničitan amonný	<0,03	1,94
9	jodid draselný	<0,03	1,17
10	oxid manganatý	0,15	1,23
11	biotin	0,21	1,68
12	síran železnatý mon.-Monosal	0,12	1,77
13	kys. Listová	0,37	2,78
14	vit.D3	0,04	0,14
15	kys. Nikotinová - niacin amid	0,04	2,98
16	vitamín A	0,05	0,6
17	vitamín E - Adisseo	0,37	<0,03
18	L-lysin	0,05	1,71
19	vitamín K3	0,14	0,29
20	síran měďnatý pentahydrát	0,55	1,26
21	seleničitan sodný	0,05	0,61
22	jodid draselný	0,18	1,27
23	oxid manganatý	0,07	0,45
24	Biotin	<0,03	0,53
25	vitamín E - Basf	0,62	1,53
26	bentonit	<0,03	0,88
27	Alimet	1,29	3,23
28	Wafolin (DL - pojivo)	0,04	0,66

Tab. 2 Obsahy ftalátů v premixech

vzorek č.	název krmiva	mg.kg ⁻¹	
		DPB	DEHP
29	Mycocarb	0,05	0,04
30	premix-Pracid	0,33	0,39

Tab. 3 Obsah ftalátů v doplňkovém krmivu

vzorek č.	název krmiva	mg.kg ⁻¹	
		DPB	DEHP
31	DKS - Lipofish	0,15	1,52

Tab. 3 Obsahy ftalátů v krmných surovinách

vzorek č.	název krmiva	mg.kg ⁻¹	
		DPB	DEHP
32	sojové boby	0,06	0,09
33	extrudovaná sója	<0,03	0,58
34	pšenice zrno - před zpracováním	<0,03	0,12
35	pšeničné otruby	<0,03	0,25
36	pšeničná krmná mouka	0,8	<0,03
37	pohanka	0,07	0,18
38	chlorid sodný - před zpracováním	<0,03	1,14
39	chlorid sodný - výrobek	<0,03	1,14
40	uličitan Ca - výrobek	<0,03	1,15
41	uhličitan Ca - vstup	<0,03	1,42
42	pšenice - vstup	<0,03	0,04
43	pšeničná krmná mouka	0,43	0,42
44	pšeničné klíčky	0,06	0,07
45	řepkový extrahovaný šrot	<0,03	0,05
46	řepkový olej - vstup	2,43	18,55
47	řepkový olej - výstup	4,68	17,19
48	řepkové expelery	0,16	0,36
49	řepkový olej - vstup	1,04	17,19
50	řepkový olej - výstup	4,98	18,89
51	řepkový olej - výstup plech	1,35	0,03
52	řepkový olej - výstup plast	26,63	5,77
53	sojový olej	0,09	0,04
54	živočišný tuk	<0,03	13,06
55	olej řepkový - plast	<0,03	2,86
56	olej řepkový - plech	6,83	1,24
57	řepkový olej	0,1	3,32
58	rybí olej	0,1	0,04
59	KS-soyomilk	<0,03	0,46

ZÁVĚR

Vzorky doplňkových látek, premixů, doplňkových krmiv a krmných surovin byly odebrány u průmyslových výrobců v ČR. Byly odebírány v průběhu 2 let (2005 a 2006).

Pro analýzu PAE – di-2-ethylhexal ftalátu (DEHP) a di-n-butyl ftalátu (DBP) ve vzorcích krmiv byly využity ověřené metody pro stanovení PAE v potravinách (Jarošová *et al.*, 1998).

U krmiv byly zjištěny různé hodnoty ftalátů, které z nich přechází do zvířat a poté do lidí. Hodnoty se pohybovaly od hodnot nižších než detekční limit (0,03 mg.kg⁻¹), většinou u doplňkových látek, do 26,63 mg.kg⁻¹ u řepkového oleje. Nejvyšší hladiny byly naměřeny u krmiv s vysokým obsahem tuku. Při porovnání výsledků s výsledky Jarošové *et al.* (1998) jsou hodnoty poměrně vysoké (DBP 0,06 - 2,36 mg.kg⁻¹, DEHP 0,07 – 1,77 mg.kg⁻¹). Podle Raszyka *et al.* (1998) hodnoty v doplňkových látkách dosahovaly u DBP 0,207 mg.kg⁻¹, u DEHP 0,216 mg.kg⁻¹, což jsou hodnoty přibližně shodné s našimi výsledky.

V České republice dosud nebyly zpracovány limity ftalátů pro krmiva hospodářských zvířat. Do 6. května 2004 bylo přípustné množství sumy DEHP a DBP omezeno Vyhláškou

Ministerstva zdravotnictví č. 53/2002 Sb. na 2 příp. 4 mg.kg⁻¹ na hmotnost jedlého podílu v závislosti na druhu potraviny. Následující Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 305/2004 Sb. žádné limity neuvádí.

Tato práce vznikla za podpory grantu NAZV č. QG60066/2005.

LITERATURA

Holadová, K., Prokůpková, G., Hajšlová, J., Poustka, J. (2007): Headspace solid-phase microextraction of phthalic acid esters from vegetable oil employing solvent based matrix modification, *Analytica chimica acta*, 582 (1): 24-33.

Jarošová, A., Gajdůšková, V., Raszyk, J., Ševela, K. (1998): Determination of phthalic acid esters (PAEs) in biological materials by HPLC. *Czech J.Food Sci.*, 16, 122-130. Keller, B.J., Liang, D., Thurman R.G.(1991): 2-ethylhexanol uncouples oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Toxicol. Lett.*, 57, 113-120.

Lopez-Jimenez, F.J., Rubio, S., Perez-Bendito, D. (2005): Determination of phthalate esters in sewage by hemimicelles-based solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry, *Analytica chimica acta*, 551 (1-2), 142-149.

Marhold, J. (1986): Přehled průmyslové toxikologie, organické látky. Svazek 1.385-390.

Raszyk, J., Gajdůšková, V., Jarošová, A., Salava, J., Palac, J. (1998): Occurrence of phthalic acid esters in combined feedstuffs and adipose tissues of swine and cattle. *Veterinární medicína*. 43:3, 8 ref., 93-95.

Shibko, S.I., Blumenthal, H. (1973): Toxicology of phthalic acid esters used in food packaging material. *Environmental Health Perspectives*, 131 – 137.

Velíšek, J. (2002): *Chemie potravin 3*. Tábor: Osis. 368.

Wormuth, M., Scheringer, M., Vollenweider, M., Hungerbühler, K. (2006): What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk analysis*, 803-824.

Raszyk, J., Gajdůšková, V., Jarošová, A., Salava, J., Palac, J. (1998): Occurrence of phthalic acid esters in combined feedstuffs and adipose tissues of swine and cattle. *Veterinární medicína*. 43:3, 8 ref., 93-95.