

THE IMPACT OF WINTER STORAGE OF LIVING CARPS ON RESENCE OF PHTALATE ESTERS IN MUSCLE

VLIV SÁDKOVÁNÍ KAPRA OBECNÉHO NA VÝSKYT ESTERŮ KYSELINY FTALOVÉ VE SVALOVINĚ

Zorníková, G., Jarošová, A., Stancová, V.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

E-mail: G.Zornikova@email.cz, ualja@mendelu.cz

ABSTRACT

Our aim was to determine the content of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in carps. We selected carps from area in South Moravia. First group of carp was fished in autumn and second group was located to the plastic tubs until the winter. Samples of fishes were lyophilized and extracted with solvent mixture (acetone:hexan =1:1). We used gel permeation chromatography with column Bio-Beads S-X3 to clean the samples. The levels of DBP and DEHP were determined by high performance liquid chromatography with column Separon SGX C 18 with UV detection. The results show that occurrence of DBP and DEHP was evident in all samples. The concentration of DBP and DEHP in carps was in range from 0,29 mg.kg⁻¹ of original weight to 1,93 mg.kg⁻¹ of original weight in the autumn group. After the winter storage was detected the level of DBP and DEHP in range from 0,86 mg.kg⁻¹ of original weight to 2,10 mg.kg⁻¹ of original weight. It is obvious that DEHP is more strongly absorbed by sediment than DBP, and its concentration in aquatic environment is lower than DBP. Thus the bioavailability of DEHP is lower than DBP. The difference in intake of DBP and DEHP might be associated with their different physiological and chemical properties.

Key words: phthalates, contamination, fish, DBP, DEHP

Acknowledgments: This study was supported by the Ministry of the Agriculture of the Czech Republic of the National Agency for agricultural research (NAZV), project No. QG60066/2005.

ÚVOD

Estery kyseliny ftalové (PAE) jsou v průmyslu široce využívané chemikálie, které se díky svým chemickým a fyzikálním vlastnostem používají jako plastifikátory, které udělují daným materiálům flexibilitu. Jelikož nejsou v plastických materiálech pevně chemicky vázány dochází k jejich uvolňování do ovzduší nebo vyluhování do vodního prostředí, čímž se stávají ubikvitárními kontaminanty (FROMME *et al.*, 2002). V současné době se v západní Evropě ročně vyrobí asi 1 milion tun ftalátů, přičemž z toho 900 tisíc tun se použije při výrobě PVC (<http://www.plasticisers.org>).

Jejich silně lipofilní charakter naznačuje jejich přednostní kumulaci v matricích obsahujících tuky. Mezi velmi sledované druhy patří di-n-butyl ftalát (DBP) a di-2-ethylhexyl ftalát (DEHP), které se často vyskytují v potravním řetězci. Do potravin se mohou dostat především z původních surovin, plastových obalů a z prostředí.

Do organismu se ftaláty dostávají kromě per os prostřednictvím kůže i plic. V lidském organismu je DEHP dále metabolizován na dva produkty, mono-2-ethylhexyl ftalát a 2-ethylhexanol, které jsou karcinogenní. Po orálním příjmu dochází k enzymatické hydrolyze ještě v ústní dutině a posléze v gastrointestinálním traktu (NIINO *et al.*, 2003, NIINO *et al.*, 2001). Studie na zvířatech dokazují schopnost DEHP vyvolávat vývojové vady varlat a penisu, změny v produkci spermií, poškození metabolismu a imunitního systému. U DBP byl potvrzen teratogenní a embryotoxický účinek.

MATERIÁL A METODY

Pro pokus byl vybrán rybník z oblasti Jižní Moravy, kde bylo při podzimním výlovu náhodně vybráno 10 jedinců kapra obecného. Kapři byli po porážce vykucháni a uskladněny při -20°C . Současně bylo vyloveno i 10 jedinců, kteří byli krátkodobě umístěni na sádky. Po 7 týdnech sádkování byli kapři po porážce vykucháni a připraveni pro experiment. Pro pokus byla použita svalovina s kůží z pravé půlky ocasní části.

Pro analýzu byly zvoleny ověřené metody pro stanovení DBP a DEHP v potravinách (JAROŠOVÁ, 2004). Homogenizované vzorky rybí svaloviny i s kůží byly lyofilizovány a extrahovány směsí rozpouštědel aceton : hexan (1:1). Pro oddělení koextraktů byla použita gelová permeační chromatografie (GPC) s kolonou Bio Beads S-X3. Získaná frakce byla podrobena přečištění koncentrovanou kyselinou sírovou a po vysušení dusíkem byl vzorek rozpuštěn v acetonitrilu. Stanovení koncentrace PAE bylo provedeno HPLC analýzou s kolonou Separon SGX C 18 a s UV detekcí při 224 nm. Získané výsledky byly vyhodnoceny na základě kalibračních křivek standardů v softwaru Agilent Chemstation for LC and LC/MS systems. Konečné hodnoty byly vztahy na původní hmotnost vzorku.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Při analýze rybí svaloviny s kůží u kapra obecného byl zjištěn výskyt ftalátů jak di-n-butyl-ftalát (DBP), tak di-2-ethylhexyl-ftalát (DEHP). Tab. 1 uvádí celkové výsledky analýzy provedené na skupině ryb získaných při podzimním výlovu a na rybách uchovávaných na

sádkách. Pouze u vzorku č. 1 a 2 byla naměřená hodnota DEHP pod detekčním limitem, který byl stanoven $0,03 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

V případě DBP byla u ryb z podzimního výlovu, tedy bez sádkování naměřena průměrná koncentrace $0,56 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a u DEHP $0,26 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hmotnosti. U jedinců, kteří byly krátkodobě umístěny na sádkách byla naměřená průměrná hodnota u DBP $0,83 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a u DEHP $0,72 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hmotnosti vzorku.

Tab. 1 Koncentrace DBP, DEHP a sumy DBP + DEHP v jednotlivých měřených vzorcích svaloviny s kůží kapra obecného v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hmotnosti

		Podzimní výlov			Zimní výlov (sádky)		
Vzorek	DBP	DEHP	Σ DBP+DEHP	Vzorek	DBP	DEHP	Σ DBP+DEHP
	[$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hm.]				[$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hm.]		
1	0,58	0	0,58	61	0,95	0,83	1,78
2	0,40	0	0,40	62	0,70	0,70	1,40
3	0,59	0,13	0,71	63	0,86	0,59	1,45
4	0,36	0,04	0,40	64	0,82	0,62	1,44
5	0,20	0,10	0,29	65	0,51	0,35	0,86
6	1,53	0,41	1,93	66	0,66	0,77	1,42
7	0,28	0,51	0,79	67	1,10	0,96	2,06
8	0,31	0,25	0,57	68	1,00	0,83	1,83
9	0,35	0,52	0,86	69	1,29	0,81	2,10
10	0,98	0,62	1,60	70	0,37	0,77	1,14

Celková koncentrace DBP a DEHP byla v průměru $0,82 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hmotnosti u podzimního výlovu a $1,55 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hmotnosti při zimním výlovu, tedy po sádkování.

Z výsledků vzorků č. 1-10 můžeme usuzovat, že zjištěné množství DBP a DEHP se do rybích tkání dostalo z přirozeného prostředí, tedy z vody a sedimentů. YUAN *et al.*, zkoumali zastoupení 8 druhů ftalátů ve vodních sedimentech a prokázali největší výskyt právě DEHP a DBP. Ve většině případů jsou průmyslové kontaminanty včetně ftalátů usazené ve spodních sedimentech vodních toků. Z toho vyplývá, že významný vliv na celkové zastoupení ftalátů v rybách je ovlivněno místem, kde se ryby nejčastěji vyskytují. Distribuce mezi vodními živočichy je dána také mírou znečištění vodního prostředí, teplotou vody a rychlostí proudu (HUANG *et al.*, 2008). Dalším možným zdrojem kontaminace může být také krmivo, které může obsahovat množství ftalátů (JAROŠOVÁ *et al.*, 2008). Nižší množství DEHP ve vzorcích může být do jisté míry také ovlivněno tím, že DEHP je pevně sorbován na částice sedimentu a je tudíž velmi málo mobilní (VELÍŠEK, 2002).

Tab. 2 Koncentrace DBP, DEHP v mg.kg^{-1} původní hmotnosti ve vzorcích svaloviny kapra obecného

	Podzimní výlov			Zimní výlov (sádky)		
	DBP	DEHP	Σ DBP + DEHP	DBP	DEHP	Σ DBP + DEHP
	[mg.kg^{-1} původní hm.]			[mg.kg^{-1} původní hm.]		
n	10	10	10	10	10	10
Průměr	0,56	0,26	0,82	0,83	0,72	1,55
Medián	0,38	0,19	0,65	0,84	0,77	1,45
S.D.	0,39	0,23	0,51	0,26	0,16	0,37
Min.	0,20	0,04	0,29	0,37	0,35	0,86
Max.	1,53	0,62	1,93	1,29	0,96	2,10

Z porovnání průměrných hodnot (medián) podzimního a zimního výlovu (Tab. 2) je vidět nepatrný nárůst množství obou sledovaných PAE u ryb, které byly uchovávány na sádkách. Jak již bylo řečeno, dochází u ftalátů k dobré vyluhovatelnosti do vodního prostředí. Tato vlastnost je dána délkou postranních řetězců, přičemž platí čím kratší řetězec, tím lepší uvolňování do prostředí (GROUP, 1986). Na základě toho můžeme usuzovat na nepatrně vyšší množství DBP než DEHP, což se při analýze potvrdilo.

Přípustné množství esterů kyseliny ftalové ve sladkovodních rybách, vyjádřeno jako suma DBP a DEHP bylo podle vyhlášky Ministerstva Zdravotnictví č. 298/1997 Sb. 4,0 mg.kg^{-1} původní hmotnosti. Tyto limity byly po vstupu do Evropské unie v roce 2004 zrušeny.

ZÁVĚR

Při pokusu jsme zjistili, že došlo k nepatrnému nárůstu obsahu ftalátů u sádkovaných ryb. Rozmezí naměřených hodnot Σ DBP + DEHP u nesádkovaných ryb byla 0,29 – 1,93 mg.kg^{-1} původní hmotnosti. U kaprů, kteří byli na 7 týdnů umístěni v plastových kádích, byl průměrný obsah ftalátů 0,86 – 2,10 mg.kg^{-1} původní hmotnosti. Při analýze kaprů z podzimního výlovu, tedy u nesádkovaných ryb byl průměrný obsah DBP 0,56 mg.kg^{-1} zatímco po sádkování byla tato hodnota 0,83 mg.kg^{-1} . Obdobný nárůst byl zjištěn také v případě DEHP.

Tento projekt byl vypracován za podpory grantu NAZV číslo QG60066/2005.

LITERATURA

Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Muller, J., & Wenzel, A. (2002): Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*, 36:1429–1438.

Group, E. F. (1986) Environmental fate and aquatic toxicology studies on phthalate esters. *Environ. Health Perspect.*, 65:337-340

Huang, P. C., Tien, C. J., Sun Y. M., Hsieh, C. Y., Lee, C. C. (2008): Occurrence of phthalates in sediment and biota: Relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor. *Chemosphere*, 73:539-544

Jarošová, A. (2004): Polychlorované bifenyly a estery kyseliny ftalové v potravním řetězci. Habilitační práce, MZLU, Brno, 137 s.

Jarošová, A., Harazim, J., Krátká, L., Kolenčíková, D. (2008): Úroveň kontaminace ftaláty u vybraných krmných surovin, doplňkových látek a premixů. *Maso*

Niino, T., Ishibashi, T., Ishiwata, H., Takeda, K., Onodera, S. (2003): Characterization of human salivary esterase in enzymatic hydrolysis of phthalate esters. *Journal of health science*, 49:76-81.

Niino, T., Ishibashi, T., Itho, T., Sakai, S., Ishiwata, H., Yamada, T., *et al.* (2001): Monoester formation by hydrolysis of dialkyl phthalate migrating from polyvinyl chloride products in human saliva. *Journal of health science*, 47:318-322.

Velíšek, J. (2002): Chemie potravin 3, Tábor, OSSIS, 368 s., ISBN 80-86659-02-X

What are plasticisers?, Dostupné z <<http://ww.plasticisers.org>>

Yuan, S. Y., Liu, C., Liao, C. S., Chang, B. V. (2002): Occurrence and microbial degradation of phthalate esters in Taiwan river sediments. *Chemosphere*, 49:1295 – 1299