

MONITORING OF PHTHALATES CONTAMINATION IN BROILER CHICKS AND COMPARISON OF CUMULATION OF DEHP AND DBP IN TISSUES

MONITORING KONTAMINACE KUŘECÍHO MASA FTALÁTY A SROVNÁNÍ KUMULACE DEHP A DBP V JEDNOTLIVÝCH TKÁNÍCH

Stancová V., Jarošová A., Krátká L.

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

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

ABSTRACT

The objectives of this study were investigation of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) amount in the edible chicken tissues and compare the accumulation of these two the most spread esters of phthalic acid. The chickens ROSS 308 in our experiment were fed by common feeding mixture without addition of any phthalate esters for 42 days and then they were slaughtered. There were analyzed lyophilised skins, muscles (breasts and thighs), adipose tissues and liver samples. Our method was comprised of four separated steps. Extraction of fat from all samples with using organic solvents was the first step. Second was separation by gel-permeation chromatography followed by cleaning of eluate with concentrated sulfuric acid. The last fourth step comprised of high performance liquid chromatography with UV detection. DEHP and DBP were detected in all investigated samples. The resulting average contents of phthalates are: 0,35 mg.kg⁻¹ DEHP; 0,22 mg.kg⁻¹ DBP in muscle, 1,18 mg.kg⁻¹ DEHP; 0,36 mg.kg⁻¹ DBP in skin, 1,36 mg.kg⁻¹ DEHP; 0,47 mg.kg⁻¹ DBP in adipose tissue and 0,16 mg.kg⁻¹ DEHP; 0,02 mg.kg⁻¹ DBP in liver. Our measurements proved lipophilic character of phthalates. That means that adipose tissue is useful indicator of phthalic acid esters contamination. Relatively high contents of DEHP and DBP contamination are due to presence of PAEs in dust, soil, indoor and outdoor air, water and feed. Liver, despite containing more fat than muscles, had lower values of PAEs mainly because of their enzymatic base, which were transforming to their metabolites. The values of DEHP were higher than contents of DBP in all samples.

Key words: Phthalic acid esters, DEHP, DBP, chicken.

Acknowledgment: This work has been supported by Czech National Agency for Agriculture Research (NAZV CR), project QG60066/2005.

ÚVOD

Ftaláty jsou ubikvitární kontaminanty životního prostředí a potravního řetězce. Tyto syntetické látky mají široké uplatnění, a to zejména jako plastifikátory PVC, rozpouštědla a aditiva. Jsou součástí stavebních materiálů, zařízení domácností, automobilů, nemocničního vybavení, oblečení, kosmetiky, hygienických přípravků, výživových doplňků, zubních past, dětských hraček, obalových materiálů, insekticidů, mazacích olejů, laků, barev a mnohých dalších přípravků (Schettler et al, 2005). Nejvíce rozšířenými a toxickými jsou di-2-ethylhexyl ftalát (DEHP) a di-n-butyl ftalát (DBP). Dnes už je DEHP vzhledem k jeho toxickým účinkům nahrazován di-iso-nonyl ftalátem (DiNP). Přídavek plastifikátoru do plastických hmot zajišťuje jejich flexibilitu. Protože změkčovadlo nereaguje s polymerem, není v něm chemicky vázáno. Dochází proto k jeho uvolňování do prostředí a materiálů, se kterými je plast v kontaktu. PVC obsahuje 20 – 50% ftalátů.

Ftaláty (PAE) jsou diestery kyseliny ftalové (1,2 – benzendikarboxylová kyselina). Specifické vlastnosti a možnost rozkladu jednotlivých PAE záleží na délce postranních alifatických řetězců. Extrahují se rychle látkami, ve kterých jsou rozpustné i tuky. Jejich rozpustnost je omezená ve vodě a roztocích mýdla.

Výskyt v potravním řetězci je způsoben migrací esterů z měkčených obalových materiálů, barevných potisků, případně surovin použitých k výrobě potravin. Zdrojem kontaminace tkání zvířat může být krmivo, voda či vzduch. Člověk je tak vystaven působení ftalátů ze životního prostředí, předmětů denní potřeby, jídla i kosmetiky. Nedávné studie ukazují, že i děti je přijímají v mateřském mléce a dětském jídle (Main, 2006).

Ftaláty jsou rychle absorbovány z trávicího traktu a plic, přestup přes pokožku je obtížnější. Prvním krokem při jejich odbourávání je hydrolýza a vznik monoesterů, které mají také toxické účinky (Heidel a Powell, 1992). Méně větvené ftaláty jsou už ve formě monoesterů vylučovány močí. Dlouze větvení zástupci, mimo jiné i DEHP, mají složitější metabolismus zahrnující vznik monoesteru, hydroxylaci, oxidaci a teprve následné vyloučení močí nebo výkaly (Frederiksen et al, 2007). I když se 60-90% přijatých ftalátů z těla vyloučí během 24 hodin, přesto dochází k jejich kumulaci v organismu (Stratil a Kubáň, 2005). Chemická struktura některých PAEs zapříčiňuje jejich kumulaci v tukových tkáních (Chu et al, 1978).

Akutní toxicita ftalátů je nízká, zato chronický příjem vyvolává řadu zdravotních poruch. PAE patří mezi látky narušující endokrinní systém. DBP, DEHP a jejich metabolity ovlivňují samčí reprodukční systém. Působí snižování úrovně testosteronu, produkce spermií, vyvolávají kryptorchismus a neplodnost (Foster et al, 2006). Další negativní účinky jsou hepatotoxické, neurotoxické, embryotoxické, teratogenní a karcinogenní. Vyvolávají také astma a dermatitidy u dětí (Jaakkola a Knight, 2008).

MATERIÁL A METODIKA

Do pokusu bylo zařazeno 8 kusů jednodenních kuřat ROSS 308. Kuřata byla krmena běžnou krmnou směsí a 42. den výkrmu byla poražena. Na obsah DEHP a DBP byla analyzována svalovina (směsný vzorek svaloviny prsní a stehenní), mezenterální tuk, kůže a játra. Játra byla pro malou hmotnost analyzována jako směsný vzorek (homogenizát z 8 kusů) (viz. tab 1). Vzorky byly homogenizovány a pak následně lyofilizovány a zamraženy. Vzorky byly před další analýzou uchovávány v mrazničce při teplotě -18°C .

Každý vzorek byl analyzován paralelně a s každou sérií byl vyhotoven také slepý vzorek z důvodu kontroly čistoty laboratorního skla a ke zjištění hodnoty chromatografického pozadí. Laboratorní sklo a pomůcky byly po umytí čistícím prostředkem a destilovanou vodou 3x vymývány acetonem. Při trojitě extrakci tuku z vyšetřované tkáně byla použita směs organických rozpouštědel aceton:hexan v poměru 1:1. Rozpouštědlo bylo ze sloučených extraktů odstraněno na vakuové rotační odparce při teplotě 40°C a před další analýzou byly extrakty uchovávány v mrazničce. Po rozpuštění 0,5 gramů extraktu v 2 ml mobilní fáze (dichlormetan:cyklohexan; 1:1) byly vzorky separovány gelovou permeační chromatografií. Na kolonu Bio-Beads S-X3 byl nanášen 1 ml rozpuštěného vzorku. Doba eluce ftalátů byla zjištěna prostřednictvím standardu při konstantním průtoku $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Mobilní fáze byla z eluátu odstraněna na vakuové rotační odparce, zbytek po odpaření byl kvantitativně převeden hexanem do zkumavky, ve které byl vzorek v mrazničce uchováván. Přečištění vzorku bylo prováděno koncentrovanou kyselinou sírovou. Finální stanovení probíhalo na vysoce účinné kapalinové chromatografii s použitím kolony Separon SGX C 18 s UV detekcí při 224nm. Vzorek byl nejprve rozpuštěn v acetonitrilu. Směs acetonitril a voda (1:1) byla použita jako mobilní fáze při HPLC, průtok $0,5\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Retenční čas pro DBP byl ca. 3 min. a DEHP ca. 8 min.

Při vyhodnocování byly měřeny plochy píků chromatogramů a koncentrace jednotlivých esterů byly odečteny z kalibrační křivky. K vyhodnocení výsledků byl použit program Agilent Chemstation for LC and LC/MS systems.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Koncentrace esterů v jednotlivých vzorcích byla vyjádřena v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ původní hmoty. V tabulce 1 jsou uvedeny průměrné (z 8 kusů kuřat) hodnoty obsahu ftalátů ve svalovině ($0,35\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DEHP; $0,22\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DBP), kůži ($1,18\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DEHP; $0,36\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DBP), tuku ($1,36\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DEHP; $0,47\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DBP) a játrech ($0,16\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DEHP; $0,02\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) u skupiny zvířat krmných běžnou krmnou směsí bez přídavku ftalátů. Jarošová et al. (1999) stanovila kontaminaci estery kyseliny ftalové u broilerů ve svalovině ($0,11\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DEHP; $0,05\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DBP), kůži ($1,07\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DEHP; $0,38\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DBP), tuku ($0,24\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DEHP; $0,54\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DBP) a játrech ($0,02\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DEHP; $0,07\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Nejnižší hodnoty ftalátů byly stanoveny v játrech, důvodem je jejich hydrolytická aktivita a obsah vysoký

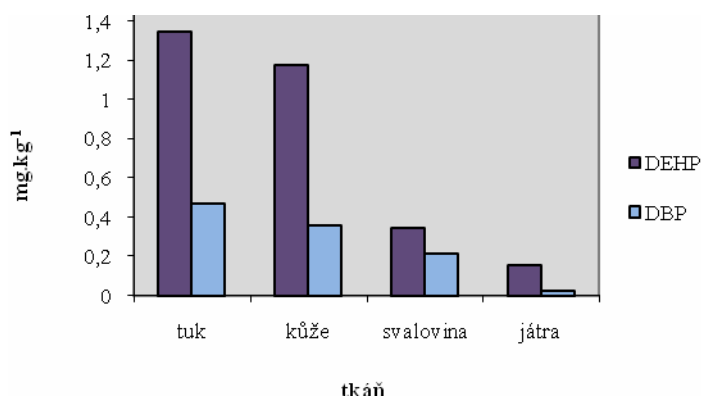
obsah enzymů (Ganning et al, 1984). Záleží také na způsobu aplikace, po intravenózním podání DEHP myším se ester nejvíce akumuloval v játrech, a to dokonce ve větší míře než v tuku (Schulz et al, 1973). Ve všech analyzovaných vzorcích se DEHP kumuloval více než DBP, což je názorně vyobrazeno v grafu 1. Jarošová et al (1999) zjistila, že se DBP v těle broilerů distribuoval rovnoměrně ve všech sledovaných tkáních a DEHP se kumuloval převážně ve tkáni tukové. V našem pokuse se tento trend neprojevil a naopak byla prokázána afinita obou esterů ke tkáni tukové.

Tab. 1 Kumulace esterů kyseliny ftalové v těle kuřecích broilerů v mg.kg⁻¹ původní hmoty.

	n	DEHP [mg.kg ⁻¹]	DBP [mg.kg ⁻¹]
svalovina	8	0,35	0,22
kůže	8	1,18	0,36
tuk	8	1,36	0,47
játra	1	0,16	0,02

n=počet vzorků

Graf 1 Distribuce DEHP a DBP v jednotlivých tkáních kuřat v mg.kg⁻¹ původní hmoty.



ZÁVĚR

Naše měření potvrdila lipofilní charakter ftalátů, které byly shodně u všech vyšetřovaných vzorků nejvíce akumulovány v tukové tkáni a následně v kůži kuřat. Tuková tkáň je proto vhodným indikátorem kontaminace PAEs. Vysoké obsahy DEHP i DBP v kůži jsou podmíněny jednak vysokým obsahem lipidů v této tkáni, ale také důsledkem environmentální kontaminace, výskyt ftalátů je ubikvitární. Přestože PAE nejsou persistentní a rychle se metabolizují, byly všechny sledované tkáně DEHP a DBP kontaminovány. Ačkoli játra bývají častým rezervoárem environmentálních znečištěnin, v našem pokuse akumulovaly nejmenší množství obou ftalátů. Důvodem je jejich značná hydrolytická aktivita a bohatý výskyt enzymů. Hodnoty kontaminace získané v našem pokuse nemusí být konečné. Spotřebitel může očekávat ještě její navýšení, a to v závislosti na použitých obalových materiálech, odkud mohou estery také přecházet. Naše výsledky jsou přínosné také vzhledem

ke stále se zvyšující spotřebě kuřecího masa v České republice. U dětí, které jsou z pohledu toxicity esterů kyseliny ftalové považovány za obzvláště náchylnou skupinu populace, se drůbeží těší největší oblibě z nabídky mas.

LITERATURA

Foster, P. M. (2006): Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int. J. Androl.*, 29, 140-147.

Frederiksen, H., Skakkebaek, N. E., Andersson, A-M. (2007): Metabolism of phthalates in humans. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51: 899-911.

Ganning, A. E., Brunk, U., Dallner, G. (1984): Phthalate esters and their effect on the liver. *Hepatology*, 4(3): 541-547.

Heidel, J. J., Powell, C. J. (1992): Phthalate ester effects on rat Sertoli cell function in vitro: Effects of phthalate side chain and age of animal. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 115: 116-123.

CHu, I., Villeneuve, D. C., Secours, S. W., Franklin, C., Rock, G., Viau, A. (1978): Metabolism and tissue distribution of mono-2-ethylhexyl phthalate in the rat. *Drug Metab. Dispos.*, 6(2): 146-148.

Jaakkola, J. J. K., Knight, T. L. (2008): The role of exposure to phthalates from polyvinyl chloride products in the development of asthma and allergies: A systematic review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.*, 116(7): 845-853.

Jarošová, A., Gajdůšková, V., Raszyk, J., Ševela, K. (1999): Di-2-ethylhexyl phthalate and di-n-butyl phthalate in the tissues of pigs and broiler chicks after their oral administration. *Vet.Med.-Czech.*, 3: 61-70.

Main, K. M., Mortensen, G. K., Kaleva, M. M., Boisen, K. A., et al. (2006) Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ. Health Perspect.*, 114: 270-276.

Schettler, T. (2006): Human exposure to phthalates via consumer products, *Int. J. Androl.*, 29: 134-139.

Schulz, C. O., Rubin, R. J. (1973): Distribution, metabolism and excretion of di-2-ethylhexyl phthalate in the rat. *Environ. Health Perspect.*, 4: 3-26.

Stratil, P., Kubán, V. (2005): Exogenní karcinogeny v potravinách a karcinogeny vnikající při jejich technologickém zpracování. *Chem. Listy.*, 99: 3-12.