



Univerza v Mariboru

**FAKULTETA ZA KEMIJO IN
KEMIJSKO TEHNOLOGIJO**

Smetanova ulica 17
2000 Maribor, Slovenija
www.fkkt.um.si

Ernest Vončina

Analitika nevarnih snovi v okolju

Zapiski predavanj

Maribor, 2013

1. izdaja 2013

Avtor: **dr. Ernest Vončina**

Vrsta publikacije: zapiski predavanj

Založnik: FKKT Univerze v Mariboru

Naklada: Elektronski učbenik

Dostopno na naslovu: <http://atom.uni-mb.si/stud/egradiva.php>

Gradiva iz publikacije, brez dovoljenja avtorjev, ni dovoljeno kopirati, reproducirati, objavljati ali prevajati v druge jezike.

CIP - Kataložni zapis o publikaciji

Univerzitetna knjižnica Maribor

543:620.26(075.8)

VONČINA, Ernest

Analitika nevarnih snovi v okolju [Elektronski vir] : zapiski predavanj / Ernest Vončina. – 1. izdaja – El. učbenik. – Maribor : Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2013

Nacin dostopa (URL):

<http://atom.uni-mb.si/stud/egradiva.php>

ISBN 978-961-248-390-6

COBISS.SI-ID 74490113

UPORABLJENE KRATICE

CAS	Identifikacijska številka kemikalije
IUPAC	Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo (angl. International Union of Pure and Applied Chemistry)
GLP	Dobra laboratorijska praksa, (angl. Good Laboratory Practice)
ARSO	Agencija Republike Slovenije za Okolje
HPLC	Visokotlačna tekočinska kromatografija
LC	Tekočinska kromatografija
MS	Masna spektrometrija
ISO	Mednarodna organizacija za standardizacijo (angl. International Organization of Standardization)
LOD	Meja zaznavnosti (angl. Limit of Detection)
LOQ	Meja določljivosti (angl. Limit of Quantification)
HRGC	Visoko ločljiva plinska kromatografija (angl. High Resolution Gas Chromatography)
HRMS	Visoko ločljiva masna spektrometrija (angl. High Resolution Mass Spectrometry)
PCDD/PCDF	Poliklorirani dibenzodioksini in poliklorirani dibenzofurani
PCB	Poliklorirani bifenili
OCF	Organoklorni pesticidi
DBNP	2,6-di-t-butil-4-nitrofenol
PBDEs	Polibromirani bifenil etri
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)
EPA	Agencija za varstvo okolja (angl. U.S. Environmental Protection Agency)
POP	Obstojna organska onesnaževala (angl. Persistent Organic Pollutants)
BFR	Bromirani zaviralci gorenja
TEQ	Toksični ekvivalenti
TDI	Dopustni dnevni vnos (angl. Tolerable daily intake)

UPORABLJENI SIMBOLI

T	temperatura	°C
m	masa	mg, g
V	volumen	mL, L
n	množina snovi	mol
c	množinska koncentracija	mol/L
γ	masna koncentracija	g/L
w	masni delež	%
M	molska masa	g/mol

KAZALO

1. DIOKSINI V OKOLJU.....	3
DIOKSINI, NJIHOV NASTANEK IN IZVORI:	3
Primarni izvori dioksinov :	3
Beljenje celuloze:	4
Termični procesi:.....	4
Dioksini v tekstilni industriji:	5
FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI PCDD.....	11
OBSTOJNA ORGANSKA ONESNAŽEVALA (POPs)	14
LASTNOSTI OBSTOJNIH ORGANSKIH ONESNAŽEVAL (POPs)	14
OBREMENJENOST S POLIKLORIRANIMI DIOKSINI IN FURANI	19
Trendi upadanja koncentracij PCDD/F	19
Nesreče.....	25
Belgijski primer onečiščenja z dioksini	26
Normativi za poliklorirane dioksine in furane.....	27
2. ONESNAŽEVALA V OKOLJU	28
PROGRAM MONITORINGA ŽIVIL V PROMETU V SLOVENIJI	32
3. POLIKLORIRANI DIBENZO-P-DIOKSINI, FURANI, POLIKLORIRANI BIFENILI IN ORGANOKLORNI PESTICIDI V MAŠČOBNEM TKIVU.....	38
Izbira in priprava vzorcev:.....	39
Ekstrakcija, čiščenje vzorca za analizo PCDD/Fs in PCB:	39
Ekstrakcija, čiščenje vzorca za analizo OCPs:	40
4. ORGANSKE KOSITROVE SPOJINE: DOLOČEVANJE ORGANOKOSITROVIH SPOJIN V LASEH Z METODO GC/MS-MS.....	49
Odvzem vzorcev las:	51

Priprava vzorca za določitev organokositrovih spojin:	52
Priprava vzorca za določitev skupnega kositra (Sn):	52
5. SISTEMSKI PESTICIDI IN POMORI ČEBEL	59
Gojenje koruze in odvzem gutacijske tekočine:	61
Kontaktni poiskus s čebelami:	62
Fotoliza vodne raztopine klotianidina:	62
Instrumentalno delo:	63
Pesticidne spojine obdelanega semena koruze:	64
Metiokarb:	65
Klotianidin:	67
Fludioksonil:	70
Metalaksil:	71
Organske spojine gutacijske tekočine mlade rastline koruze:	71
Kontaktni poiskus s čebelami:	72
6. DOLOČEVANJE MEŠANICE IZOMEROV NONILFENOLOV Z GC/MS/MS	75
7. IZVOR IN DOLOČEVANJE N-NITROZO-DIBENZILAMINA IN N,N-DIBENZILAMINA	81
Uporabljeni analitski pristopi:	85
Zaznava in kvantitativna določitev N-nitrozodibenzilamina:	85
8. ORGANSKE SPOJINE V PITNIH VODAH PRI UPORABI PLASTIČNIH CEVI	91
Senzorične lastnosti in kakovost vode v plastičnih ceveh po kloriranju:	93
Dezinfekcija:	94
Poraba klora pri dezinfekciji:	94
2,6-di-t-butil-4-nitrofenol (DBNP):	95

1. DIOKSINI V OKOLJU

DIOKSINI, NJIHOV NASTANEK IN IZVORI:

Prve objave o različnih poteh njihovega nastanka in razširjanja so podali ameriški znanstveniki v letu 1980. Vedenje o dioksinih se vsako leto povečuje s številnimi objavami v mednarodni literaturi, tako da lahko povzamemo sledeča dejstva: dioksini se pojavljajo v sledovih le kot onečiščenja pri različnih industrijskih in termičnih procesih. Razširjajo se v širše okolje iz tako imenovanih "primarnih izvorov", kjer nastanejo v industrijskih ali sežignih procesih in prehajajo nato iz enih ekoloških sistemov v druge. Kot "sekundarni izvori" dioksinov pridejo v poštev z dioksini onečiščeno blato čistilnih naprav, kompost, deponijski plin ali večja onečiščena področja na primer v bližini sežigalnic.

Primarni izvori dioksinov :

Kemikalije: V preteklosti so bili glavni izvori onečiščenja okolja s PCDD/PCDF različni postopki proizvodnje kloriranih organskih kemikalij. Pentaklorofenol, ki so ga uporabljali za zaščito lesa, je vseboval kot onečiščenje nekaj miligramov dioksinov na kilogram aktivne spojine. Les notranjih prostorov, ki je bil zaščiten s kloriranimi fenoli, predstavlja še dandanes nevarnost za zdravje ljudi. Klorirane organske spojine različnih herbicidov so prav tako vsebovale ostanke dioksinov. Poznan je primer v Italiji v Sevesu, kjer je prišlo do nesrečne eksplozije v kemični tovarni ali pa primer v vietnamski vojni uporabljenega herbicidnega preparata 2,4,5-T, ki je vseboval dioksine. S pršenjem so onečistili velika področja. S spremembami v sintezi in z boljšim vodenjem postopkov so vsebnosti dioksinov v preparatih, ki se danes uporabljajo (Diklorpop, 2,4-D ali 2,4-DB), manjše od enega mikrograma na kilogram aktivne spojine.

Beljenje celuloze:

Papirnice oziroma tovarne celuloze so bile velik vir dioksinov, če pri izdelavi papirja belijo celulozna vlakna z molekularnim klorom. Ta tehnologija se povsod po svetu opušča in se nadomešča s tehnologijo, ki ne uporablja aktivnega klora. Papir proizveden po novejših postopkih, narejen iz svežih celuloznih vlaken, vsebuje navadno manj kot 1 ng toksičnih ekvivalentov (TEQ) na kilogram papirja. Papir narejen iz reciklirane surovine vsebuje v povprečju med 5 in 10 ng TEQ/kg papirja. Vzroka za to povišano onečiščenje še niso ugotovili, verjetno pa so krive uporabljene tiskarske barve in aditivi.

Termični procesi:

Pri gorenju ali pri številnih drugih termičnih procesih v temperaturnem območju med 250°C in 700°C in v prisotnosti izvora klora lahko zaznamo novo nastale PCDD/PCDF. Nastanek dioksinov je v veliki meri odvisen od sežignih pogojev in sestave kuriva oziroma goriva. V sežigalnicah komunalnih ali drugih posebnih odpadkov nastajajo pri pogojih nepopolnega sežiga dioksini in furani v dimnih plinih ob katalitskem delovanju letečega pepela. Proces poteka zelo uspešno v posežignem, že hladnejšem delu peči, pri 250°C do 450°C in predvsem v odpraševalnem delu elektrostatskega precipitatorja. Moderne sežigalnice uporabljajo tako tehnologijo, ki zadosti predpisu, da emisije toksičnih dioksinov in furanov ne smejo biti večje kot 0,1 nanograma TEQ na kubični meter zraka. Težje je kontrolirati emisije iz metalurških obratov kot so proizvodnja aluminija, bakra, železa, svinca. Meritve emisij iz takih obratov kažejo na to, da so izraziti vir onečiščenja z dioksini. Termoelektrarne na premog ne predstavljajo velikega izvora dioksinov. Glede na opravljene raziskave so njihove emisije po pravilu manjše od 0,1 nanograma TEQ na kubični meter zraka. Domača kurišča na les ali premog so številni nekontrolirani izvori dioksinov z emisijami med 0,005 do 4 nanogramov TEQ na kubični meter zraka. Povišane vrednosti nastopijo predvsem takrat, ko poleg naravnega lesa kurimo še odpadni papir, lepenko, karton ali celo plastiko.

Dioksini v tekstilni industriji:

Med preiskavami o izvoru PCDD/PCDF v odpadnih vodah komunalnih čistilnih naprav je bilo odkrito, da vsebujejo odpadne vode pralnih strojev v gospodinjstvih znatne vsebnosti teh spojin. Vzrok zanje so pripisali perilu. Poiskovali so odgovoriti na več vprašanj kot na primer: kakšne so vsebnosti dioksinov v različno obdelanih sintetičnih ali bombažnih vlaknih? V katerih stopnjah tehnološke obdelave bombaža lahko pričakujemo višje vsebnosti dioksinov? V Nemčiji porabijo letno v izdelavi tekstila približno 125.000 ton več kot 500 različnih kemikalij. Kateri kemični procesi so lahko vzrok za vsebnosti dioksinov v tkaninah?

Analize bombažne tkanine in tudi drugih sintetičnih tkanin v različnih stopnjah izdelave in obdelave so pokazale, da so koncentracije PCDD/PCDF zelo nizke v območju 50 – 370 pg TEQ na gram tkanine. Presenetljivi so bili rezultati tkanin po uporabi oziroma nošnji na primer bele bombažne spodnje majice. Koncentracije dioksinov so bile več stokrat višje kot pri novi, še nenošeni majici.

Med izdelavo tekstila se mnogokrat uporabljajo tudi klorirane in bromirane spojine, pogosto tudi kot spojine, ki preprečujejo gorenje. Možnost nastanka kloriranih in bromiranih in tudi mešanih kloro – bromo dioksinov je zelo verjetna pri uporabi povišanih temperatur in odprtega plamena pri postopkih smodenja tkanine. Rezultati preiskav so pokazali, da so emisijske koncentracije polikloriranih in polibromiranih dibenzodioksinov in dibenzofuranov v zraku nizke, manjše od 0,01pg TEQ /m³ in da vsebnosti v tkanini niso problematične. Edini problem pa predstavlja kondenzirani, odsedeni del aerosolov v dimniku, kjer so koncentracije lahko zelo visoke, v območju več 100µg/kg.

Seveda lahko predstavljajo različne kemikalije, barvila ali pigmenti, ki se uporabljajo v tekstilni industriji, izvor onesnaženja s PCDD/PCDF. Tako je poznano, da dioksazinska barvila ali karbazol vijolični pigmenti ali pa na primer nikljeva ftalocianinska barvila vsebujejo sledove dioksinov. Z boljšimi sintezniimi postopki je mogoče doseči zmanjšanje ostankov na koncentracijske vrednosti nekaj µg/kg barvila ali pigmenta.

Za afero norih krav pretresajo Evropo še »dioksinske« kokoši, jajca in prašiči. Skupno jim je to, da so živali jedle hrano dvomljive vrste in kakovosti. Sodobno hranjenje prežvekovalcev ali perutnine z natančno odmerjenimi dodatki kostne moke, ribje moke, proteinskih in maščobnih koncentratov vseh vrst povzroča sicer hitro rast živali, a obenem lahko povzroči kopičenje obstojnih organskih spojin kot so DDT, poliklorirani bifenili, dioksini ali druge v maščobah topne, težko razgradljive spojine. Sedaj je že poznano, da je nastala belgijska dioksinska afeta z živalsko krmo, onečiščeno z dioksini. V tovarni živalskih krmil so zbrali 80 ton izrabljenih olj za cvrtje. V to množino olja je »zašlo« približno 8 litrov polikloriranih bifenilov (PCB) onečiščenih predvsem z polikloriranimi dibenzofurani in manj z dioksini. Iz tega so pripravili 1600 ton piščančje krme, ki so jo uporabljali v mnogih evropskih državah in tako onečistili celo prehrabetno verigo. V belgijskih kokoših so namerili 700 pikogramov TEQ dioksinov na gram maščobe. Enota TEQ predstavlja toksične ekvivalente in rezultat je vsota vseh prispevkov strupenosti posameznih spojin 2,3,7,8-vrste dioksinov in furanov. Strupenost posamezne spojine je podana s TEF, toksičnim ekvivalentnim faktorjem, pri čemer ima 2,3,7,8-TCDD, kot najbolj toksični predstavnik TEF enak 1, vsi ostali predstavniki pa v območju od 0,5 do 0,00001. Iz pregleda številnih literaturnih podatkov o onesnaženosti okolja z dioksini po svetu kaj hitro sledi ugotovitev, da imajo nekatere dežele že težave. Za primer navajamo švedske izkušnje z dioksini. Švedska nacionalna agencija za prehrano je v svojih študijah objavila dognanja, da imajo slaniki ulovljeni v določenih področjih Baltiškega morja v povprečju od 100 do 200 pikogramov toksičnih ekvivalentov (TEQ) v gramu maščobe. Nič torej ne preseneča visoka vsebnost dioksinov v maščobi piščancev, saj so lahko te vrednosti hitro dosežene zaradi visokih bioloških koncentracijskih faktorjev. Pričakujemo lahko, da belgijska afeta ne bo edina, ampak da se bodo zaradi vsesplošnega onesnaževanja okolja problemi pojavili še marsikje drugje. Verjetno se nam torej obetajo nelepi časi, če švedska nacionalna agencija za prehrano v svojih priporočilih svetuje nosečnicam, naj redkeje (le enkrat mesečno) uživajo baltiške ribe in naj te ribe v prehrani nadomestijo z ribami iz manj onesnaženih morij. Tudi ostali potrošniki naj ne bi jedli teh rib pogosteje kot enkrat tedensko. Največja dopustna meja dnevnega vnosa dioksinov za ljudi je od enega do deset pikogramov TEQ na kilogram telesne teže. Povprečni odrasli prebivalec industrijsko razvitih dežel Evrope ima v svojem maščevju od 10 do 40 pikogramov TEQ dioksinov na gram maščobe. Pridobil si jih je predvsem s prehrano. 90% te množine gre na račun

živil živalskega porekla. Človek je najvišje na lestvici v prehrambeni verigi in ima temu primerno visoke koncentracije dioksinov. Mleko doječih mater v Nemčiji ima v povprečju 30 pikogramov TEQ na gram mlečne maščobe. Seveda pa dioksini ne poznajo državnih meja.

Dioksini so kemično, fizikalno in biološko zelo obstojni, zato se v okolju zadržujejo zelo dolgo. Razširjajo se v širše okolje iz tako imenovanih osnovnih izvorov, kjer nastanejo v različnih industrijskih ali sežignih procesih in prehajajo nato iz enih ekoloških sistemov v druge. Dioksini, podobno kot spojine drugih obstojnih organskih onesnaževal, h katerim prištevamo poliklorirane bifenile (PCB) in že vrsto let prepovedane organoklorne pesticide, se razširjajo tudi po zraku, saj so dovolj hlapni. Tako jih najdemo skoraj že v vsakem kotičku sveta, celo v področjih daleč stran od poseljenih področij. Slej ko prej se vračajo molekule teh spojin iz zraka nazaj na zemljo. Tako obstaja v celoti gledano ravnotežje med koncentracijami teh spojin v zraku, zemlji in vodi. Številna obstojna organska onesnaževala so tako hlapna, da lahko obstajajo v atmosferi več dni ali tednov, preden se odsedejo ali izperejo iz nje. Veter jih lahko prenaša tisoče kilometrov daleč od mesta, kjer so nastali, tako da jih najdemo v podobnih koncentracijah kjerkoli na zemeljski obli. Molekule, ki so se iz zraka vrnila na tla ali na vodno površino, lahko ponovno odparijo v zrak in celotna zgodba skoraj nima konca. Zaradi tega je potrebno, da načrtno zmanjšujemo emisije iz vseh mogočih izvorov dioksinov.

Podatki o porazdelitvi in koncentracijah dioksinov v zračnih plasteh nad Evropo so znani. Glede na smer vetra, ki piha nad bolj ali manj industrializiranimi področji, so koncentracije v območju nekaj deset femtogramov do približno enega pikograma na kubični meter zraka. Seveda tak zrak s sledovi dioksinov veje tudi skozi naše slovenske gozdove in pokrajino nasploh. Zeleni deli višjih rastlin, kot so iglavci in listavci, so prekriti z voščeno maso. Ta lipofilna plast voskov odlično srka dioksine iz zraka. Tako so na primer smrekove iglice, če jih zberemo in analiziramo na vsebnost dioksinov, PCB ali drugih organoklornih spojin, odličen pokazatelj zračnega onečiščenja okolja s temi spojinami.

Nemška priporočila za tla onečiščena z dioksini predvidevajo glede na vsebnosti dioksinov določene omejitve v izrabi tal. Če je v tleh manj kot 5 nanogramov toksičnih ekvivalentov (TEQ)

na kilogram zemlje polikloriranih dibenzodioksinov in polikloriranih dibenzofuranov, potem ni omejitev v izkoriščanju vrtnih ali kmetijskih tal. Če so vsebnosti manjše od 40 nanogramov TEQ na kilogram zemlje, ni omejena pridelava zelenjave in sadja, omejena pa je na primer vzgoja živali na prostem. Pri več kot 40 nanogramov TEQ je dovoljena kmetijska aktivnost ob dokazanem minimalnem prenosu dioksinov. Pri vsebnosti več kot 100 nanogramov TEQ je potrebna izmenjava tal na primer na otroškem igrišču ali v naselju. Pri več kot 1000 nanogramov TEQ je potrebna dekontaminacija z izmenjavo zemljišča tudi izven naselja in pri več kot 10000 nanogramov TEQ na kilogram zemljišča je potrebna zamenjava celotnega zemljišča. Onečiščena zemlja se smatra kot posebno nevarni odpadki.

Vsaj v razvitem svetu so dioksini že dobro premerjeni. Države izvajajo svoje narodne programe zasledovanja obstojnih organskih onesnaževal. V poročilu programa za okolje Združenih narodov (UNEP) pravijo, da je še dolga pot do tega, da bi dobili pravo sliko o razširjanu dioksinov in furanov v okolje. Študija je pokazala, da ima le petnajst najbolj razvitih industrijskih držav, med katerimi jih je enajst iz Evrope, pregled nad emisijami dioksinov v zraku in da praktično nobena država nima pregleda nad vsebnostjo dioksinov v vodah ali tleh. Določili so tudi celotno emisijo dioksinov v zrak v letu 1995, ki je bila 10,5 kg. 70% te množine pripisujejo deležu zaradi emisij sežigalnic posebnih in komunalnih odpadkov. V splošnem pa se stanje v zadnjih letih popravlja, saj se emisije manjšajo.

Kakšno pa imamo stanje pri nas v Sloveniji? Koliko pa vemo o porazdelitvi in vsebnostih dioksinov pri nas? V splošnem se verjetno ne razlikujemo veliko od stanja v drugih evropskih državah ali nam bližnjih sosedih. Verjetno je Slovenija še kar čista dežela, vsaj kar se kloriranih spojin tiče, če malo pozabimo na onečiščenje reke Krke in okolice s polikloriranimi bifenili (PCB). V Inštitutu za varstvo okolja na Zavodu za zdravstveno varstvo v Mariboru se že vrsto let ukvarjamo z določevanjem vsebnosti dioksinov povsod tam, kjer smo lahko pričakovali višje koncentracije. To so predvsem meritve določanja emisijskih koncentracij tistih nekaj industrijskih sežigalnic, ki jih do sedaj imamo v Sloveniji. Zato imamo na razpolago kar nekaj znanja in izkušenj. Tako kot drugod po Evropi smo tudi v Sloveniji naleteli na problem določevanja vsebnosti dioksinov v hrani in širše v okolju šele v zadnjem času in smo torej vsi

postavljeni v situacijo, da bo potrebno v najkrajšem času zagotoviti zanesljivo kontrolo. Z ustreznim instrumentalnim sklopom visoko ločljive plinske kromatografije in visoko ločljive masne spektrometrije (HRGC / HRMS) je omogočeno po vzoru drugih evropskih držav slovensko zasledovanje nizkih koncentracij obstojnih organskih spojin, med katerimi so tudi dioksini.

Pri gorenju ali pri številnih drugih termičnih procesih v temperaturnem območju med 250°C in 700°C in v prisotnosti izvora klora lahko zaznamo novo nastale PCDD/PCDF. PCDD in PCDF se ne proizvajajo namenoma, temveč nastajajo pri procesih nekontroliranega izgorevanja, npr. v sežigalnicah industrijskih in komunalnih odpadkov, pri izgorevanju fosilnih goriv, nastopajo kot nečistoče pri proizvodnji in uporabi pentaklorofenola (za zaščito lesa), pri beljenju papirja s klorom in drugih industrijskih procesih (npr. pri proizvodnji in uporabi nekaterih kloriranih pesticidov), kot tudi zaradi naravnih virov (vulkani, gozdni požari itd).

Nastanek dioksinov je v veliki meri odvisen od sežignih pogojev in sestave kuriva oziroma goriva. V sežigalnicah komunalnih ali drugih posebnih odpadkov nastajajo pri pogojih nepopolnega sežiga dioksini in furani v dimnih plinih ob katalitskem delovanju letečega pepela. Proces poteka zelo uspešno v posežnem, že hladnejšem delu peči, pri 250°C do 450°C in predvsem v odpraševalnem delu elektrostatskega precipitatorja. Moderne sežigalnice uporabljajo tako tehnologijo, ki zadosti predpisu, da emisije toksičnih dioksinov in furanov ne smejo biti večje kot 0,1 nanograma TEQ na kubični meter zraka. Težje je kontrolirati emisije iz metalurških obratov kot so proizvodnja aluminija, bakra, železa, svinca. Meritve emisij iz takih obratov kažejo na to, da so izraziti vir onečiščenja z dioksini. Termoelektrarne na premog ne predstavljajo velikega izvora dioksinov. Glede na opravljene raziskave so njihove emisije po pravilu manjše od 0,1 nanograma TEQ na kubični meter zraka. Domača kurišča na les ali premog so številni nekontrolirani izvori dioksinov z emisijami med 0,005 do 4 nanogramov TEQ na kubični meter zraka. Povišane vrednosti nastopijo predvsem takrat, ko poleg naravnega lesa kurimo še odpadni papir, lepenko, karton ali celo plastiko.

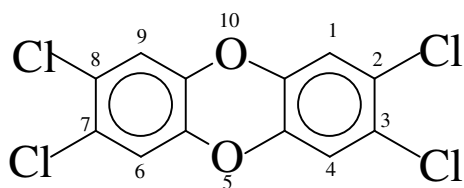
Transport dioksinov v okolju je pogojen z njihovimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi: obstojnost, slaba toponost v vodi itd. Dioksini, ki pridejo v zrak, lahko v okolju potujejo na dolge razdalje in

jih lahko najdemo po celem svetu. Iz zraka se lahko odlagajo na rastline, kjer jih zaužijejo živali. V vodnem okolju se zaradi zelo slabe topnosti vežejo na sediment in suspendirane delce in lahko potujejo naprej ali pa jih zaužijejo vodni organizmi. Pri živalih se dioksini akumulirajo v maščobnem tkivu in delno tudi v jetrih.

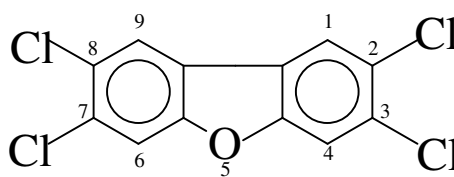
V okolju je razgradnja dioksinov v največji meri posledica fotokemične in delno tudi biološke aktivnosti. Razpolovna doba v zemlji je ocenjena na 10-12 let.

FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI PCDD

Poliklorirani dibenzo [b,e] [1,4] dioksini ali krajše dibenzo-p-dioksini (PCDD) in polikloriran dibenzofurani (PCDF) in njihovo sistematično oštevilčenje po IUPAC nomenklaturi:



2,3,7,8-TCDD



2,3,7,8-TCDF

Struktura tetrahalogeniranega 2,3,7,8-tetrakloro dibenzo-p-dioksina (2,3,7,8-TCDD) in 2,3,7,8-tetrakloro dibenzofurana (2,3,7,8-TCDF)

Ime:	2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin
Strukturna formula:	
Mol. formula:	C ₁₂ H ₄ Cl ₄ O ₂
Mol. masa:	321.98

Tališče:	305°C
Topnost v vodi:	0,0002 mg/l pri 25°C
log Kow	6,80 pri 25°C

Neugodne lastnosti:

- ✓ izredna toksičnost za večje število vrst živih bitij
- ✓ izredna obstojnost - razpolovna doba razpada v zemlji :
- ✓ od 10 do 12 let,
- ✓ obstojnost v močnih kislinah in lugih,
- ✓ obstojnost v oksidativnih in reduktivnih pogojih do 700°C,
- ✓ slaba topnost v vodi
- ✓ dobra topnost v maščobah
- ✓ hlapnost (širjenje v okolje).
- ✓ visoki biološki koncentracijski faktorji

PCDD/PCDF	Tališče (°C)	Vrelišče (°C)
1-Cl ₁ DD	105	315
2,3-Cl ₂ DD	163	358
1,2,4-Cl ₃ DD	128	375
2,3,7,8-Cl ₄ DD	305	447
1,2,3,7,8-Cl ₅ DD	240	464

1,2,3,6,7,8-Cl ₆ DD	285	487
1,2,3,4,6,7,8-Cl ₇ DD	264	507
1,2,3,4,5,6,7,8-Cl ₈ DD	330	510
PCDD/PCDF	Tališče (°C)	Vrelišče (°C)
2-Cl ₁ DF	103	338
2,3-Cl ₂ DF	127	375
2,3,8-Cl ₃ DF	191	408
2,3,7,8-Cl ₄ DF	228	438
1,2,3,7,8-Cl ₅ DF	227	465
1,2,3,6,7,8-Cl ₆ DF	222	488
1,2,3,4,6,7,8-Cl ₇ DF	237	507
1,2,3,4,5,6,7,8-Cl ₈ DF	254	537

OBSTOJNA ORGANSKA ONESNAŽEVALA (POPs)

Klasični organoklorni pesticidi:

- ✓ DDT
- ✓ Aldrin
- ✓ Dieldrin
- ✓ Endrin
- ✓ Klordan
- ✓ Heptaklor
- ✓ Mirex
- ✓ Toxafen

Industrijske kemikalije

- ✓ Poliklorirani bifenili (PCB)
- ✓ Heksaklorbenzen (HCB)

Nenamerno nastali stranski produkti:

- ✓ Dioksini (PCDD/PCDF)
- ✓ PCB
- ✓ HCB

LASTNOSTI OBSTOJNIH ORGANSKIH ONESNAŽEVAL (POPs)

Obstojnost:

- Razpolovni čas v vodi > 2 meseca
- Razpolovni čas v zemlji > 6 mesecev
- Razpolovni čas v sedimentih > 6 mesecev

Bioakumulacija:

Biološki koncentracijski faktor za vodni živelj > 5000

Log K_{ow} > 5

Visoka toksičnost

Sposobnost širjenja na velike razdalje:

Zrak, voda, flora in favna

Zrak -razpolovni čas > 2 dni

Toksičnost in ekotoksičnost

Toksičnost PCDD/F se zelo razlikuje med različnimi izomerami. Najbolj toksičen je 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin, ki ima LD_{50} za najbolj občutljive živalske vrste (morski prašiček) okrog 1 ug/kg telesne teže. Podobno toksičnost pa ima tudi 1,2,3,7,8-PeCDD (TEF=0,5).

Vplivi na zdravje ljudi:

- delujejo kancerogeno in teratogeno
- pri izpostavljenju večjim koncentracijam se pojavljajo klorove akne (Seveso)
- povzročajo poškodbe jeter in imunskega sistema
- povzročajo poškodbe centralnega in perifernega živčnega sistema
- povzročajo različne kožne izpuščaje, razbarvanje kože, povečano poraščenost
- povzročajo izgubo telesne teže.

Testi na živalih pa so pokazali, da dalj časa trajajoča izpostavljenost nizkim koncentracijam vpliva na reprodukcijo ali razvoj potomcev, povzročajo pa tudi slabšanje imunskega odziva in tudi prirojene okvare pri mladičih. Dioksine prištevamo med spojine, ki že v nizkih

koncentracijah rušijo hormonsko ravnotežje živih bitij (angl. endocrine disruptors). Povprečna razpolovna doba dioksinov v živih bitjih je 2-6 let.

Toksični ekvivalenti

Pri določitvi dioksinov v okoljskih in bioloških vzorcih se rezultati navadno podajajo v obliki toksičnih ekvivalentov (TE) 2,3,7,8-TCDD. TE je vrednost, ki predstavlja toksičnost vzorca in je kriterij za oceno tveganja (angl. risk assesment) dioksinov in sorodnih spojin. S pomočjo toksikoloških študij so posameznim dioksinom in furanom določili relativne toksične ekvivalentne faktorje (TEF=Toxic Equivalent Factor), ki se uporabljajo za izračun toksičnih ekvivalentov (TE).

Toksične ekvivalentne faktorje ima tudi 12 planarnih PCB (WHO podaja kot toksične PCB 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169, 189), ki niso, ali pa so samo mono-orto kloro-substituirani, z dvema klorovima atomoma v para poziciji in vsaj z enim klorovim atomom na meta poziciji.

Izračun TE vrednosti zahteva koncentracije vseh komponent z TEF. V praksi pa so nekatere od teh spojin pod mejo zaznavnosti (angl. Limit of detection, LOD). Rezultati pod LOD predstavljajo problem pri statistični obdelavi ali pri primerjavi podatkov z različnimi LOD. Testirali so več strategij, pri čemer so vzeli rezultate pod LOD: (1) kot 0, (2) kot LOD, (3) kot LOD (3)

Tabela 1.1: TEF za poliklorirane dioksine in furane, ter koplanarne in planarne PCB (EPA, WHO-1998)

Dioksini	TEF	WHO-TEF
2,3,7,8-TCDD	1,0	1
1,2,3,7,8-PeCDD	0,5	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	0,01
OCDD	0,001	0,0001
Furani		
2,3,7,8-TCDF	0,1	0,1
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	0,5
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	0,05
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	0,01
OCDF	0,001	

Ko-planarni PCB		
3,3',4,4'-TCB (PCB 77)		0,0001
3,4,4',5-TCB (PCB 81)		0,0001
3,3',4,4',5-PeCB (PCB 126)		0,1
3,3',4,4',5,5'-HxCB(PCB 169)		0,01
Mono-orto PCB		
2,3,3',4,4'-PeCB (PCB 105)		0,0001
2,3,4,4',5-PeCB (PCB 114)		0,0005
2,3',4,4',5-PeCB (PCB 118)		0,0001
2',3,4,4',5-PeCB (PCB 123)		0,0001
2,3,3',4,4',5-HxCB (PCB 156)		0,0005
2,3,3',4,4',5'-HxCB(PCB 157)		0,0005
2,3',4,4',5,5'-HxCB(PCB 167)		0,00001
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB(PCB189)		0,0001

OBREMENJENOST S POLIKLORIRANIMI DIOKSINI IN FURANI

Študije so pokazale, da ima izpostavljenost dioksinom številne neugodne posledice za zdravje, pri čemer so vplivi odvisni od številnih faktorjev: nivoja, pogostosti in časa trajanja izpostavljenosti. Človek preko 95% dioksinov dobi iz prehrane z živili živalskega izvora, pri čemer kot glavni vir prevladujejo meso in mesni izdelki, mlečni izdelki in ribe, kar bi lahko v največji meri pripisali poti: "zrak-trava-krava-človek". Manjši delež pa predstavlja izpostavljenost kontaminiranemu okolju, t.j. vdihavanja zraka, kontaminiranega s sledovi dioksinov, adsorbiranih na delce, ali nenamernim zaužitjem z zemljo kontaminirane hrane, kar pa na bolj kontaminiranih področjih ne smemo zanemariti. Raziskave so pokazale večjo obremenjenost vodnih kot kopenskih organizmov.

Ugotovili so, da se razmerje izomer pri vzorcih iz okolja in industrijskih produktih, zelo razlikujejo od razmerja izomer, ki so prisotni v tkivih živih organizmov. Pri ljudeh prevladujejo višje klorirani PCDD, kot so OCDD, hepta- in heksaklorirani CDD in CDF, medtem ko v vzorcih iz okolja navadno prevladujejo tetra in penta-klorirani PCDD in PCDF. WHO je 1998 znižala dopustni dnevni vnos (angl. Tolerable daily intake, TDI) iz 10 pg 2,3,7,8-TCDD/kg telesne teže/dan na 1-4 pg WHO-TE/kg telesne teže. Ker je ta meja dokaj nizka in ker so dioksini prisotni v materinem mleku, so lahko dojenčki zaradi nizke teže izpostavljeni koncentracijam, ki so višje od te vrednosti. Povprečna izpostavljenost prebivalstva v EU je pod WHO TDI 10 pg 2,3,7,8-TCDD/kg telesne teže/dan in še postopno upada, vendar pa še ni podatkov ali se bo to upadanje nadaljevalo, da bo dosežen tudi novi predlagani TDI. Za zanesljivo napovedovanje izpostavljenosti človeka bi bilo potrebno boljše poznavanje mehanizmov in poti transporta v okolju in degradacijskih procesov dioksinov.

Trendi upadanja koncentracij PCDD/F

V razvitih državah so v zadnjih letih vložili veliko truda v zmanjšanje emisij dioksinov, kar se že opazuje v okolju, vendar pa zaradi obstojnosti teh spojin koncentracije zelo počasi padajo. Podatki

iz Nemčije in Velike Britanije kažejo, da so koncentracije v zraku in travi upadle za okrog 10-20% na leto v 80 letih in začetku 90 let. Trendi upadanja so opazni tudi pri koncentracijah, ki jih najdejo v maščobnem tkivu in krvi ljudi v razvitem svetu.

Podatki o izpostavljenosti ljudi preko hrane kažejo, da se je v zadnjih dveh desetletjih tovrstna izpostavljenost v povprečju zmanjšala za okrog 12% na leto, glede na koncentracije v živilih in potrošnjo živil. V EU so ocenili povprečno dnevno izpostavljenost PCDD/F preko hrane na 0.93-3.0 pg TE/kg/dan, kar je znotraj predlagane TDI. Ocenili so tudi, da PCDD/F lahko prispevajo okrog 50% celotnih TE dnevnega vnosa in lahko celotna izpostavljenost pomembno presega predlagan TDI. Med leti 1988 in 1993 je povprečna koncentracija dioksinov v materinem mleku v EU padla za 35%, pri čemer je bil ta padec izrazitejši v neurbanih področjih. Meritve v Nemčiji med leti 1988 in 1996 pa so pokazale, da je povprečna koncentracija dioksinov v krvi odraslih moških padla za okrog 64%.

Tabela 1.2: obremenitev splošne populacije in povišane koncentracije v posebnih primerih

Spojina	vzorec	koncentracija	leto	kje	referenca
2,3,7,8-TCDD	maščobno tkivo ljudi	10 pg/g	1980	Kanada	3
2,3,4,7,8-pentaCDF	maščobno tkivo ljudi	17 pg/g	1980	Kanada	3
2,3,7,8-TCDD	maščobno tkivo ljudi	6 pg/g	1985	Vietnamski vojaki	3
2,3,7,8-TCDD	maščobno tkivo ljudi	1840 pg/g	1976	Seveso	3
2,3,7,8-TCDD	maščobno tkivo ljudi	2-97 pg/g	1985	Švedska	3
PCDD/F	materino mleko	0,6-302 pg/g	1985	Švedska	3
PCDD/F	materino mleko	4,2-754 pg/g	1985	Vietnam	3
PCDD/F	materino mleko	30 pg TE/g maščobe	1985-90	Nemčija	40
PCDD/F	materino mleko	12 pg TE/g maščobe	2000	Nemčija	40

Tabela 1.3: koncentracije PCDD/F v vzorcih iz okolja

Spojina	vzorec	koncentracija	leto	kje	referenca
PCDD/F	leteči pepel (fly ash)	68,8 ng TE/g	-	Japonska	32
PCDD/F	zrak (neurbano območje)	12 fg WHO-TE /m ³	-	ZDA	38

PCDD/F	zrak (urbano območje)	29-900 fg I-TE/m ³	-	Nemčija	
PCDD	emisija sežigalnic komun.odpadkov	60-2000 ng/m ³	1986	Nemčija	
PCDF	emisija sežigalnic komun.odpadkov	140-10000 ng/m ³	1986	Nemčija	15
PCDD	leteči pepel sežigalnic komun.odpadkov	1-860 ug/kg	1986	Nemčija	15
PCDF	leteči pepel sežigalnic komun.odpadkov	2-1660 ug/kg	1986	Nemčija	15
PCDF	saje od požarov v prisotnosti PCB	okrog 2 ug/kg	1986	Nemčija	15
PCDD/F	blato čistilnih naprav	okrog 200 ng/TE/kg s.s.	1987-8	Nemčija	15
PCDD/F	zemljina	0,1-87 ng TE/kg	1999	EU	18
PCDD/F	sediment	0,07-207 ng TE/kg	1999	EU	18
PCDD/F	zrak (neurbano območje)	6-125 fg TE/m ³	1999	EU	18
PCDD/F	zrak (urbano območje)	17-277 fg TE/m ³	1999	EU	18

Tabela 1.4: koncentracije PCDD/F v živilih

Spojina	tkivo	koncentracija	leto	kje	referenca
PCDD/F	dnevni vnos	51 I-TE pg	-	Nemčija	40
PCDD/F	svinjska maščoba	0,29 pg I-TE /g	-	Nemčija	40
PCDD/F	goveja maščoba	0,66 pg I-TE /g	-	Nemčija	40
PCDD/F	perutninska maščoba	0,58 pg I-TE /g	-	Nemčija	40
PCDD/F	mesni izdelki	0,41 pg I-TE /g	-	Nemčija	40
PCDD/F	mleko	0,58 pg I-TE /g	-	Nemčija	40
PCDD/F	jajca	1,16 pg I-TE /g	-	Nemčija	40
PCDD/F	ribe	0,21 pg I-TE /g	-	Nemčija	40
PCDD/F	sadje in zelenjava	0,01 pg I-TE /g	-	Nemčija	40
PCDD/F	sir	0,01-0,46 pg I-TE /g	1999	Brazilijska	41
PCDD/F	ribje olje	4,6 pg I-TE /g	1999	Brazilijska	41
PCDD/F	mleko	0,07 pg I-TE /g	1999	Brazilijska	41
PCDD/F	mleko	0,09-0,90 pg I-TE /g	1999-2000	Španija	42
PCDD/F	olivno olje	0,12-0,38 pg WHO-TE /g	1999-2000	Španija	42
PCDD/F	maslo	0,27-0,65 pg I-TE /g maščobe	1999-2000	Španija	42
PCDD/F	piščanci	0,3-3,5 pg/g maščobe	1999-2000	Španija	42

OCDD	piščanci	2,7-179 pg/g maščobe	1999-2000	Španija	42
PCDD/F	svinjina	0,12-1,97 pg I-TE /g maščobe	1999-2000	Španija	42
PCDD/F	školjke	1,08-5,55 pg I-TE /g maščobe	1999-2000	Španija	42
2,3,7,8-TCDF	školjke	4,28-21,81 pg/g	1999-2000	Španija	42
PCDD/F	mleko	0,1-4,0 pg I-TE /g maščobe	1999	Poljska	43
PCDD/F	maslo	0,6-6,5 pg I-TE /g maščobe	1999	Poljska	43
PCDD/F	govedina	2,4-8,5 pg I-TE /g maščobe	1999	Poljska	43
PCDD/F	pečena govedina na odprtem ognju	20-25 pg I-TE /g maščobe	1999	Poljska	43
PCDD/F	perutnina	0,6-12,8 pg I-TE /g maščobe	1999	Poljska	43
PCDD/F	morske ribe (Baltik)	7,0-40,0 pg I-TE /g maščobe	1999	Poljska	43
PCDD/F	sladkovodne ribe	1,2-9,4 pg I-TE /g maščobe	1999	Poljska	43
PCDD/F	sardele	5,9 pg I-TE /g maščobe		Koreja	44
PCDD/F	piščanci	960 pg I-TE /g maščobe	1999	Belgija	7
PCDD/F	krma	780 pg I-TE /g maščobe	1999	Belgija	7
PCDD	Yusho olje	120 pg I-TE /g maščobe	1968/99	Japonska	31
PCDF	Yusho olje	470 pg I-TE /g maščobe	1968/99	Japonska	31

co-PCB	Yusho olje	17 pg/ I-TE g maščobe	1968/99	Japonska	31
PCDD/F	ribe	9,1-700 pg I-TE/g			

Nesreče

V določenih primerih lahko pride do povečane izpostavljenosti kot rezultat kontaminacije hrane zaradi neodgovornega ravnanja (Belgija, Japonska), zaradi industrijskih nesreč (Seveso) ali pa povišanih koncentracij na delovnem mestu.

Povečane koncentracije v živilih so navadno posledica kontaminacije živalske krme, kot je bil primer v ZDA, ko so piščancem dodajali v krmo z dioksini kontaminirano ilovico. Dobljene koncentracije so bile do 10 krat višje, kot je naravno ozadje.

Seveso – leta 1976 je prišlo do velike nesreče v Sevesu, Italija, kjer je zaradi pregrevanja posode z triklorofenolom in okvare varnostnega ventila prišlo do sproščanja mešanice kemikalij, vključno z zelo toksičnimi dioksini. Veliko ljudi, ki so prebivali v okolici, je imelo simptome akutne zastrupitve (klorove akne) in potrebna je bila trajna evakuacija najbolj kontaminiranega področja. Poginilo je veliko piščancev in zajcev, medtem ko človeških žrtev ni bilo. Ocenili so, da je bila lokalna populacija izpostavljena nekaj kg 2,3,7,8-TCDD .

Agent Orange - v vietnamski vojni je ZDA uporabljala defoliant, da bi onemogočila vietnamskim vojakom skrivanje v obširnih gozdovih južnega dela Vietnama. Agent Orange je 50%-50% mešanica herbicidov 2,4-D in 2,4,5-T, ki so jim dodali kerozin ali dieselsko gorivo ter jih razprševali zračno ali iz vozil. Ocenjujejo, da so tako uporabili okrog 72 milijonov litrov te mešanice, ki je bila, kot so ugotovili pozneje, močno kontaminirana s TCDD.

Belgijski primer onečiščenja z dioksini

Februarja in marca 1999 so belgijski kmetje opazili velik padec v proizvodnji jajc, slabo valjenje in povečano smrtnost pri piščancih. Vendar so šele aprila ugotovili, da je to posledica kontaminacije živalske krme s PCB (Arochlor 1254 in 1260) in posredno tudi z dibenzofurani. V zbiralnik odpadnega olja iz fritez je bila odvržena manjša količina (najverjetneje pod 50 L) transformatorskega olja, ki je vsebovalo PCB. Ker to olje dodajajo živalski krmi, je prišlo do kontaminacije dela prehrambene verige.

Zaradi potrebe po hitrih analizah in visoke cene analiz na dioksine so za oceno obsega kontaminacije živil, določali vsoto 7 "markirnih" izomer PCB (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180), pri čemer je bila maksimalna dovoljena koncentracija 200 µg/kg (EU). Ta meja je temeljila na naslednjem izračunu: varna vrednost za PCDD/F je 4 pg I-TE/g maščobe in relacija vsote 7 PCB proti dioksinom (izraženim kot I-TE) v piščančji maščobi je bila med belgijsko krizo 50000 ($4\text{ ng/kg} \times 50000 = 200\text{ ug/kg}$). V primeru koncentracij, ki so presegale to vrednost, je bila potrebna analiza na dioksine.

Najdene koncentracije so bile zelo visoke in sicer 780 pg I-TE/g v krmi in 960 pg I-TE/g v maščobi piščancev.

Yusho nesreča

Leta 1968 se je na Japonskem 1800 ljudi zastripilo z Yusho riževim oljem, ki je bilo močno kontaminirano s PCB in sledovi PCDF in PCDD. To olje so ponovno analizirali leta 1999 in dobili naslednje koncentracije: 0,59 µg/g PCDD in 8,8 µg/g PCDF ter 850 µg/g PCB, od tega 140 µg/g co-PCB. TE za PCDD, PCDF in co-PCB so bili 17, 470 in 120 ng/g, pri čemer je njihov relativni doprinos 3, 77 in 20%, kar pomeni, da glavni delež pri TE predstavljajo PCDF.

Normativi za poliklorirane dioksine in furane

Normativi za poliklorirane dioksine so zelo redko določeni in obstajajo samo določene smernice.

Tabela 1.5: nekateri normativi za dioksine

Normativ ali smernica	vrednost
TDI (Tolerable Daily Intake), WHO, 1998	zmanjšanje od 10 pg 2,3,78-TCDD/kg/dan na 1- 4 TE/kg telesne teže/dan
EU emisijska limita za sežigalnice	0,1 ng I-TE/m ³
WHO smernica	5 pg I-TE/g maščobe
EC smernica	2-3 pg WHO-TE/g maščobe
Avstrija, Nemčija, Švedska, Nizozemska	od <10 do < 10000 ng I-TE/kg s.s. glede na vrsto zemlje
EC predlog	0,5 ng I-TE/L za odpadne vode sežigalnic komunalnih odpadkov

2. ONESNAŽEVALA V OKOLJU

Prehrana predstavlja glavno pot vnosa obstojnih halogeniranih organskih spojin (POPs) v organizem človeka. Ob oceni možne nevarnosti izpostavljenosti dioksinov v humani prehrani je potrebno ovrednotiti tudi druge prispevke endogenih in eksogenih karcinogenov oziroma mutagenov. Ocena možne nevarnosti dioksinov predvideva, da je izpostavljenost tem spojinam ob koncentracijah ozadja današnjega okolja že na meji ali v bližini meje, ko spojine lahko povzročijo spremembe zdravja. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) je leta 1998 znižala dopustni dnevni vnos (TDI) s prehrano iz 10 pg 2,3,7,8-TCDD na kg telesne teže na dan na 1-4 pg/kg. Povprečna izpostavljenost prebivalstva v EU je pod vrednostmi 10 pg 2,3,7,8-TCDD na kg telesne teže na dan in še postopno upada. Uradni nadzor v Sloveniji se izvaja v obliki monitoringa kot redni nadzor v okviru letnega programa nadzora. Rezultati teh preiskav za leto 2005 so pokazali, da vsebnost onesnaževal v 1270 vzorcih živil ni presegala mejnih vrednosti opredeljenih s predpisi Republike Slovenije.

Zaskrbljujoče je dejstvo, da so v materinem mleku zaznali več kot 300 različnih antropogenih kemijskih onesnaževal. Zaskrbljenost je še toliko večja, ker je navidezno skoraj nemogoče določiti nevarnosti, ki jih spojine predstavljajo. Vzrok je v vse bolj kemiziranem okolju in neustreznem ravnanju s kemikalijami, ki nas obkrožajo. Kemijske spojine so se in se še vedno izpuščajo v okolje brez nadzora in uradnega testiranja na vplive, ki jih povzročajo v okolju in na zdravje ljudi. Kljub novi zakonodaji je še vedno približno 100.000 različnih spojin »sedanje dobe« za katere še ni bila določena nevarnost (risk assessment), ki jo predstavljajo. Seveda se takšno stanje odraža tudi na prehrani, ki jo zauživamo.

Prehrana predstavlja glavno pot vnosa obstojnih halogeniranih organskih spojin (POPs) v organizem človeka. K spojinam obstojnih organskih onesnaževal uvrščamo sledeče skupine spojin: klasične organoklorne pesticide, poliklorirane bifenile (PCB), poliklorirane dibenzo-p-

dioksine (PCDD) in poliklorirane dibenzofurane (PCDF), poliklorirane naftalene (PCN), polibromirane difeniletre (PBDE), poliklorirane alkane (PCA), polifluorirane organske spojine kot je na primer perfluoro oktanojska kislina (PFOA) in še številne druge »per«-halogenirane organske spojine.

Koncentracije teh spojin so zelo različne, velja pa, da so vsebnosti POPs višje v živilih z visoko vsebnostjo maščob. Na koncentracije vpliva splošno stanje onesnaženja okolja in za živali kot so npr. ribe ali divjačina, njihovo mesto na lestvici v prehranbeni verigi. Transport dioksinov v okolju je pogojen z njihovimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi kot so obstojnost, slaba topnost v vodi itd. Dioksini, ki pridejo v zrak, lahko v okolju potujejo na dolge razdalje in jih lahko najdemo po celem svetu. Iz zraka se lahko odlagajo na rastline, kjer jih zaužijejo živali. V vodnem okolju se zaradi zelo slabe topnosti vežejo na sediment in suspendirane delce in lahko potujejo naprej ali pa jih zaužijejo vodni organizmi. Pri živalih se dioksini akumulirajo v maščobnem tkivu in delno tudi v jetrih.

Iz raziskav je razvidno, da so koncentracije dioksinov v mleku in mlečnih proizvodih višje v bolj industrializiranih področjih, kjer je gostota točkovnih izvirov teh spojin višja. Čeprav so koncentracije in porazdelitev spojin glede na stopnjo kloriranja v živilih in humanem tkivu zelo različne, velja, da je oktakloro-p-dibenzodioksin (okta-CDD) prevladujoči predstavnik v večini vzorcev. Celokupne vrednosti dioksinov v maščevju ljudi v industrializiranih državah so v območju od 150 do 1500 pg/g maščobe, okta-CDD je prevladujoč predstavnik s približno 80% v vseh vzorcih. Z uporabo toksičnih ekvivalentnih faktorjev (TEF) je postalo razvidno, da so povprečni dnevni vnosi dioksinov iz vseh virov dnevne prehrane med 80 do 120 pg/na dan v Združenih državah, Nizozemski, Nemčiji. Te vrednosti so tipične tudi za druge industrializirane dežele. V ameriški EPA študiji o oceni možne nevarnosti dioksinov predvidevajo, da je izpostavljenost tem spojinam ob koncentracijah "ozadja" današnjega okolja že na meji ali v bližini meje, ko spojine lahko povzročijo spremembe zdravja. Iz študij mehanizma biološkega učinkovanja je poznano, da se TCDD direktno ne veže na DNA in ne povzroča mutacij, sproži

pa nastanek različnih tumorjev, predvsem zaradi spremenjenega hormonalnega ravnotežja, iz česar sledi, da naj bi se človekova izpostavljenost tem spojinam zmanjšala na najmanjšo možno mero. Ob oceni možne nevarnosti izpostavljenosti dioksinov v humani prehrani je potrebno ovrednotiti tudi druge prispevke endogenih in eksogenih karcinogenov oziroma mutagenov. Več različnih strukturnih vrst kemikalij je sposobnih vezave na receptor aromatskih spojin (Ah-receptor). Tako se poleg TCDD in drugih kloriranih aromatskih ogljikovodikov kot so npr. PCB vežejo na ta receptor še policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH), heterociklični aromatski amini, indol-3-karbinol in sorodne spojine. Razlike v njihovi strukturno odvisni vezavi na Ah-receptor in indukciji gena CYP1A1 v celici določajo njihovo nevarnost oziroma primerjavo na vezavo 2,3,7,8-tetrakloro dibenzo-p-dioksina.

Hormonom podobna vloga dioksinov, njihova lastnost, da vplivajo na endogene hormone kot so estradiol, glukokortikoidi, tiroksin, retinol, inzulin in na rastni faktor, je odprla novo področje o pomembnosti hormonom podobnih ksenobiotičnih kemikalij v okolju. Področje ne obsega le obstojnih kloriranih organskih spojin (POPs), h katerim prištevamo tudi dioksine, temveč vključuje tudi razgradljive spojine kot so na primer oktil- ali nonil-fenoli in druge spojine s poznanim estrogenim učinkovanjem. Precejšnje presenečenje v sedemdesetih letih je bilo odkritje, da so poliklorirani bifenili, ki bi morali biti le v zaprtih električnih in hidravličnih sistemih, razširjeni že skoraj po vseh morjih in s tem v ribah in morskih sesalcih. Nazadnje so sledila odkritja dioksinov v ribah, prehrani in humanem mleku. Kot svinec so postali sedaj poliklorirani bifenili in dioksini endemično razširjena skupina spojin v človekovem okolju. V letu 1984 so razširili definicijo dioksinov tako, da sedaj predstavlja izraz vrsto spojin s sorodnimi biološkimi lastnosti. Vpeljan je bil koncept toksičnih ekvivalentnih faktorjev (TEF) spojin. Faktorji podajajo strukturno odvisno biološko aktivnost spojin in iz nje izpeljano oceno nevarnosti spojin. Poleg PCDD in PCDF so sedaj vključeni tudi koplanarni ne-orto in mono-orto PCB.

Študije so pokazale, da ima izpostavljenost dioksinom številne neugodne posledice za zdravje, pri čemer so vplivi odvisni od številnih faktorjev: nivoja, pogostosti in časa trajanja izpostavljenosti. Človek preko 95% dioksinov dobi iz prehrane z živili živalskega izvora, pri čemer kot glavni vir prevladujejo meso in mesni izdelki, mlečni izdelki in ribe, kar bi lahko v največji meri pripisali poti: "zrak-trava-krava-človek". Manjši delež pa predstavlja izpostavljenost kontaminiranemu okolju t.j. vdihavanju zraka, kontaminiranega s sledovi dioksinov, adsorbiranih na delce ali nenamernim zaužitjem z zemljo kontaminirane hrane, česar pa na bolj kontaminiranih področjih ne smemo zanemariti. Raziskave so pokazale večjo obremenjenost vodnih in kopenskih organizmov.

Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) je leta 1998 znižala dopustni dnevni vnos (TDI) iz 10 pg 2,3,7,8-TCDD na kg telesne teže na dan na 1- 4 pg/kg. Ker je ta meja dokaj nizka in ker so dioksini prisotni v materinem mleku, so lahko dojenčki zaradi nizke teže izpostavljeni koncentracijam, ki so višje od te vrednosti. Povprečna izpostavljenost prebivalstva v EU je pod vrednostmi 10 pg 2,3,7,8-TCDD na kg telesne teže na dan in še postopno upada, vendar pa še ni podatkov, ali se bo to upadanje nadaljevalo, da bo dosežen tudi novi predlagani dovoljen dnevni vnos.

Program preiskav živil v prometu v Slovenji se v obliki načrtovanega programa izvaja od leta 2000 dalje. Program poteka v okviru Ministrstva za zdravje oz. Zdravstvenega inšpektorata RS (ZIRS). Program se izvaja na osnovi določb Zakona o zdravstveni inšpekciji (Ur. l. RS, št. 99/1999, 2/2004), Zakona o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili (Ur. l. RS, št. 52/2000, 42/2002 in 47/2004) oz.. Uredbe (ES) št. 178/2002 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih načel in o zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane, Uredbe (ES) št. 882/2004 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 29. aprila 2004 o izvajanju uradnega nadzora, da se zagotovi preverjanje skladnosti z zakonodajo o krmi in živilih ter s pravili o zdravstvenem varstvu živali in zaščiti živali (z vsemi spremembami), Uredbe (ES) št. 852/2004 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 29. aprila 2004 o higieni živil (z vsemi spremembami) in Uredbe (ES) št. 853/2004 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 29. aprila

2004 o posebni higienskih pravilih za živila živalskega izvora, uradni nadzor nad živili in izdelki ter snovmi, ki prihajajo v stik z živili (v nadaljnjem besedilu uradni nadzor).

PROGRAM MONITORINGA ŽIVIL V PROMETU V SLOVENIJI

Onesnaževalo je na splošno vsaka kemijska snov ali organizem, ki predstavlja, zaužita z živilom/hrano, tveganje za zdravje ljudi. Kemična onesnaževala, ki so zajeta v preskuse v okviru tega programa, so tiste snovi, ki so v živilih nenamensko prisotne in sicer kot posledica postopkov pridelave kmetijskih pridelkov in surovin živalskega izvora, oziroma proizvodnje in prometa živil ali kot posledica onesnaževanja okolja. Vsebnost onesnaževala v živilu mora biti tako nizka, kot jo je mogoče razumno doseči z uporabo dobre pridelovalne, predelovalne, proizvodne prakse in drugih praks v vseh fazah živilske verige. Program zajema tista najpomembnejša onesnaževala, ki lahko predstavljajo, zaužita z živili/hrano, tveganje za zdravje ljudi in so zanje opredeljeni tudi kriteriji glede sprejemljivih vsebnosti v posameznih živilih/hrani.

Drugi predpisi, ki so poleg že navedenih, podlaga za načrtovanje in izvajanje programa monitoringa, so še:

- Pravilnik o onesnaževalih v živilih (Ur. l. RS, št. (Ur.l. RS, št. 69/2003, 20/2004 in 17/2005) in predpisi EU, ki se nanašajo na onesnaževala (stanje do 07.10.2005);
- Pravilnik o živilih za posebne prehranske namene (Ur. l. RS, št. 46/2002, 117/2002 in 41/2004),
- Pravilnik o žitnih kašicah in živilih, namenjenih dojenčkom in malim otrokom (Ur. l. RS, št. 48/2002, 117/2002, 42/2003 in 20/2004),
- Pravilnik o sestavljeni prehrani za dojenčke (Ur. l. RS, št. 46/2002, 117/2002, 42/2003, 20/2004 in 32/2004).

Uradni nadzor obsega inšpekcijske preglede ter vzorčenje in laboratorijske preskuse vzorcev živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili.

Uradni nadzor se izvaja kot redni nadzor v okviru letnega programa nadzora ter kot poostreni nadzor. Namen letnega programa uradnega nadzora, ki obsega program inšpekcijskih pregledov ter program vzorčenja in laboratorijskih preskusov, je splošno preverjanje stanja skladnosti z obstoječim pravnim redom, kot tudi obravnavanje specifične aktualne problematike.

Del letnega programa, ki se nanaša na živila živalskega izvora, predstavlja dopolnitev osnovnega programa za živila živalskega izvora, za katerega je pristojno Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano - Veterinarska uprava RS, zajema pa izključno živila v prodaji na drobno, ne pa v ostalih delih živilske verige (proizvodnja, prodaja na debelo, uvoz).

Pri pripravi letnega programa vzorčenja in laboratorijskih preskusov je poleg določb predpisov, ki urejajo področje zdravstvene ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili, potrebno upoštevati tudi:

- rezultate predhodnih programov vzorčenj,
- epidemiološke podatke,
- podatke o problematiki, obravnavani v okviru hitrega sistema obveščanja za živila in krmo (RASFF),
- podatke o novih dejavnikih tveganja,
- priporočila Komisije EU za koordinirane programe.

Program slovenskega monitoringa vključuje kemična onesnaževala, vključena v programski sklop I. in organoklorne pesticide, tabela 2.2, vključene v programski sklop II. – pesticidi.

Tabela 2.1: Nabor parametrov- kemična onesnaževala, programski sklop I.

Dioksini in furani ter dioksinom podobni PCB	2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 1,2,3,7,8,9-HxCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD, 2,3,7,8-TCDF, 1,2,3,7,8-PeCDF, 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF, 1,2,3,7,8,9-HxCDF, 2,3,4,6,7,8-HxCDF, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF, 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF in dioksinom podobni PCB (77, 81, 126, 169, 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167, 189)
PCB	PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153

Tabela 2.2: Nabor parametrov, organoklorni pesticidi, programski sklop II.

aldrin/dieldrin	endosulfan (alfa, beta, endosulfan sulfat)	Heksaklorobenzen
alfa-HCH	Endrin	heptaklor/heptacklorepoksid
beta-HCH	gama-HCH	Nitrofen
DDT	Klordan	

Program vključuje vzorce otroške hrane (tabela 2.3), živila živalskega izvora (tabela 2.4), in druge vzorce (tabela 2.5).

Tabela 2.3: Vzorci otroške hrane

Živilo	Onesnaževala	Živilo	Onesnaževala
Začetna in nadaljevalna sestavljena hrana za dojenčke	PCB	Otroška hrana na osnovi žit za pripravo žitnih kašic	Dioksini in furani ter dioksinom podobnih PCB
	Dioksini in furani ter dioksinom podobni PCB		Organoklorni pesticidi
	Organoklorni pesticidi		
Otroška hrana, mešane kašice z dodatkom živil živalskega izvora (meso, mleko, sir, ribe)	PCB		
	Dioksini in furani in dioksinom podobni PCB		
	Organoklorni pesticidi		

Tabela 2.4: Vzorci živil živalskega izvora

Živilo	Onesnaževala	Živilo	Onesnaževala
Mleko	PCB	Siri	Dioksini in furani ter dioksinom podobnih PCB
	Organoklorni pesticidi	Surovo maslo	Dioksini in furani ter dioksinom podobnih PCB
	Dioksini in furani ter dioksinom podobnih PCB	Mleko v prahu	Dioksini in furani ter dioksinom podobnih PCB
Fermentirani mlečni izdelki	Organoklorni pesticidi	Meso-goveje, predpakirano	Dioksini in furani ter dioksinom podobnih PCB
Ribji izdelki – konzerve in zamrznjeni polgotovi izdelki	PCB	Gojene postrvi – izvor Slovenija	Dioksini in furani ter dioksinom podobnih PCB
	Organoklorni pesticidi	Ribe-lososi, ribje olje	Dioksini in furani ter dioksinom podobnih PCB

Tabela 2.5: Drugi vzorci

Sezamovo seme	Organoklorni pesticidi	Sončnično olje	Organoklorni pesticidi
Sladkor	Organoklorni pesticidi		

3. POLIKLORIRANI DIBENZO-P-DIOKSINI, FURANI, POLIKLORIRANI BIFENILI IN ORGANOKLORNI PESTICIDI V MAŠČOBNEM TKIVU

Kot primer predstavljamo raziskavo, ki vključuje določevanje obstojnih organskih onesnaževal v maščobnem tkivu rjavega medveda. Rjavi medved (*Ursus arctos*) je najbolj razširjena vrsta medveda na svetu. Populacija rjavega medveda v Sloveniji pa je ena redkih vitalnih populacij rjavega medveda v Evropi. Poliklorirani dibenzo-p-dioksini, furani (PCDD/Fs), poliklorirani bifenili (PCBs) in organoklorni pesticidi (OCPs) so visoko obstojne, toksične spojine človeškega izvora, ki so zaradi svojih fizikalno-kemijskih lastnosti razširjene daleč od virov uporabe in nastanka. Zaradi njihovih bioakumulativnih lastnosti sta človek in medved v vrhu prehranjevalne verige zelo izpostavljeni. Predstavljeni podatki so rezultat analiz obstojnih organskih spojin v 15-ih vzorcih podkožnega maščevja rjavega medveda v obdobju med 2004 in 2006. Kemijske analize so bile izvedene na plinskem kromatografu z uporabo detektorja na zajetje elektronov (ECD) in masnega spektrometra visoke ločljivosti. Rezultati analize ostankov 26 OCP so bili pod mejo določanja uporabljene metode ($0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ maščobe). Povprečna koncentracija PCDD/F v izbranih vzorcih je bila $0,57 \text{ pg TEQ/g}$ maščobe in $1,3 \text{ pg TEQ/g}$ maščobe za PCB. V raziskavi smo potrdili pričakovane razlike koncentracij PCDD/F in PCB med vzorci različnih spolov in med vzorci, ki so bili zajeti spomladi in jeseni. Koncentracije obstojnih organskih spojin v rjavem medvedu so nizke in primerljive z ostalimi vzorci živil živalskega izvora iz Slovenije.

Vsebnosti PCDD/Fs, PCBs in organoklornih pesticidov (OCPs) v polarnem medvedu (*Ursus maritimus*) so veliko bolj raziskane¹⁻⁴ kot vsebnosti teh spojin v rjavem medvedu (*Ursus*

arctos)⁵. Rezultati te študije so nadaljevanje preiskav o vsebnostih halogeniranih spojin obstojnih organskih onesnaževal (POPs) v maščobnem tkivu rjavega medveda v Sloveniji in hkrati predstavljajo orienatcijsko informacijo o koncentracijskih nivojih kontaminacije divjadi na področju Slovenije in centralne Evrope.

Izbira in priprava vzorcev:

Vzorci maščobnega tkiva so bili odvzeti 15-im osebkom populacije rjavega medveda na slovenskem področju. Vir vzorcev so tiste živali, ki so bile odvzete iz narave v okviru uradnega načrta upravljanja z visoko divjadjo na Slovenskem v letih 2004 in 2006. Vzorci zajemajo podkožno maščevje odvzeto s področja zadka živali. Vzorci maščevja so bili homogenizirani in do analize shranjeni v zmrzovalniku pri -20°C .

Ekstrakcija, čiščenje vzorca za analizo PCDD/Fs in PCB:

Uporabili smo akreditirano analizno metodo izotopskega redčenja, ki je v skladu s protokolom metode EPA 1613B. Za čiščenje osnovnega ekstrakta vzorcev smo uporabili postopek umiljenja maščob vzorca in izolacijo frakcije neumiljivega. Sledila je kolonska kromatografija na kombiniranem stolpcu silikagela, gelska izključitvena kromatografija in kot končna stopnja frakcioniranje spojin po planarnosti molekul na ogljikovi koloni polnila Carbopack C. Očiščen ekstrakt smo analizirali na instrumentalnem sklopu plinskega kromatografa HP 6890 GC (Hewlett Packard) povezanega z masnim spektrometrom visoke ločljivosti Finnigan MAT 95PL (Finnigan). Uporabili smo kolono JW-DB-5MS+DG ($60\text{m} \times 0,25\text{mm}$ I.D., $0,25\mu\text{m}$ debelina stacionarne faze). Analize smo izvedli ob pogojih elektronske ionizacije (EI) in tehnike dela izbranih ionov (SIM) ob minimalni ločljivosti masnega spektrometra 10.000 (ob 10% dolini). V to validirano metodo smo vključili analize referenčnih materialov, slepe poskuse (instrumentalni slepi poskus in slepi vzorec celotnega analitskega določevanja) in tudi "hišne" vzorce za kontrolo

kvalitete, z namenom zagotavljanja kvalitete analiz. Toksične ekvivalente (TE) smo izračunali in podali v skladu s priporočili WHO(1998)⁶.

Ekstrakcija, čiščenje vzorca za analizo OCPs:

Uporabili smo akreditirano analitsko metodo, ki je v skladu z EN 1528. Ekstrakcijo OCPs smo izvedli z DMSO po nanosu in porazdelitvi matrice na trdni fazi. Za čiščenje ekstrakta smo uporabili adsorpcijsko kolonsko kromatografijo. Mini Pasterjevo kolono smo napolnili z mešanico Celita in vzorca ter jo povezali z drugo kolono, ki je bila napolnjena s 5g 15% deaktiviranega Florisila. Za elucijo organoklornih pesticidov iz zgornje mini Pasteurjeve kolone smo uporabili DMSO. V zgornjem delu spodnje Florisil kolone je potekala ekstrakcija tekočeteke, ki mu je v spodnjem delu sledila adsorpcijska kromatografija. Pesticide smo eluirali s 75 mL mešanice topil heksan/ dietil eter (70:5). Za analizo smo uporabili plinski kromatograf HP 5890 II z dvokolonskim sistemom vezanim na dva detektorja na zajetje elektronov (ECD). Pri tem smo uporabili koloni različnih polarnosti, HP-5MS in DB-1701, s katerima smo zagotovili večjo stopnjo zaupanja pri identifikaciji spojin.

Velikost populacije rjavega medveda v Sloveniji je ocenjena⁷ na 500 do 700 medvedov področju velikem 5.300 km². S Strategijo upravljanja z rjavim medvedom (*Ursus arctos*) v Sloveniji⁸ in in njenimi podrejenimi aktom: z akcijskim načrtom upravljanja z rjavim medvedom (*Ursus Arctos* L.) v Republiki Sloveniji, ki predpisuje letno kvoto odvzema živali iz narave zaradi ohranjanja populacije in kvalitete so-bivanja rjavega medveda in človeka se je ponudila priložnost, da se zberejo vzorci tkiva rjavega medveda in da se izvedejo analize na vsebnosti PCDD/PCDF, PCB in OC pesticidov. V študijo smo vključili vzorce 15-ih živali različnih starosti in spola. Rezultati analiz ostankov obstojnih organoklornih pesticidov podajamo v Tabeli 3.1. Iz rezultatov je razvidno, da noben od 26-ih organoklornih pesticidov ne predstavlja kontaminacije slovenske

populacije rjavega medveda. Koncentracijski nivoji za vsakega od 26 organoklornih pesticidov so nižji od meje določljivosti: LOQ = < 0,01 mg kg⁻¹ maščobe.

Tabela 3.1: Koncentracije organoklornih pesticidov v maščevju rjavega medveda (*Ursus arctos*) v Sloveniji

Pesticid	Koncentracija (mg kg ⁻¹ maščobe)	Pesticid	Koncentracija (mg kg ⁻¹ maščobe)
HCB	<0,01	klordane-cis	<0,01
alfa-HCH	<0,01	klordane-trans	<0,01
beta-HCH	<0,01	o,p'-DDE	<0,01
gama-HCH (lindan)	<0,01	p,p'-DDE	<0,01
tecnazen	<0,01	o,p'-DDD	<0,01
quintozenk	<0,01	p,p'-DDD	<0,01
heptaklor	<0,01	o,p'-DDT	<0,01
heptaklor epoksid -cis	<0,01	p,p-DDT	<0,01
heptaklor epoksid-trans	<0,01	endosulfan I	<0,01
aldrin	<0,01	endosulfan II	<0,01
dieldrin	<0,01	o,p'-methoxychlor	<0,01
endrin	<0,01	p,p –methoxychlor	<0,01

isodrin	<0,01	mirex	<0,01
---------	-------	-------	-------

Povprečna koncentracija PCDD/Fs, ki smo jo določili v 15-ih vzorcih maščobnega tkiva rjavega medveda je 0,57 pg TEQ g⁻¹ maščobe. Če jo primerjamo z vrednostmi PCDD/Fs, ki so bile objavljene za maščobno tkivo severnega medveda (*U. maritimus*)¹⁻³, lahko sklepamo, da je obremenjenost rjavega medveda v Sloveniji s PCDD/Fs za faktor 10 do 100-krat nižja od severnega medveda. Tudi koncentracije PCBs so v primeru rjavega medveda znatno nižje od koncentracij, ki so jih izmerili pri severnem medvedu; povprečna koncentracija PCB je 1,3 pg TEQ g⁻¹ maščobo, kar je skoraj 10.000-krat nižje od običajnih vrednosti, ki jih objavljajo za severnega medveda. Vzrok za tako nizke koncentracije PCDD/Fs in PCBs v maščobnem tkivu rjavega medveda (*U. arctos*) so lahko različne onesnaženosti okolja in prehranjevalne navade obeh vrst; severni medved se namreč hrani pretežno z mesom, medtem ko zaužije rjavi medved (*U. arctos*) do 95% rastlinske hrane, odvisno od letnega časa in dostopnosti hrane na njegovem bivalnem območju⁹.

Tabela 3.2: Koncentracije PCDD/Fs (pg g⁻¹ maščobe), ne-orto in mono-orto PCBs (pg g⁻¹ maščobe) v 15-ih vzorcih maščobnega tkiva rjavega medveda (Ursus arctos) Sloveniji.

Koncentracija														
PCDD/Fs in PCBs														
(pg g ⁻¹ maščoba)	(samec,	(samica,	(samec,	(samica,	(samec,	(samica,	(samec,	(samica,	(samec,	(samica,	(samec,	(samica,	(samec,	(samica,
2,3,7,8-TCDD	0,11	<0,0	<0,0	0,06	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,05	<0,05
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1,2,3,7,8-PCDD	0,36	0,27	0,24	0,19	0,14	0,17	0,19	0,13	0,08	0,10	0,10	0,08	0,06	0,05
	0,15	0,12	0,15	0,06	0,16	0,09	0,10	0,11	<0,0	0,09	0,12	<0,05	<0,05	<0,05
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1,1	1,2	0,15	0,06	0,16	0,09	0,10	0,11	5					0,22
	1,1	1,2	0,55	0,46	0,37	0,43	0,40	0,25	0,18	0,23	0,16	0,12	0,12	0,09
1,2,3,6,7,8-HxCDD	1,1	1,2	0,55	0,46	0,37	0,43	0,40	0,25	0,18	0,23	0,16	0,12	0,12	0,09
	0,36	0,26	0,11	0,20	0,08	0,09	0,08	0,07	<0,0	<0,0	0,05	<0,05	<0,05	<0,05
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,36	0,26	0,11	0,20	0,08	0,09	0,08	0,07	<0,0	<0,0	0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1,8	8,0	1,4	0,88	1,0	1,0	0,90	1,30	0,50	0,48	0,48	0,49	0,44	0,40	0,23	1,3
OCDD	2,3	42	0,84	1,0	1,2	2,6	1,4	2,2	0,70	0,34	1,2	1,3	0,56	0,66	0,42	3,9
2,3,7,8-TCDF	0,30	<0,0	<0,0	0,06	0,06	0,09	<0,0	0,06	0,21	<0,0	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,05
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1,2,3,7,8-PCDF	0,08	<0,0	<0,0	0,09	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	0,07	<0,0	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2,3,4,7,8-PCDF	1,1	0,58	0,64	0,64	0,58	0,49	0,43	0,43	0,40	0,34	0,22	0,27	0,24	0,15	0,15	0,44
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,18	0,22	0,18	0,14	0,13	0,09	0,11	0,13	0,09	0,08	0,06	<0,05	0,06	0,06	<0,05	0,10
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,33	0,38	0,30	0,26	0,21	0,18	0,19	0,23	0,10	0,12	0,09	0,07	0,10	0,05	<0,05	0,17
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,39	0,41	0,27	0,20	0,17	0,16	0,12	0,13	<0,0	0,09	0,08	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,13
									5							
1,2,3,7,8,9-HxCDF	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,49	6,6	0,27	0,23	0,22	0,31	0,19	0,35	0,14	0,12	0,17	0,20	0,20	0,09	0,07	0,64
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	<0,0	0,20	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,0	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

[illegible]

ZM Zgornja meja, ^a (spol, teža, približna starost, čas)

Vzorci maščobnega tkiva rjavega medveda kažejo značilen vzorec porazdelitve PCDD/Fs in PCBs glede na spol živali in časovno obdobje odvzema vzorcev. Vrednosti PCDD/Fs v vzorcih samcev (8 vzorcev) so v povprečju za 1,6-krat večje od tistih pri samicah (7 vzorcev). Razlika je še bolj očitna pri PCB, kjer so koncentracije pri samcih v povprečju večje za 3,2-krat. Nižje vsebnosti PCDD/Fs pri samicah lahko razložimo kot posledico izgube teh spojin v spomladanskem obdobju laktacije. Razlike v vrednostih PCDD/Fs in PCBs lahko opazimo med vzorci odvzetimi v spomladanskem oziroma jesenskem času. V spomladanskih vzorcih, ki so bili odvzeti v obdobju od marca do maja, so vrednosti PCDD/Fs presegle vrednosti v jesenskih vzorcih za 2,3-krat. Podobno razliko smo opazili tudi, ko smo primerjali koncentracije PCBjev med vzorci (5 vzorcev) odvzetimi spomladi in jeseni. To je mogoče razložiti kot posledico pridobivanja podkožnega maščevja v jesenskem času, pri čemer se spojine, ki se nahajajo v maščevju »razredčijo«, sprotna akumulacija zaradi prehrane pa ni tako visoka.

Zaradi stalne prisotnosti PCDD/Fs in PCBs v okolju, lastnosti bioakumulacije in obstojnosti je njihova prisotnost tudi v podkožnem maščevju rjavega medveda neizogibna. Opravljena študija vrednotenja koncentracije PCDD/Fs, PCBs in OCPs v vzorcih podkožnega maščevja kaže, da je obremenjenost s temi spojinami pri slovenskem rjavem medvedu (*U. arctos*) precej manjša kot pri severnih medvedih (*U. maritimus*). Študija tudi pokaže, da ima na dobljene rezultate v primeru spojin v podkožnem maščevju velik vpliv izvor vzorca in časovni termin vzorčenja.

Literatura

- 1 A. Bernthof, Ø. Wiig, J.U. Skaare, *Environ Pollut* 1997, 95, 159.
- 2 K.S. Kumar, K. Kannan, S. Corsolini, T. Evans, J.P. Giesy, J. Nakanishi, S. Masunaga, *Environ Pollut* 2002, 51, 119.

- 3 J.U. Skaare, A. Berntoft, A. Derocher, G.W. Gabrielsen, A. Goksøyer, E. Henriksen, H.J. Larrsen, E. Lie, Ø. Wiig, *Toxicol Lett*, 2000; 103, 112-113.
- 4 M. Oehme, A. Biseth, M. Schalbach, Ø. Wiig, *Environ Pollut*, 1995, 90, 401.
- 5 Ž. Bolta, B. Križanec, E. Vončina, M. Jonožovič, *Organohalogen Comp* 2004, 66, 1794.
- 6 M. Van den Berg, L. Birnbaum, A.T.C. Bosveld, B. Brunstrom, P. Cook, M. Feeley, J.P. Giesy, A. Hanberg, R. Hasegawa, S.W. Kennedy, T.J. Kubiak, J.C. Larsen, F.X. Rolaf van Leeuwen, A.K.D. Liem, C. Nolt, P.E. Peterson, L. Poellinger, S. Safe, D. Schrenk, D. Tillitt, M. Tysklind, M. Younes, F. Waern, T. Zacharewski. *Environmental Health Perspectives* 1998, 775, 106.
- 7 *Expert opinion on big carnivore extraction from the nature for the year 2006*, Slovenia Forest Service (Ljubljana, Slovenia).
- 8 *The Management Strategy of the Brown Bear (Ursus arctos) in Slovenia*. Adopted by Slovene Government on Feb. 24th 2002, www.sigov.si/mkgp/slo/1_603_rjavi_medved.php.
- 9 K. Jerina, M. Debeljak, S. Džeroski, A. Kobler, M. Adamič. *Ecol Modelling* 2003, 453,170.
- 10 Ž. Bolta, E. Vončina, , Z. Cencič-Kodba, , B.Križanec, M. Jonožovič, Poliklorirani dibenzo-p-dioksini, furani, poliklorirani bifenili in organoklorni pesticidi v maščevju slovenskega rjavega medveda (Ursus arctos). *Slovenski kemijski dnevi 2006*.

4. ORGANSKE KOSITROVE SPOJINE: DOLOČEVANJE ORGANOKOSITROVIH SPOJIN V LASEH Z METODO GC/MS-MS

V poglavju predstavljamo določevanje organskih kositrovih spojin v lasih z metodo plinske kromatografije in masne spektrometrije. Organske kositrove spojine so se na široko uporabljale kot sredstva proti gnitju, kot biocidi, sredstva za zaščito lesa, kot PVC stabilizatorji in industrijski katalizatorji. Zaradi toksičnosti in biološke akumulacije se njihova uporaba omejuje. Dibutilkositer (DBT) in monobutilkositer (MTB) se še uporabljata v nekaterih industrijskih procesih. Številne študije poročajo o koncentracijskih nivojih organskih kositrovih spojin v različnih ekoloških vzorcih kot so vode, sedimenti ter v divjih živalih, ribah in pticah. Poznano je, da se tributilkositer (TBT) lahko akumulira preko prehrambene verige in ob podaljšani izpostavljenosti predstavlja nevarnost za človekovo zdravje. V skladu s temi spoznanji obstaja skrb pred razširjanjem onesnaževanja z organokovinskimi spojinami, malo pa je podatkov o vsebnostih kositrovih spojin v človeških lasih. Lasje kot biološki marker za izpostavljenost organizma organskim kositrovim spojinam pridejo v poštev šele ob zadostnih analitskih izkušnjah in ob dobro izvedenem validiranem analitskem postopku. Različni validirani biološki pokazatelji so potrebni za natančnejše določanje ocene nevarnosti izpostavljenosti organokositrovim spojinam.

Namen poglavja je predstaviti analitski postopek določevanja organskih kositrovih spojin v lasih, kot so mono-butil (MBT), di-butil (DBT) in tri-butil (TBT) kositrov kation. Validirani postopek vključuje ekstrakcijo las trdno-tekoče, pripravo etiliranih derivatov in njihovo ekstrakcijo, postopek čiščenja ekstrakta na stolpcu Florisila in analizo s plinsko kromatografijo povezano z masno spektrometrijo. Zaznava organokositrovih spojin v lasih nakazuje dolgotrajno izpostavljenost tem spojinam.

Organske spojine kositra se uporabljajo za številne namene. Trialkilirane spojine kositra so se množično uporabljale v barvah za ladje, ker preprečujejo rast alg, školjk in polžev na

trupu ladje. Uporabljale so se kot pesticidi in spojine za zaščito lesa. Dialkilne spojine so uporabne predvsem kot katalizatorji v različnih polimerizacijah. Monoalkilne spojine uporabljajo v steklarski industriji. Organokositrove spojine so lipofilne snovi, slabo topne v vodi in se zelo lahko adsorbirajo na trdne delce v vodnem okolju. Odlagajo se v sedimentih, kjer so dokaj obstojne. Lahko se akumulirajo v ribah in drugih organizmih. Zaradi škodljivega delovanja v vodnih ekoloških sistemih je njihova uporaba kot biocidi v premazih za ladje že omejena.¹(lit: EFSA2004) Prehrana je glavni izvor humane izpostavljenosti organskim kositrovim spojinam, kjer prednjačijo ribe in morska prehrana.²(lit: EFSA2004). Številne študije poročajo o razširjenosti organskih kositrovih spojin v okoljskih vzorcih kot so vode in sedimenti, v živalih kot so ptice, ribe ali morski sesalci. Kljub povečani skrbi pred razširjanjem onesnaženja, je vedenje o izpostavljenosti človeka z organskimi kositrovimi spojinami bolj šibko. Redke so humane študije, ki bi podajale porazdelitev kositra in kositrovih organskih spojin med organi, urinom, krvjo ali vsebnosti v laseh. Metode za določanje zvrsti anorganskega kositra (Sn) so razdelane, medtem ko pri določanju različnih zvrsti organskih oblik kositra analitski pristopi še niso dovolj raziskani. Razvijajo se predvsem sklopljene tehnike masne spektrometrije (MS) in induktivno sklopljene plazme (ICP-MS) s kromatografskimi tehnikami, ki zagotavljajo zadostno selektivnost in občutljivost.

Lasje lahko predstavljajo vzorec, ki odslikava stanje organizma z esencialnimi, neesencialnimi in potencialno toksičnimi elementi. V splošnem je ireverzibilna vgradnja elementov v rastoči las proporcionalna nivojem vsebnosti elementa v drugih telesnih tkivih. Malo je znanega glede korelacij porazdelitve vsebnosti organskih kositrovih spojin med krvjo, urinom ali lasmi. Verjetno gre to dejstvo na račun nelahkega, zahtevnega analitskega določevanja organskih oblik kositra.

Vsebnosti kositra (Sn) v laseh odražajo tudi okoljsko izpostavljenost. V odvisnosti od kemijske oblike je kositer potencialno toksičen element. Anorganski del kositra ima nizko toksičnost, medtem ko imajo organske oblike kositra pomembno toksičnost. Glavni vnos kositra in kositrovih organskih spojin v organizem je hrana. Drugi izvori so predvsem okoljski. Ob sintezi proteinov lasnega folikla se kositer in njegove organske oblike zelo verjetno trajno vgradijo v lase in tako predstavljajo časovni zapis metabolizma in okoljske

izpostavljenosti kositrovim spojinam. Iz analitskega stališča je matrica vzorca las manj problematična kot je zahtevnost določevanja organskih kositrovih spojin v krvi ali urinu. O uporabnosti vzorcev las za zasledovanje vsebnosti kositrovih spojin ima stroka tudi resne zadržke. Težko je namreč razlikovati med endogenimi in eksogenimi izvori izpostavljenosti spojinam kositra. Zunanji vplivi kot so pranje las, šamponi in geli, barvanje las in vpliv drugih kozmetičnih izdelkov so premalo raziskani. Na razpolago je premalo podatkov o privzemu in vezavi kositrovih spojin iz krvi v strukturo las, premalo je znanega o korelacijah med koncentracijami v lasih, krvi, urinu, jetrih ali drugih organih. Ne nazadnje so lahko nedorečene in pomanjkljive analitske metode in zagotavljanje kontrole in njihove kvalitete (QA/QC).

V poglavju je predstavljen postopek priprave vzorca in določevanja mono-butil, di-butil in tri-butil kositrovih spojin v humanih lasih (rezultati so podani v obliki kositrovega kationa) s plinsko kromatografijo v povezavi s tandemsko masno spektrometrijo.

Odvzem vzorcev las:

Vzorci las smo pridobili pri dveh frizerjih. Lasje so bili oprani s šamponom na običajen način in odvzeti po striženju las. Vzorce smo ločili v dve skupini glede na to ali so bili lasje obarvani ali ne. Neobarvani vzorci las predstavljajo kontrolno skupino las. Zbrali in analizirali smo 9 vzorcev obarvanih las in 17 neobarvanih las. Vzorce las, razen tega da so bili lasje oprani s šamponom, nismo pred analizo dodatno očistili ali kako drugače preprečevali vplive eksogene kontaminacije vzorcev. V lasih smo določevali vsebnost celokupnega kositra (Sn) in butilirane organske spojine kositra (MBT, DBT in TBT).

Priprava vzorca za določitev organokositrovih spojin:

Približno 2 g las smo narezali na dolžino 3-5 mm in jih v stekleno epruveto zatehtali 0,250 g. Kot ekstrakcijsko topilo smo dodali 10 mL koncentrirane led očetne kisline in kot interni standard 50 ng spojine tripropilkositra. Vzorec smo premešali, nato ekstrahirali 30 minut v ultrazvočni kopeli in ga nato še 24 ur pustili v temi pri sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje in prenos topila v 250 mL merilno bučko. Dodali smo destilirano vodo in 8 g trdnega natrijevega acetata (acetatna puferna mešanica pH 4,5). Zmešamo, dodamo 5 mL heksana za ekstrakcijo etiliranih derivatov in 0,5 mL 20% raztopine $\text{NaB}(\text{Et})_4$ v tetrahidrofuranu in ob intenzivnem stresanju na stresalniku pustimo, da reakcija poteka 30 minut. Heksansko plast odločimo in ekstrakcijo ponovimo s 5 mL heksana. Organski fazi združimo, jo posušimo in na stolpcu Florisila odstranimo moteče vplive matrice vzorca las. Sledi koncentriranje očiščene frakcije z rotacijskim uparjalnikom in pod blagim tokom dušika na končni volumen 75 μL od katerega injiciramo 2 μL v GC/MS. Meritve smo izvedli na instrumentalnem sklopu Finnigan MAT GCQ, masnem spektrometru na ionsko past in Finnigan GC plinskem kromatografu. Uporabili smo kromatografsko kolono DB-5MS (30m, 0,25 mm I:D., 0,25 μm stac.faza, J&W Scientific).

Priprava vzorca za določitev skupnega kositra (Sn):

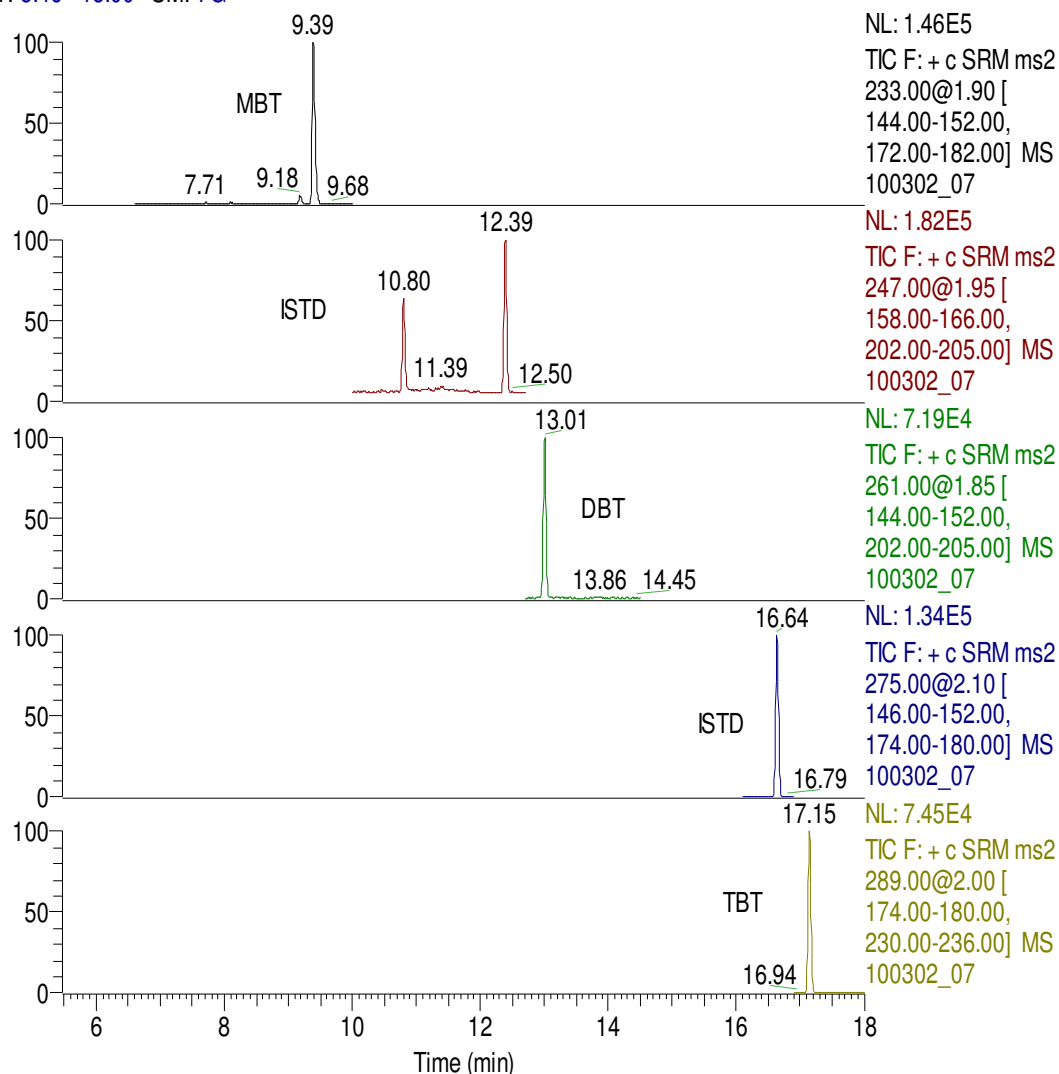
Določitev skupnega anorganskega kositra smo izvedli z instrumentalnim sklopom ICP-MS Perkin Elmer DRC – e. Za razklop 0,5 g las smo uporabili zaprti mikrovalovni sistem Milestone v teflonu z mešanico HNO_3 : HCl : H_2O_2 .

Za določevanje organokositrovih spojin (DIN EN ISO 17353) smo uporabili mešanice LGC standardnih spojin MIX 8 za analite in MIX 4 za spojine internih standardov s koncentracijo kositrovega kationa $c = 1000 \mu\text{g/mL}$ v metanolu. Primarne raztopine smo hranili v temi pri -20°C , sekundarne razredčitve standardov v metanolu pa v hladilniku pri $2 - 4^\circ\text{C}$. Končno razredčene delovne standardne raztopine smo pripravljali sveže pred uporabo. Natrijev tetraetilborat, (Sigma-Aldrich, $\text{NaB}(\text{Et})_4$, 98%): pripravili smo 20%

raztopino $\text{NaB}(\text{Et})_4$ v sveže destiliranem in sušenem tetrahidrofuranu (THF). Vse ostale kemikalije in topila so bile ustrezne analitske čistosti ali boljše. Stekleni pribor je bil opran v raztopini dušikove(V) kisline in splahnjen z deionizirano vodo.

V literaturi je zaenkrat premalo podatkov o določanju organokositrovih spojin v humanih laseh. Referenčnega materiala za določanje organokositrovih spojin v laseh ni na voljo, prav tako pa ni izdelanega validiranega analitskega postopka, ki bi vključeval določanje vsebnosti ozadja organokositrovih spojin v »slepih«, kontrolnih vzorcih las in ki bi ovrednotil merilno negotovost in s tem zanesljivost rezultatov. Kot potenciani največji izvor možnih napak je stopnja priprave vzorca. Lasje kor trdna matrica s povsem specifično sestavo predstavljajo navadno problem pri ekstrakciji s topilom. Narava izbranega ekstrakcijskega topila, možno dodani kompleksanti organokovinskega kationa ali agresivni pogoji kot je močna alkalna hidroliza las, močno vplivajo na uspeh analize. Pogoj za sprejemljivost analitskih rezultatov vključuje ustrezno razdelan program kontrole kvalitete analiz (QC).

RT: 5.46 - 18.00 SM: 7G



Slika 4.1: Prikazan je MS/MS kromatogram izbranih hčerinskih ionov za kositrove spojine monobutil (MBT), dibutil (DBT), tributil (TBT) in spojine internih standardov v ekstraktu vzorca las. Širina masnega okna 6 Da zadošča za identifikacijo izotopske sestave organokositrovega fragmenta. Vpliv spojin matrice las na kromatografsko ločevanje in MS/MS določevanje je majhen v primerjavi z ostalimi biološkimi vzorci.

Tabela 4.1: Vsebnosti organskih kositrovih spojin: monobutil, dibutil in tributil kositrovega kationa in celokupnega anorganskega kositra (Sn) v 17 vzorcih naravnih in 9 obarvanih vzorcih las.

vzorec	MBT [ng/g]	DBT [ng/g]	TBT [ng/g]	Sn [ng/g]
naravni las 1	35,0	36,0	4,7	380
naravni las 2	86,8	49,6	4,9	1160
naravni las 3	16,1	7,0	11,6	190
naravni las 4	44,2	42,5	3,4	360
naravni las 5	13,3	53,0	10,4	280
naravni las 6	25,6	35,9	11,3	160
naravni las 7	24,5	41,2	0,5	240
naravni las 8	28,4	13,5	0,6	220
naravni las 9	48,5	51,4	2,8	330
naravni las 10	9,5	7,2	1,1	280
naravni las 11	22,6	21,8	2,9	82
naravni las 12	17,0	59,8	1,8	140
naravni las 13	189,4	11,5	1,5	280
naravni las 14	16,7	28,0	8,8	480
naravni las 15	70,1	72,0	9,1	500
naravni las 16	205,5	31,1	14,0	850

naravni las 17	36,4	56,1	10,0	78
povprečje	52,3	36,3	5,8	341
mediana	28,4	36,0	4,7	280

obarvan las 1	122,2	8,4	5,7	360
obarvan las 2	73,3	13,4	6,2	530
obarvan las 3	197,8	19,6	13,0	570
obarvan las 4	171,1	8,9	17,5	6200
obarvan las 5	110,5	11,2	10,9	260
obarvan las 6	348,5	37,4	8,8	1400
obarvan las 7	95,1	11,3	10,8	380
obarvan las 8	133,6	5,5	5,8	240
obarvan las 9	133,6	7,2	7,4	500
povprečje	154,0	13,7	9,6	1160
mediana	133,6	11,2	8,8	500

Iz rezultatov v tabeli 4.1 je razvidno, da vsi analizirani vzorci las vsebujejo butilkositrove spojine in to ne glede, ali so lasje naravni ali pa obarvani. Ker nismo uspeli pridobiti vzorca las, ki ne bi vseboval organokositrovih spojin, smo slepe vzorce pripravili brez dodane matrice. Za umeritvene krivulje smo pripravili niz petih kalibracijskih standardnih raztopin, enakomerno porazdeljenih po celotnem območju, tako da pokrivajo koncentracijsko območje med 5 ng do 25 ng na zatehto vzorca 0,250 g in ob dodatku 50 ng spojine tripropilkositra kot internega standarda.

Lasje so vsebovali največ monobutilkositra, ki mu sledi dibutilkositer in nato tributilkositer. Verjetneje je, da takšno specifično akumulacijo butilnih derivatov, lahko bolj pripišemo sposobnosti vezave na proteine las kot pa da je vzrok lipofilnost organokositrovih spojin. Vsebnost organokositrovih spojin v obarvanih vzorcih las so v povprečju 3 do 4 krat višje kot v vzorcih neobarvanih naravnih las.

Pregled literature o vsebnostih celokupnega anorganskega kositra (S_n) v lasih normalne populacije iz neonesnaženih področij pokaže kot »normalno« sprejemljivo vrednost, da je kositra v lasih manj kot $< 0,3$ mg/kg. Naši rezultati pokažejo za vzorce naravnih las vrednost $S_n = 0,28$ mg/kg in za obarvane vzorce las vrednost $S_n = 0,5$ mg/kg. Referenčnih vrednosti za vsebnosti kositra v lasih za Slovenijo nimamo. Analize onesnaževal, kot so organske kositrove spojine v lasih in določitve celokupnega anorganskega kositra v lasih so verjetno dovolj primerne za zasledovanje obremenitve populacije s temi toksičnimi spojinami.

V poglavju je predstavljen analitski postopek določevanja organskih kositrovih spojin v lasih, kot so mono-butil (MBT), di-butil (DBT) in tri-butil (TBT) kositrov kation. Validirani postopek vključuje ekstrakcijo las trdno-tekoče s koncentrirano očetno kislino, ki ji sledi priprava etiliranih derivatov, njihova ekstrakcija, postopek čiščenja ekstrakta na stolpcu Florisila in analiza s plinsko kromatografijo ob masnospektrometrični MS/MS zaznavi. Določili smo vsebnosti organskih kositrovih spojin: monobutil, dibutil in tributil kositrovega kationa in celokupnega anorganskega kositra (S_n) v 17 vzorcih naravnih in 9 obarvanih vzorcih las. Presenetljiv rezultat naše študije je, da so vsi vzorci las vsebovali organske kositrove spojine. Največ smo zaznali monobutilkositra. Vsebnosti kositrovih spojin in anorganskega kositra (S_n) so v lasih, ki so bili obarvani 3 do 4 krat višje kot v vzorcih naravnih las. Zaznava organokositrovih spojin v lasih nakazuje dolgotrajno izpostavljenost tem spojinam.

Literatura

1.EFSA (2004) Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission to assess the health risks to consumers associated with exposure to organotins in foodstuffs (Question N° EFSA-Q-2003-110) Adopted on 22 September 2004.

2. E.vončina, B.križanec, P.rep, Določevanje organokositrovih spojin v lasih z metodo GC/MS-MS = Determination of organotin compounds in hair using GC/MS-MS. V: *Slovenski kemijski dnevi 2010, Maribor, 23. in 24. september 2010*

5. SISTEMSKI PESTICIDI IN POMORI ČEBEL

Sistemiški pesticidi prehajajo iz obdelanega semena v rastlino od korenin do listov in v njej krožijo dalj časa. So obstojne spojine in bolj učinkoviti kot prejšnji pesticidi v zaščiti semena in rastlin pred boleznimi ali škodljivimi insekti, ki bodisi nagrizzajo rastlino ali sesajo njihov sok. Tkiva, ki prenašajo vodo in hranilne spojine po rastlini, prenašajo tudi te sistemske pesticide. Učinkovitost sistemikov s časom pada, saj se z rastjo rastline spojine razredčujejo in tudi razgrajujejo. S sistemskimi pesticidi zaščiteni semena koruze se sejejo direktno v zemljo, tako da je raznašanje aktivnih snovi pesticidov z vetrom zelo majhno. Ko seme vzkali, se sistemiški pesticidi s ksilemskim in floemskim transportom porazdelijo po mladi rastlini. S potekom gutacije se iz hidatoidnih por izločajo drobne kapljice ksilemske tekočine. Sistemiški pesticidi in njihovi razkrojni produkti pridejo na tak način na površje listov koruze. Gutacijska tekočina vsebuje raztopljene minerale in organske spojine kot so amino kisline, sladkorji, terpeni, ogljikovodiki, fitosteroli, vitamini. Gutacijska tekočina je za čebele glede na sestavo spojin izvor potrebne vode in hranil. Na tak način pridejo čebele v kontakt s strupenimi pesticidi.

Z GC/MS smo analizirali s sistemskimi pesticidi obdelano seme koruze. Na seme koruze (*Zea mays* L.) hibrida PR38A24 so za zaščito nanесли aktivne snovi sistemaškega fungicida metalaksila in nesistemaškega fungicida fludioksonila, nesistemaškega insekticida in moluscida metiokarba in sistemaškega neonikotinoidnega insekticida klotianidina. V laboratorijsko izvedenem rastnem poiskusu in vzorcih, odvzetih na polju, smo preiskali gutacijsko tekočino mlade koruze na sestavo aktivnih spojin in njihovih rastlinskih metabolnih in fotolitskih produktov. Posneli smo njihove masne spektre in poiskusili določiti njihovo identiteto. Na sončni svetlobi smo izvedli tudi fotolitski razkroj vodne raztopine klotianidina in z GC/MS ugotavljali glavne razkrojne produkte. Iz preiskav ugotavljamo, da aktivna spojina nesistemaškega fungicida fludioksonila iz semena koruze ne prehaja, sistemiški fungicid metalaksil pa prehaja v gutacijsko tekočino. Njunih metabolitov z GC/MS nismo zaznali. Osnovno aktivno spojino nesistemaškega pesticida

metiokarba smo zaznali le v ekstraktu semena koruze in ne v gutacijski tekočini. Zaznali pa smo njegove metabolite razgradnje v rastlini. Spojina metiokarb preide v svoj sulfoksidni in sulfonski analog. Zaznamo razgradno spojino metiokarb anizola in ponovno tudi spojini sulfoksidnega in sulfonskega analoga metiokarb anizola. Klotianidina kot systemskega neonikotinskega insekticida z GC/MS analitskim pristopom nismo mogli zaznati (spojina je določljiva z LC/MS). V gutacijski tekočini zaznamo spojino rastlinskega metabolizma in na sončni svetlobi fotolitskega produkta N-(2-klorotiazol-5-ilmetil)-N'-metilsečnino. Osnovni metabolit spremljata z zelo verjetno masno spektrometrično identifikacijo še spojini N-(2-klorotiazol-5-ilmetil) ester izocianatne kisline in klorometil-tiocianat. Zadnji spojini nista vodeni kot »relevantna« metabolita klotianidina. Seveda je nevarnost za čebele odvisna od zauživanja gutacijske tekočine kot izvora vode in hranil. Ob prehajanju tako pestre sestave pesticidov in njihovih razgradnih produktov v gutacijsko tekočino je pomembno poznati njihovo medsebojno sinergistično učinkovanje pri subletalnih kroničnih koncentracijah spojin.

Neonikotinski insekticidi kot predstavniki pesticidov s sistemskim delovanjem so zelo učinkoviti. Na živčni sistem insektov delujejo zelo toksično. Z njihovo uporabo pa so mnogokrat prizadeti tudi ne-ciljni organizmi kot so čebele ali drugi opraševalci rastlin. V odvisnosti od načinov uporabe neonikotinoidnih insekticidov obstajajo različne poti izpostavljenosti čebel s temi spojinami. Čebele pridejo direktno v stik z neonikotinoidi, če so popršeni cvetovi na kmetijskih ali sadjarskih površinah, ali s kontaminacijo okolja s prašnimi delci, ki jih odnaša veter od mesta uporabe insekticidov. Neonikotinoidi, ki so jih uporabili v obdelanem semenu, se po vzkalitvi semena predstavljajo tudi v celotno rastlino in tako čebele lahko pridejo z njimi v kontakt ob nabiranju cvetnega prahu, medicine ali tudi gutacijske tekočine (Slika 5.1). Gutacija poteka večinoma v zgodnjih jutranjih urah, ko je še visoka vlažnost zraka in zemljine. Pojava ne smemo zamenjevati s pojavom jutranje rose. S potekom gutacije se iz hidatodnih por izločajo drobne kapljice ksilemske tekočine. Systemski pesticidi in njihovi razkrojni produkti pridejo na tak način na površje listov koruze. Gutacijska tekočina vsebuje raztopljene minerale in organske spojine kot so amino kisline, sladkorji, terpeni, ogljikovodiki, fitosteroli, vitamini. Gutacijska tekočina je glede

na sestavo spojin za čebele izvor potrebne vode in hranil. Na tak način pridejo čebele v kontakt s strupenimi pesticidi¹.



Slika 5.1: Na listih mlade koruze se pojavijo številne kapljice gutacijske tekočine, ki vsebuje ob spojinah kot so amino kisline, različni sladkorji in maščobne kisline, tudi za čebele strupene aktivne spojine sistemskih pesticidov in njihovih razgradnih produktov, če je bilo z njimi obdelano seme koruze.

Gojenje koruze in odvzem gutacijske tekočine:

Za eksperimentalno delo smo uporabili trgovsko dosegljivo certificirano seme hibrida koruze PR38A24, ki je bilo obdelano s sledečimi aktivnimi snovmi: fluodioksonil, metalaksil, metiokarb in klotianidin. Gojenje koruze (*Zea mays* L.) hibrida PR38A24 iz

semena, ki je bil obdelan z mešanico pesticidov, smo izvedli v laboratorijskih pogojih v mesecu maju pri sobni temperaturi 18 do 24°C ob relativni vlažnosti od 35 % do 65 % in dnevno–nočnih svetlobnih pogojih. Zalivali smo jih ročno enkrat na dan. Gutacijsko tekočino smo začeli zbirati s pomočjo mikro pipete že četrty dan, ko so bile rastlinice že visoke 4-5 cm. V nekaj dneh smo nabrali dovolj gutacijske tekočine za GC-MS analizo in poiskus z živimi čebelami. Poiskuse smo razširili in odvzemali gutacijsko tekočino tudi ob realnih razmerah na večji njivi koruze (Gorišnica na Ptujskem polju), posejane z obdelanim semenom hibrida PR38A24.

Kontaktni poiskus s čebelami:

Izvedli smo tudi poiskus s čebelami. Na trup posamezne čebele smo nanegli 25 µL gutacijske tekočine mlade koruze, vzkaljene iz semena hibrida PR38A24, obdelanega s pesticidi in opazovali čas preživetja čebel.

Fotoliza vodne raztopine klotianidina:

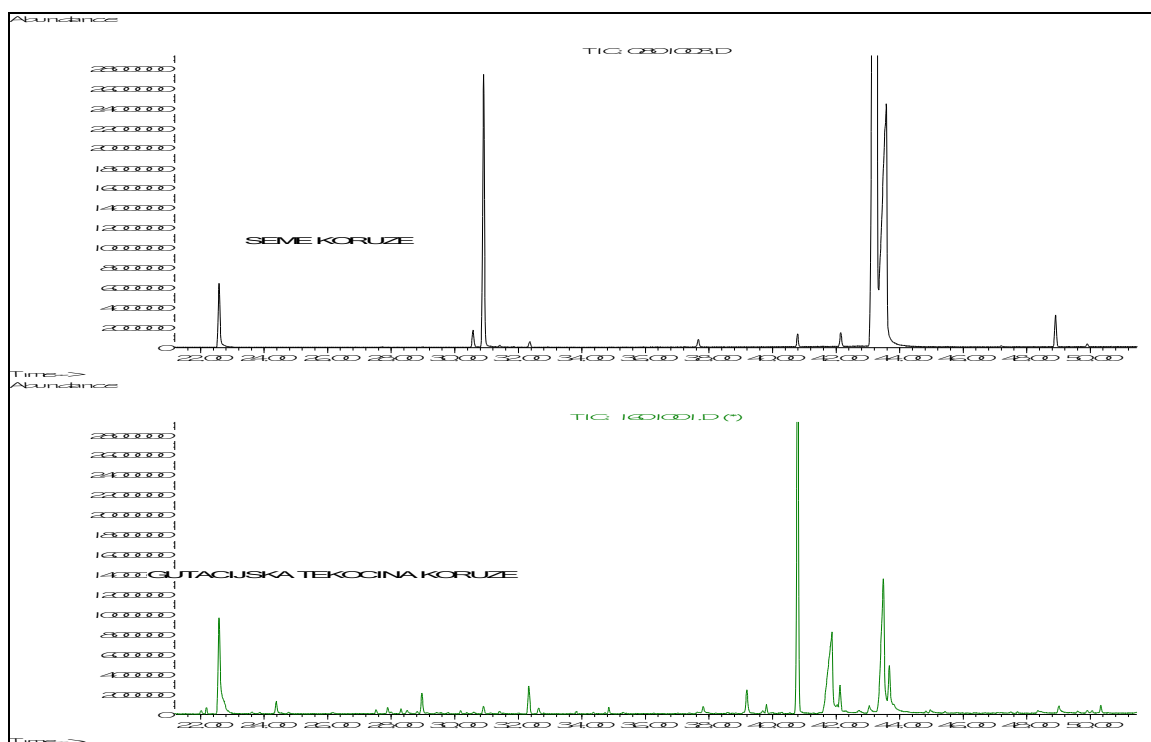
Na sončni svetlobi smo ob sočasnih laboratorijskih poiskusih gojenja koruze izvedli tudi fotolitski razkroj nasičene vodne raztopine standardne spojine klotianidina. Raztopino klotianidina smo v času enega tedna dnevno izpostavljali sončni svetlobi. V ekstraktu sušine smo z GC/MS določevali razkrojne produkte.

Instrumentalno delo:

Vzorci semena in gutacijske tekočine smo ekstrahirali z diklorometanom ter ekstrakte analizirali s plinsko kromatografijo v povezavi z masno spektrometrijo (GC/MS). Pripravili smo tudi sililirane derivate spojin gutacijske tekočine koruze. Pri eksperimentih smo uporabili masni spektrometer Agilent, 5973, povezan s plinskim kromatografom Agilent, 6890. Za kromatografsko ločevanje smo uporabili kapilarno kolono ZB-5 MS dimenzije 30 m z notranjim premerom 0,25 mm in debelino filma stacionarne faze 0,25 μ m (Zebron, Phenomemex). Uporabili smo tehniko snemanja celotnega masnega spektra (SCAN). Kromatograme smo obdelali z računalniškim programom AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution And Identification System Software). Masne spektre zaznanih spojin smo primerjali s spektri iz standardne knjižnice masnih spektrov NIST ter dodatno še s knjižnico masnih spektrov Willey, ali pa podajamo lastno interpretacijo masnega spektra.

Pesticidne spojine obdelanega semena koruze:

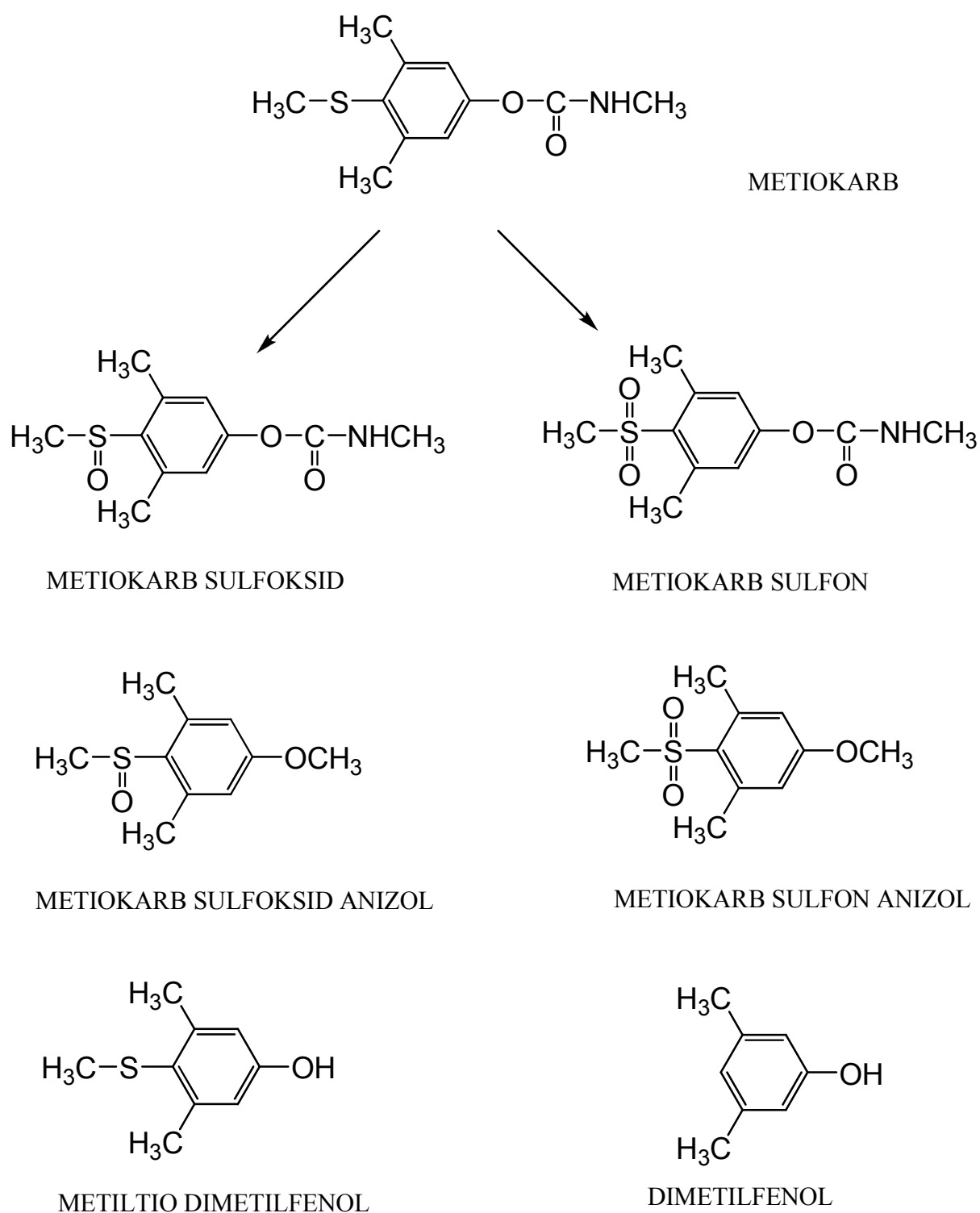
Deklaracija s pesticidi obdelanega semena koruze hibrida PR38A24 navaja sledeče aktivne spojine pesticidov: klotianidin, metiokarb, metalaksil in fluoksinil. Razen osnovne spojine klotianidina zaznamo z analitskim sklopom GC/MS vse ostale aktivne snovi s pesticidi obdelanega semena koruze in to metiokarb, metalaksil in fludioksonil. Zaznamo več razgradnih produktov, kot je »foto« razgradnja klotianidina, to je spojina klorotiazolil-metil sečnina in razgradne spojine metiokarba (Slika 5.2).



Slika 5.2: Zgornji kromatogram prikazuje spojine pesticidov ekstrakta obdelanega semena koruze, spodnji pa ekstrakt gutacijske tekočine mlade koruze, ki vsebuje pesticide iz obdelanega semena in njihove rastlinske razgradne produkte.

Metiokarb:

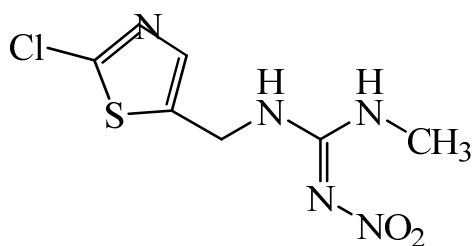
Metiokarb je karbamatni pesticid z visoko toksičnostjo. Voden je kot ne-sistemski pesticid in kot drugi karbamatni pesticidi deluje z delovanjem na encime živčnega sistema organizmov. Metabolizem metiokarba v rastlinah in živalih poteka s cepitvijo karbamatnega estra in oksidacije do sulfoksida in sulfona. Tak metabolni potek se potrjuje tudi v primeru prehoda pesticida iz semena koruze v gutacijsko tekočino mlade rastline koruze. V gutacijski tekočini zaznamo spojine oksidativnega prehoda metiokarba v sulfoksidni in sulfonski analog, ki pa se sedaj obnašata kot sistemska pesticida, praktično pa ne zaznamo osnovne aktivne spojine metiokarba. Nadaljna razgradnja vodi do fenolnih, kot tudi anizolnih spojin. Toksičnost metiokarb sulfoksida in metiokarb sulfona ni bistveno različna od metiokarba. Metiokarb je akutno toksičen za čebele, bodisi s kontaktom ali pa pri oralni izpostavljenosti.



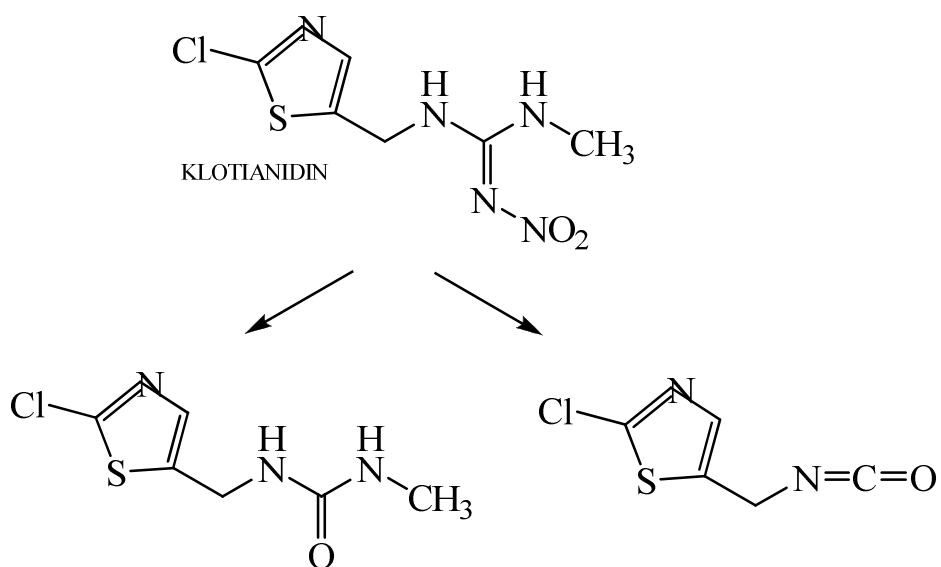
Slika 5.3: Prikazane so v gutacijski tekočini zaznane spojine metabolizma metiokarba v mladi rastlini koruze.

Klotianidin:

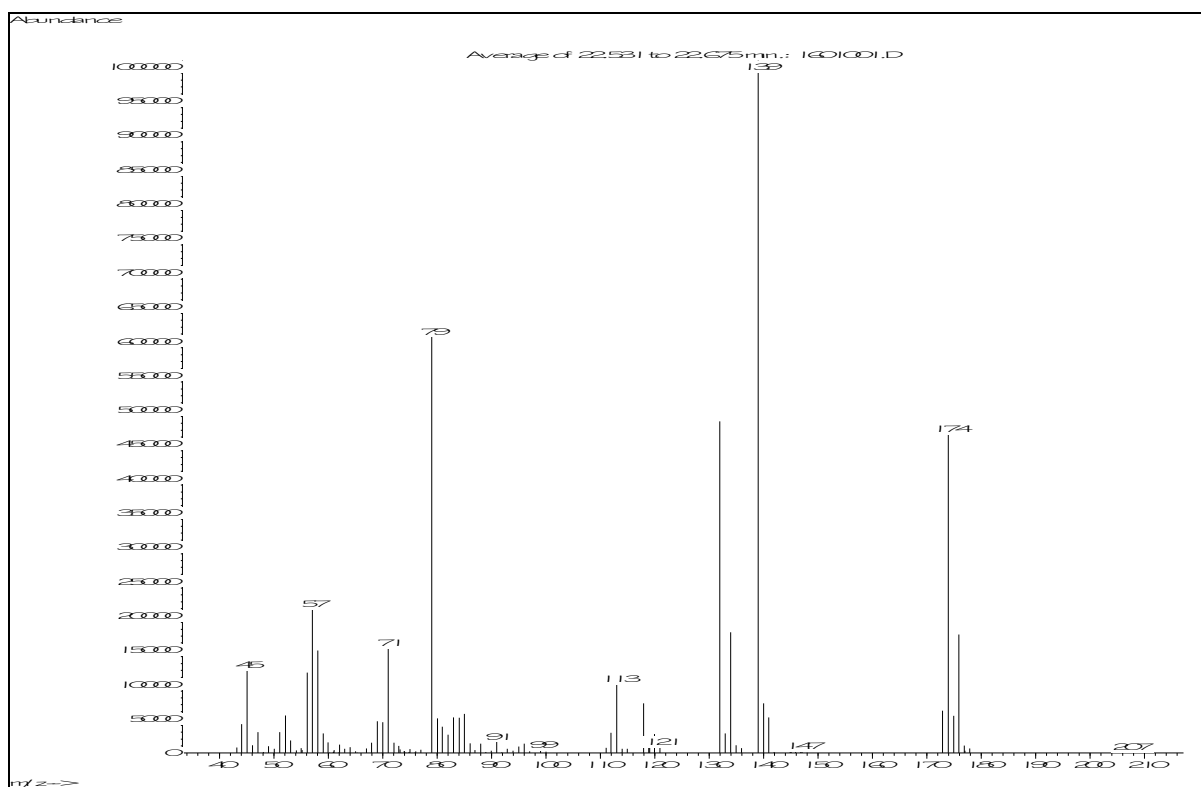
Klotianidin je insekticid, ki ga uvrščamo med skupino neonikotinoidnih pesticidov s sistemskim delovanjem. Neonikotinoidi delujejo na centralni živčni sistem insektov. Za sesalce so manj toksični. Neonikotinoidni insekticidi so najpogosteje uporabljana skupina pesticidov. Zaradi številnih pomorov čebel jih nekatere države že opuščajo. Za spojino klotianidin velja, da je zelo obstojna spojina in v okolju zelo mobilna. V vodi skoraj ne hidrolizira, je dovolj vodotopna, da se izpira v talne in površinske vode. Kemijsko je spojina 1-(2-klor-1,3-tiazol-5-ilmetil)-3-metil-2-nitroguanidin (CAS: 210880-92-5).



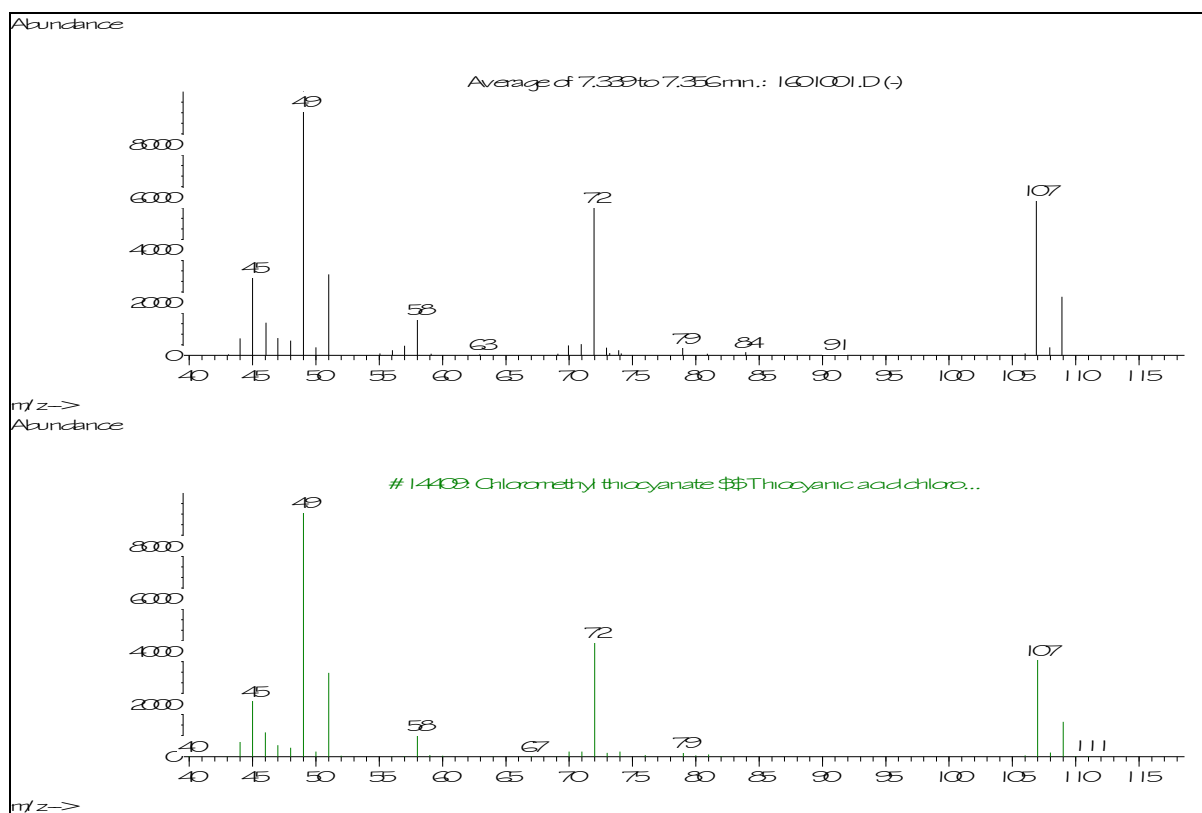
Uporablja se tudi za sistemsko zaščito semen. Gutacijska tekočina lahko vsebuje visoke koncentracije klotianidina, od 25 µg/L do 39000 µg/L. Z rastjo mlade kornice se koncentracije zmanjšujejo, osnovna aktivna spojina pa se v rastlini tudi metabolizira. Z analitskim pristopom GC/MS v gutacijski tekočini osnovne spojine klotianidina nismo mogli zaznati, zaznali pa smo spojino rastlinskega metabolizma in na sončni svetlobi tudi fotolitskega produkta N-(2-klorotiazol-5-ilmetil)-N'-metilsečnino (Slika 5.4). Kljub temu so koncentracije klotianidina dovolj visoke, da obstaja nevarnost za čebele še več tednov po uporabi neonikotinoidnih insekticidov. Oralna letalna doza klotianidina je od 4 do 5 ng/čebelo³. Od ostalih spojin, ki jih po izvoru pripisujemo razgradnji klotianidina, smo zaznali še spojini N-(2-klorotiazol-5-ilmetil) ester izocianatne kisline (Slika 5.5) in klorometil-tiocianat (Slika 5.6).



Slika 5.4: V gutacijski tekočini koruze zaznane spojine metabolizma klotianidina.



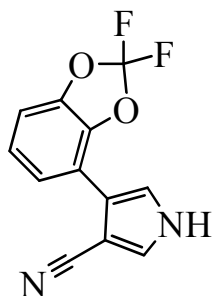
Slika 5.5: Masni spekter N-(2-klorotiazol-5-ilmetil) ester izocianatne kisline



Slika 5.6: Masni spekter klorometil-tiocianata

Fludioksonil:

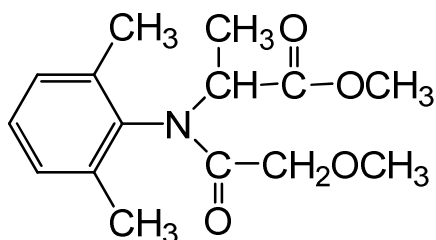
Fludioksonil je fenilpirolni fungicid s širokim delovanjem proti številnim boleznim, ki se razširjajo po zraku, s semenom ali zemljino. Spojina naj bi inhibirala transport povezan s fosforilacijo glukoze in na ta način preprečevala rast micelija. Spojina je kemijsko 4-(2,2-difloro-1,3-benzodioksol-4-il)pirol-3-karbonitril (CAS: 131341-86-1).



Fludioksonil je malo toksičen za ptice, čebele in deževnike, močno toksičen pa za ribe, vodne organizme in alge. Pri rastnih poiskih in pri realnih vzorcih z njive koruze je razvidno, da spojina po vzkalitvi koruznega semena ne prehaja v gutacijsko tekočino. Z analitskim pristopom GC/MS tudi nismo zaznali drugih razgradnih spojin, ki bi jih lahko pripisali fludioksonilu.

Metalaksil:

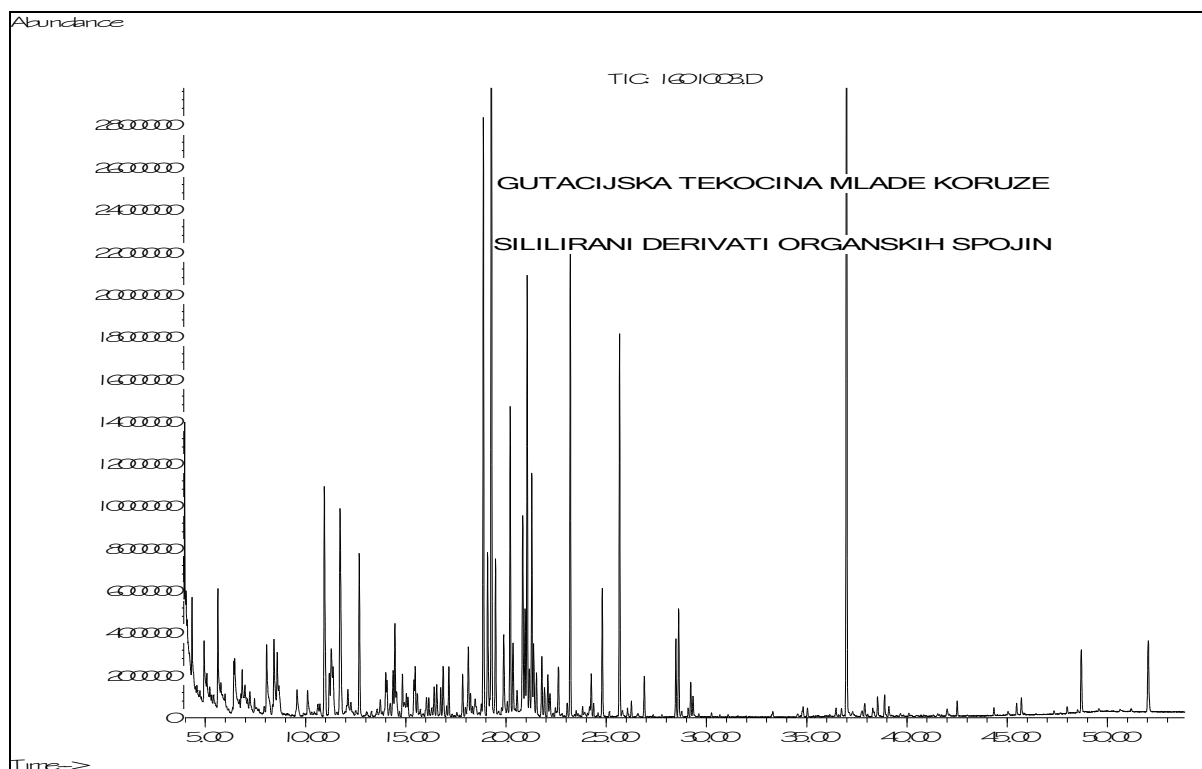
Metalaksil je fenilamidni fungicid s sistemskim delovanjem. Kemijsko ime je (R,S)-2-[(2,6-dimetilfenil)-metoksiacetilamino]-propionske kisline metilni ester (CAS: 57837-19-1).



Uporablja se za sistemsko zaščito semen. Velja, da je malo toksičen za čebele (kontaktna LD₅₀ > 25 µg/čebelo). Iz rastnih poiskusov je razvidno, da spojina po vzkalitvi koruznega semena prehaja v gutacijsko tekočino. Z analitskim pristopom GC/MS razen osnovne spojine metalaksila nismo zaznali njegovih drugih razgradnih spojin.

Organske spojine gutacijske tekočine mlade rastline koruze:

Pripravili smo sililirane derivate sušine gutacijske tekočine in jih posneli z GC/MS. Iz kromatograma je razvidna sestava organskih spojin gutacijske tekočine. Zaznamo amino kisline, različne sladkorje, terpenske ogljikovodike, fitosteroles, vitamine, nižje in višje maščobne kisline in med njimi predvsem nenasičene maščobne kisline. Gutacijska tekočina je glede na sestavo spojin za čebele izvor potrebne vode, mineralnih snovi in hranil.



Slika 5.7: Kromatogram sililiranih spojin sušine gutacijske tekočine mlade rastline koruze. Prisotne so številne amino kisline, celoten nabor sladkorjev od mono-saharidov in disaharidov kot je saharoza, terpenški ogljikovodiki, fitosteroli, vitamini. Gutacijska tekočina ni le izvor vode za čebele, saj vsebuje tudi številne hranilne spojine.

Kontaktni poiskus s čebelami:

Izvedli smo tudi poiskus s čebelami. Na trup posamezne čebele smo nanесли 25 μL gutacijske tekočine mlade koruze vzkaljene iz semena hibrida PR38A24 obdelanega s pesticidi in opazovali čas preživetja čebel. Vse čebele, ki so bile v kontaktu z gutacijsko tekočino, so umrle v manj kot tridesetih minutah.

Čebele so se dandanes znašle med dvema svetovoma, med dvema hotenji, med kmetijstvom in okoljem. So socialni insekti, ki iščejo svojo prehrano in vodo kjerkoli v okolju. Njihovo zdravje in razširjenost sta močno odvisna od stanja okolja, ki jih obdaja.

Neonikotinoidi pripadajo h glavnim sodobnim pesticidom za zaščito kmetijskih kultur. Z njihovo uporabo pa so mnogokrat prizadeti tudi ne-ciljni organizmi kot so čebele ali drugi opraševalci rastlin. S pojavom gutacijske tekočine na mladih rastlinah koruze pridejo čebele v stik s pestro sestavo pesticidov in njihovih rastlinskih metabolitov. V oceni nevarnosti, ki jih predstavljajo za čebelje družine, je potrebno ocenjevati tudi celotno sinergistično učinkovanje pri subletalnih kroničnih koncentracijah spojin. Iz rezultatov rastnih poiskusov, tako laboratorijskih, kot tudi poiskusov na njivi koruze, smo dokazali, da spojina insekticid metiokarb, ki je vodena kot nesistemični pesticid, v poteku rastlinskega metabolizma oksidativno preide v sulfoksidno in sulfonsko spojino, ki pa se sedaj obnašata kot sistemski pesticidi in prehajata iz semena v gutacijsko tekočino. Z GC/MS analitskim pristopom smo prikazali sestavo osnovnih aktivnih spojin pesticidov in sestavo različnih, še vedno toksičnih metabolnih spojin, ki jih zaznamo v gutacijski tekočini. Prikazali smo, da je gutacijska tekočina glede na pestro sestavo organskih spojin kot so amino kisline, sladkorji in maščobne kisline, lahko izvor hranil in vode za čebeljo družino. Potrdili smo, da strupene snovi v gutacijski tekočini pomorijo čebele v manj kot pol ure.

V razvoju novih sredstev za zaščito rastlin bi morali strožje dokazovati, da pesticidni preparat nima nesprejemljivega delovanja na človeško ali živalsko zdravje (čebele bi morale biti vključene!); direktno ali indirektno preko vode, zraka, hrane ali krmil.

Literatura

1. V. Girolami, L. Mazzon, A. Squartini, N. Mori, M. Marzaro, A. di Bernardo, M. Greatti, C. Giorio, A. Tapparo, Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops; A novel way of intoxication for bees; J. Econ. Entomol. **2009**, 102(5), 1808-1815
2. Gina Tanner, diplomsko delo http://othes.univie.ac.at/9119/1/2010-03-29_0404768.pdf
3. Bienen Monitoring in Schweiz,
<http://www.blw.admin.ch/themen/00011/00077/00590/index>
4. E. Vončina, B. Križanec, R. Kranvogel, . Sistemski pesticidi in pomori čebel = Systemic pesticides and honey bees dying. *Slovenski kemijski dnevi 2011, Portorož, 14-16 september 2011*. Maribor: FKKT, 2011,

6. DOLOČEVANJE MEŠANICE IZOMEROV NONILFENOLOV Z GC/MS/MS

V poglavju je predstavljen postopek določevanja mešanice izomerov nonilfenolov s plinsko kromatografijo v povezavi s tandemsko masno spektrometrijo. Tehnična mešanica nonilfenolov je sestavljena pretežno iz razvejanih para-izomerov. Iz analitskega vidika predstavlja natančno določevanje takšne mešanice spojin poseben izziv. Masni spektri posameznih izomerov pri pozitivni elektronski ionizaciji (EI+) se namreč zelo razlikujejo glede na stopnjo razvejanosti stranske verige. Natančna določitev koncentracije v različnih vzorcih je odvisna predvsem od tega ali je sestava analitskih standardov čimbolj podobna sestavi mešanice nonilfenolnih izomerov v vzorcu. Da bi zmanjšali vplive različne masne fragmentacije posameznih izomerov, smo preizkusili MS/MS tehniko v kateri smo izbrali dva primarna (starševska) masna fragmenta, ki zadovoljivo opišeta večino predstavnikov razvejanih nonilfenolov. Po sekundarni fragmentaciji smo sledili ustrezne hčerinske ione, ki so skupni sicer različnima starševskima ionoma. Metoda se je izkazala za uspešno pri določevanju nonilfenolov v različnih vzorcih folij, ki se uporabljajo za embalažo ob globokem zamrzovanju živil.

Nonilfenole (NP) uvrščamo med motilce delovanja endokrinega hormonskega sistema. Zaradi podobnosti delovanja naravnih hormonov lahko povzročijo povečano tveganje nastanka raka in reproduktivne nepravilnosti v organizmih. NP se uporabljajo predvsem pri sintezi nonilfenol polietoksilatov, ki spadajo med pomembna neionska površinsko aktivna sredstva¹. Kljub neugodnim lastnostim, se kot dodatki uporabljajo pri proizvodnji plastičnih folij namenjenih za embalažo živil². Določevanje mešanice spojin, kot je tehnična mešanica nonilfenolov, predstavlja iz analitskega vidika poseben izziv³. S plinsko kromatografijo s sodobnimi kapilarnimi kromatografskimi kolonami ni možno zadovoljivo ločiti posameznih izomerov NP. Dodatno težavo predstavlja masna fragmentacija NP v EI+

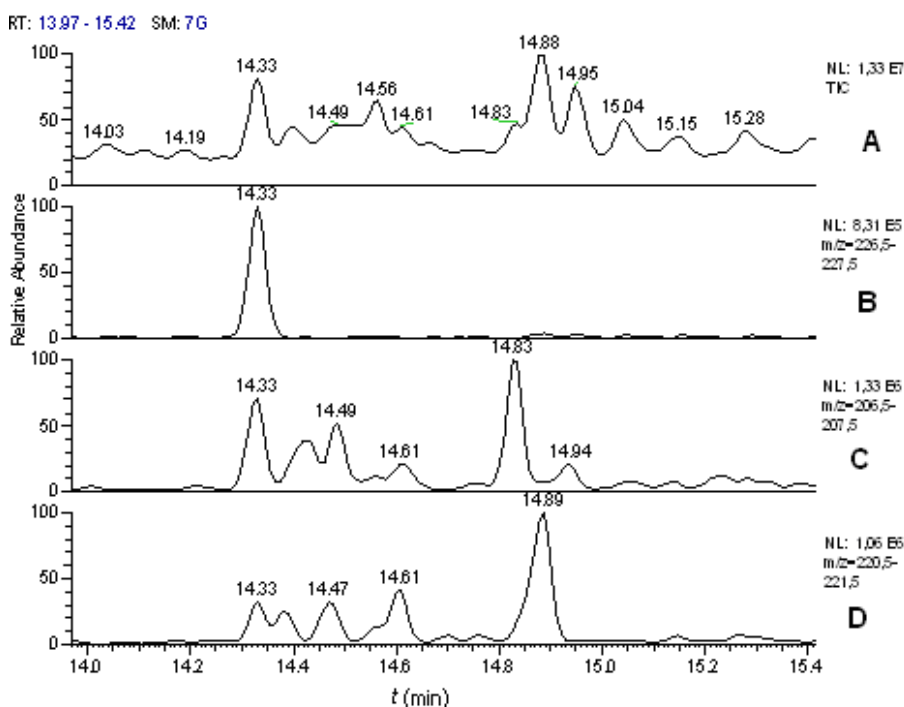
tehniki dela, saj se masni spektri posameznih izomerov zelo razlikujejo glede na stopnjo razvejanosti stranske verige. Natančna določitev koncentracije v različnih vzorcih je odvisna predvsem od tega, ali je sestava analitskih standardov čimbolj podobna sestavi mešanice nonilfenolnih izomerov v vzorcu. Da bi zmanjšali vplive različne masne fragmentacije posameznih izomerov NP, smo preizkusili MS-MS tehniko v kateri smo izbrali dva primarna (starševska) masna fragmenta, ki zadovoljivo opišeta večino predstavnikov razvejanih nonilfenolov. Vpeljano GC/MS-MS metodo smo preizkusili pri določevanju NP v folijah, ki se uporabljajo za embalažo živil.

Pri eksperimentih smo uporabili masni spektrometer na ionsko past Polaris Q (Thermo electron corporation, USA) sklopljen s plinskim kromatografom Trace GC ultra in avtomatskim vzorčevalnikom AS 3000 istega proizvajalca. Za kromatografsko ločevanje smo uporabili ZB-5ms kapilarno kolono dimenzije $60\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$ in debelino filma stacionarne faze $0,25\text{ }\mu\text{m}$ (Zebron, Phenomemex) s sledečim temperaturnim programom: 1,1 min pri $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ do $230\text{ }^{\circ}\text{C}$, $6\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ do $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $40\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ do $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min). Za nosilni plin smo uporabili helij (He 6.0, Messer, Austria) pri konstantnem pretoku 1 mL/min . Temperatura injektorja je bila naravnana na $255\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hidroksilne skupine NP smo pred injiciranjem v GC/MS sklop sililirali z N-metill-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamidom (MSTFA), da smo dosegli boljše kromatografske lastnosti spojin. Za kvantitativno določitev smo uporabili standardne mešanice raztopin proizvajalca Sigma Aldrich (Germany) namenjene za določevanje NP po standardni metodi ISO 18857-2. Niz standardnih mešanic zajema standardno raztopino mešanice NP ter standardno raztopino izotopsko označenega 4-(3,6-dimetil-3-heptil)-fenola (obroč $^{13}\text{C}_6$).

Za TMS derivate mešanice NP smo v MS/MS tehniki dela kot starševska iona izbrali m/z 207 in m/z 221 (Slika 6.3). Za izotopsko označen NP (ISTD-NP) smo izbrali kot starševski ion m/z 227. Da smo zajeli vse izbrane ione za sekundarno fragmentacijo, je posledično širina masnega okna relativno velika. Tako smo sekundarni fragmentaciji v ionski pasti izpostavili ione od m/z 207 do m/z 227. Po sekundarni fragmentaciji v ionski pasti smo kot hčerinske ione sledili: ion m/z 179 in m/z 163 za NP in m/z 185 ter m/z 169 za ISTD-NP.

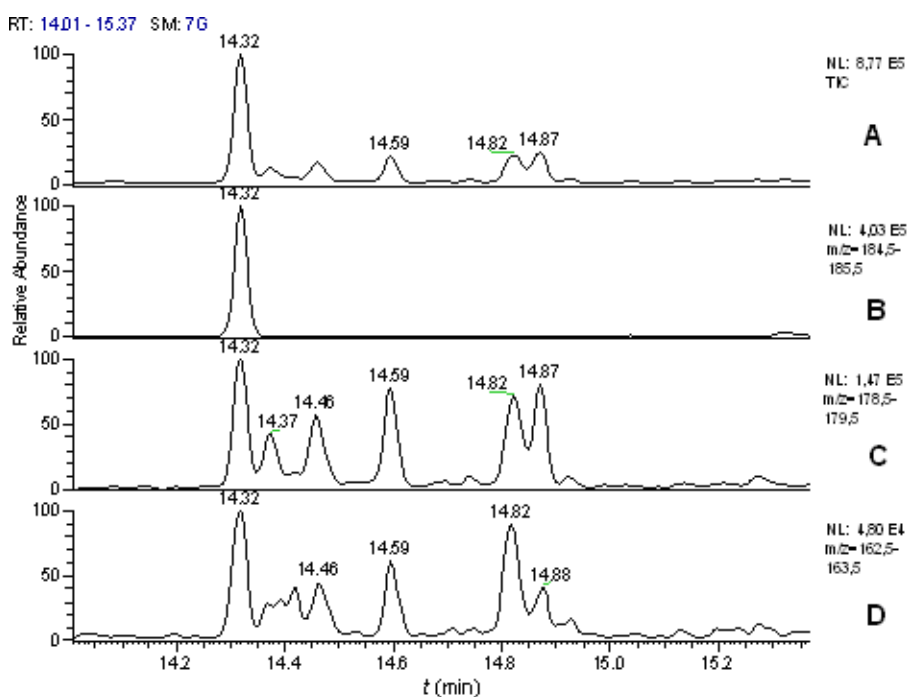
Metodo smo preizkusili pri določevanju NP v ekstraktih naključno izbranih plastičnih folij, ki se uporabljajo za embalažo globoko zamrznjene hrane.

Na Sliki 6.1 je prikazan GC/(EI+)MS kromatogram mešanice sililiranih izomerov nonilfenolov (NP-TMS) v ekstraktu izbrane folije s tehniko snemanja celotnega masnega spektra ter ionski tok izbranih masnih fragmentov NP-TMS. Če natančno pregledamo kromatogram in spektre posameznih izomerov NP-TMS v kromatogramu, ugotovimo, da tako m/z 207 kot m/z 221 ne opišeta zadovoljivo vseh predstavnikov. Po navodilih standardne metode SIST-ISO 18857-2⁴ se v tehniki snemanja izbranih ionov za določevanje NP-TMS uporabi za kvantifikacijo ion m/z 207 ter iona m/z 221 in m/z 179 za potrditev. Če torej uporabimo za kvantifikacijo samo ion m/z 207, je po našem mnenju takšen kvantitativen rezultat preveč odvisen od podobnosti sestave izomerov NP v vzorcu in standardni mešanici.

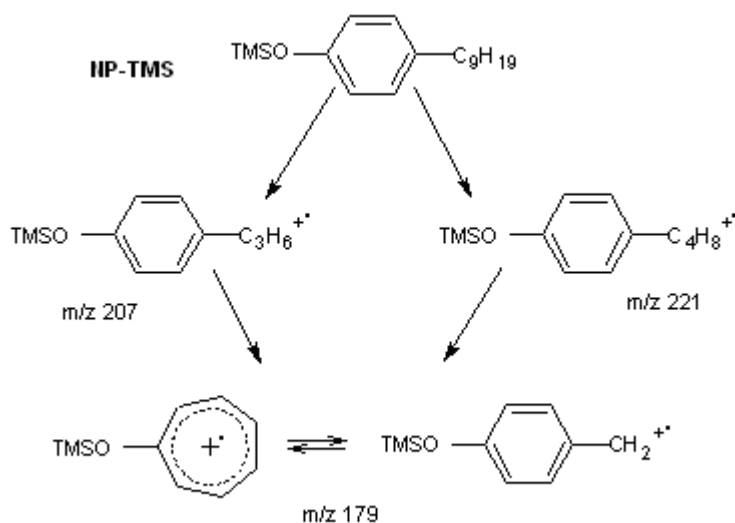


Slika 6.1: (GC/MS kromatogram mešanice izomerov NP-TMS v ekstraktu folije (A) ionski tok fragmenta m/z 227 (B), m/z 207 (C) in m/z 221 (D))

Na Sliki 6.2 je prikazan GC/(EI+)MS-MS kromatogram NP-TMS v ekstraktu folije. S sekundarno fragmentacijo dobimo ion m/z 179, ki je skupen obema starševskima ionoma (Slika 6.3). Vsebnost NP v različnih vzorcih smo določili z metodo internega standarda.



Slika 6.2: (GC/MS-MS kromatogram NP-TMS v ekstraktu folije (A) in ionski toki fragmentov m/z 185 (B), m/z 179 (C) in m/z 163 (D).)



Slika 6.3: (EI+MS potek fragmentacije NP-TMS)

Za kvantitativno določitev NP v vzorcih smo uporabili vsoto ploščin kromatografskih vrhov izbranega iona $m/z \ 179$. Za potrditev identitete NP pa spremljamo še prisotnost in relativni odziv iona $m/z \ 163$. Podobno za ISTD-NP uporabimo ploščino kromatografskega vrha $m/z \ 185$ ter $m/z \ 169$ za potrditev.

Predstavljeno GC/MS/MS metodo smo preizkusili pri določevanju NP v ekstraktih plastičnih folij, ki se uporabljajo za embalažo globoko zamrznjene hrane. V vseh preiskovanih folijah smo zaznali NP v koncentracijah od 11,9 mg/kg do 43,7 mg/kg folije. Rezultati kažejo, da je metoda primerna za rutinsko delo.

Literatura

1. E. Fries, W. Püttmann, *J. Environ. Monit.* 2003, 5, 598-608.
2. L. Votavová, J. Dobiáš, M. Voldřich, H. Čížková, *Czech J. Food. Sci.* 2009, 27 (4), 293-299.
3. M. Moeder, C. Martin, J. Harynuk, T. Górecki, R. Vinken, P.F.X. Corvini, *Journal of Chromatography A* 2006, 1102, 245-255.
4. International Organization for Standardization, 2008, SIST ISO 18857-2: Water quality-determination of selected alkylphenols-Part 2: Determination of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates and bisfenol A- Method for non-filtered samples using solid-phase extraction and gas chromatography with mass selective detector after derivatization.
5. B. Križanec, M. Alfirević, E. Vončina, Določevanje mešanice izomerov nonilfenolov z GC/MS/MS , Determination of nonylphenol isomers mixture by GC/MS/MS. V: *Slovenski kemijski dnevi 2010, Maribor, 23. in 24. september 2010.*

7. IZVOR IN DOLOČEVANJE N-NITROZO-DIBENZILAMINA IN N,N-DIBENZILAMINA

Predmeti splošne rabe, kot so elastomerne mrežice za živilsko industrijo, ki so narejene iz gume zamrežene z N-dibenzilditiokarbamatom ali tetrabenzil tiuram disulfidom, dajejo ob razpadu pospeševalca N-dibenzilamin. Dibenzilamin, kot sekundarni amin, je predhodnik nastanka N-nitrozodibenzilamina z reakcijo nitroziranja ob sočasni prisotnosti nitritnega iona ali drugih nitrozirajočih spojin. Med potekom večmesečnega sušenja in zorenja je gumijasta mrežica v tesnem stiku z mesom oziroma s površinskim maščobnim tkivom. Prehod, oziroma migracija dibenzilnitrozamina in njegovih predhodnih spojin iz mrežice v živilo (običajno so to suhomesnati proizvodi) je lahko toksikološko pomembna. Vzorec sušene mesnine je bil embaliran v ovoj iz umetnega črevesa, nato pa še v mrežico iz elastomerne mase. Določitev vsebnosti N-nitrozodibenzilamina smo izvedli ločeno v živilu, v ovoju umetnega črevesa in v elastomerni mrežici. Analize so pokazale, da je v živilu prisoten N-nitrozodibenzilamin. Delež N-nitrozodibenzilamina, ki je nastal ob pogojih delovanja nitrozirajočih spojin, je ustrezno povišan.

Predmeti splošne rabe, kot so elastomerne mrežice za živilsko industrijo, ki so narejene iz gume zamrežene s tetrabenziltiuramdisulfidom ali s cinkovim N-dibenzilditiokarbamatom dajejo ob razpadu pospeševalca N-dibenzilamin. N-dibenzilamin, kot sekundarni amin, je predhodnik nastanka N-nitrozodibenzilamina z reakcijo nitroziranja ob sočasni prisotnosti nitritnega iona ali drugih nitrozirajočih spojin.

Toksikološke omejitve vsebnosti nitrozaminov so vodile k izboljšanju tehnoloških postopkov v proizvodnji gumijastih izdelkov, kar je pripeljalo do razvoja novih produktov, ki temeljijo na »varnih aminih«. Tetrabenziltiuramdisulfid in cinkov dibenzilditiokarbamat

sta taka primera novih radikalskih pospeševalcev zamreženja gume, ki imata osnovo v »varnem« dibenzilaminu. Običajni vulkanizacijski sistem zamreženja gume vsebuje manj kot 1% pospeševalca, kar pa je več kot dovolj za nastanek nitrozaminov v območju od $\mu\text{g/kg}$ do mg/kg mesnega izdelka. Med dolgotrajnimi difuzijskimi procesi med sušenjem in zorenjem mesa, se ob prisotnosti nitritov nastali nitrozamini ekstrahirajo oziroma migrirajo v površinski maščobni del mesa. Prehod oziroma migracija dibenzilnitrozamina in njegovih predhodnih spojin iz mrežice v živilo (običajno so to suhomesnati proizvodi) je lahko toksikološko pomembna.

Razsol mesa: Pred postopkom sušenja in zorenja je meso v postopku razsola. Glavne sestavine za razsol mesa so:

Sol (natrijev klorid), ki je najpomembnejša sestavina v proizvodnji suhomesnatih izdelkov,

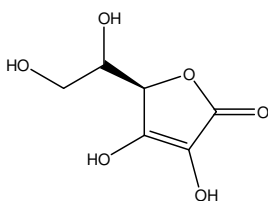
Nitrit (NO_2^-), natrijev nitrit je aktivna učinkovina v razsoljevanju mesa. Reagira z mesom in daje dušikov oksid (NO), ki daje tipično »rožnato« barvo sušenemu mesu.

Nitrat (NO_3^-), kalijev nitrat ali »soliter« je učinkovina v razsolu mesa, ki pa se mora pretvoriti v nitrit, da učinkuje. Osnovni razlog je v tem, da služi kot »rezervoar nitrita«. V počasnem procesu se v glavnem pod vplivom mikroorganizmov pretvori (reducira) v nitrit.

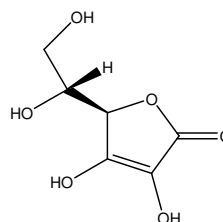
Pospeševalne spojine v razsolu mesa, so natrijev eritorbat, natrijev askorbat in askorbinska kislina. Dodajajo jih za pospeševanje reakcij, ki potekajo ob razsolu in zorenju mesa.



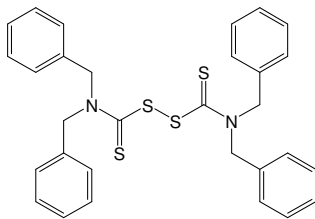
Natrijev nitrit, E 250



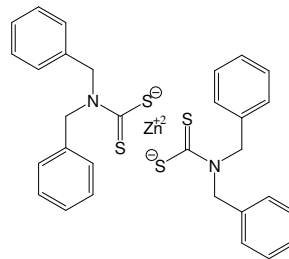
Natrijev nitrat, E 251



Askorbinska kislina, E 315

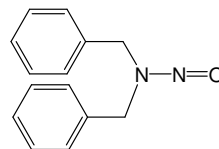
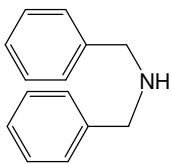


Eritorbinska kislina, E 300

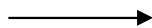


Tetrabenziltiuramdisulfid

Cinkov dibenzilditiokarbamat



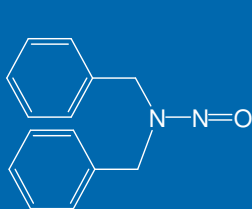
H^+ , HONO



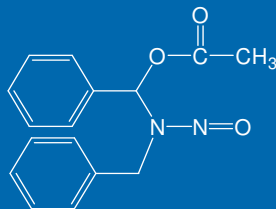
N,N-dibenzilamin

N-nitrozo-dibenzilamin

Mutagenost nekarcinogenega N-dibenzilnitrozamina in α -acetoksi derivata



N,N-dibenzilnitrozamin (I)
Ne mutagen (I)

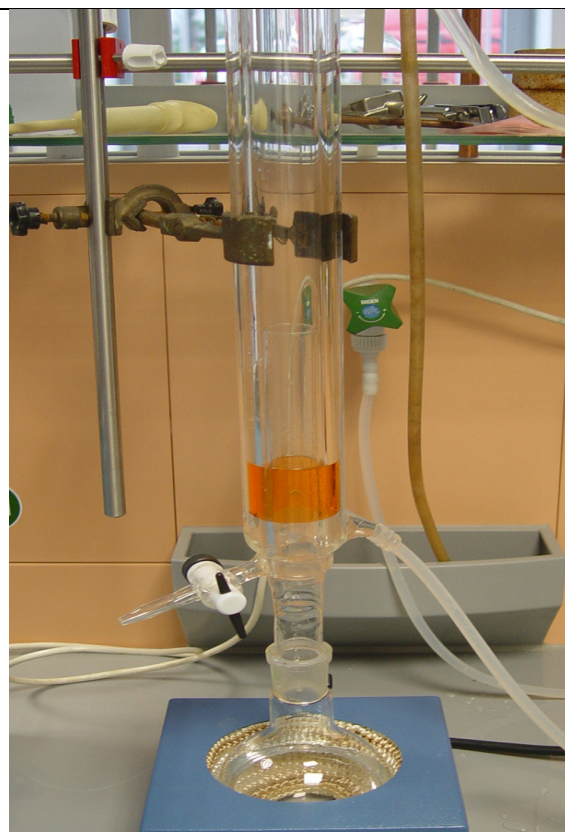


N-(α -acetoksi) metabolit (II)
Zelo mutagen (II)

Ref.: Jacobson M.K. et al.; Cancer Lett, 1979 Feb, 6(2), 83-7



Slika 7.1: Vzorec živila z jedilnim delom, kolagenskim ovojem in mrežico



Slika 7.2: Aparatura za sočasno parno destilacijo in ekstrakcijo

Uporabljeni analitski pristopi:

Za določitve N-nitrozodibenzilamina v elastomernih mrežicah smo izbrali in uporabili 24 urno namakanje v izooktanu pri 22°C. Ker so vzorci mesnega živila, navadno z velikim deležem maščobnega tkiva, v dajšem časovnem obdobju v tesnem kontaktu z mrežico, je naša izbira izooktana kot ekstrakcijsko-migracijskega topila povsem korektna. Mogoče bi bilo bolje izbrati simulacijo migracije v tripalmitin ali triolein; izvaja se migracija v heksan kot nadomestek za maščobno matrico; toda menimo, da izbiri izooktana ni oporekati. Izbira 3% očetne kisline ali 0,2 M vodne rastopine HCl za migracijske teste pa je v primeru migracije N-nitrozodibenzilamina v maščobno matrico vzorca zelo vprašljiva in neprimerna.

Za vzorce, kjer težavna matrica vsebuje veliko maščobe, smo za jedilni del živila uporabili postopek izolacije s parno destilacijo ob sočasni ekstrakciji z nepolarnim topilom (Slika 7.2) in določitev z metodo GC/MS/PCI.

Zaznava in kvantitativna določitev N-nitrozodibenzilamina:

Določitve N-nitrozodibenzilamina smo izvedli s plinsko kromatografijo v povezavi s masnim spektrometrom na ionsko past. Za razvoj metode smo preiskusili tehnike dela z uporabo elektronske ionizacije (EI) in kemične ionizacije pozitivnih (GC/MS/PCI) in negativnih ionov (GC/MS/NCI). Za interni standard smo izbrali devterirano spojino N-nitrozo-difenilamina-D₆ kot prvi približek spojine analita N-nitrozo-dibenzilamina. Za dobro kontrolo analitskega postopka in masnospektrometrične določitve bi bilo potrebno sintetizirati izotopsko označeno standardno spojino N-nitrozo-dibenzilamina, ki pa zaenkrat še ni dosegljiva.

Izvedli smo tudi še določitve vsebnosti N-nitrozodibenzilamina v štirih, po izvoru različnih, a še neuporabljenih mrežicah. Določili smo vsebnosti N-nitrozodibenzilamina v mrežicah tudi ob nitrozirajočih pogojih, ki jih predpisuje prEN 12868.

Vzorec sušene mesnine (Slika 7.1) smo analizirali na vsebnost N-nitrozodibenzilamina in to na tisti del, ki je že prisoten v odvzetem vzorcu živila in njegovih sestavnih delih (umetno črevo, mrežica iz elastomera), kot tudi na tisti del N-nitrozodibenzilamina, ki lahko nastane iz preostalega dela prisotnih predhodnih spojin nastanka nitrozamina (to je N,N-dibenzilamin) ob nitrozirajočih reakcijskih pogojih. Vzorec sušene mesnine je bil embaliran v ovoj iz umetnega črevesa, nato pa še v mrežico iz elastomerne mase. Določitev vsebnosti N-nitrozodibenzilamina smo izvedli ločeno v živilu, v ovoju umetnega črevesa in v elastomerni mrežici. Analize so pokazale, da je v živilu prisoten N-nitrozodibenzilamin. Delež N-nitrozodibenzilamina, ki je nastal ob pogojih delovanja nitrozirajočih spojin, je ustrezno povišan. Določevanja ostalih možno prisotnih hlapnih nitrozaminov nismo izvedli.

Tabela 7.1: Vsebnosti N-nitrozodibenzilamina v jedilnem delu živila, v kolagenskem ovoju in v uporabljeni mrežici.

	N-Nitrozodibenzilamin (mg/kg)	N-Nitrozodibenzilamin (mg/kg) Ob nitrozirajočih pogojih
Meso (Užitni del)	1,3	61
Ovoj (kolagensko črevo)	0,26	15
Mrežica (že uporabljena)	1,6	110

Iz rezultatov (Tabela 7.1) je razvidno naslednje:

Tabela 7.1: Vsebnosti N-nitrozodibenzilamina v jedilnem delu živila, v kolagenskem ovoju in v uporabljeni mrežici.

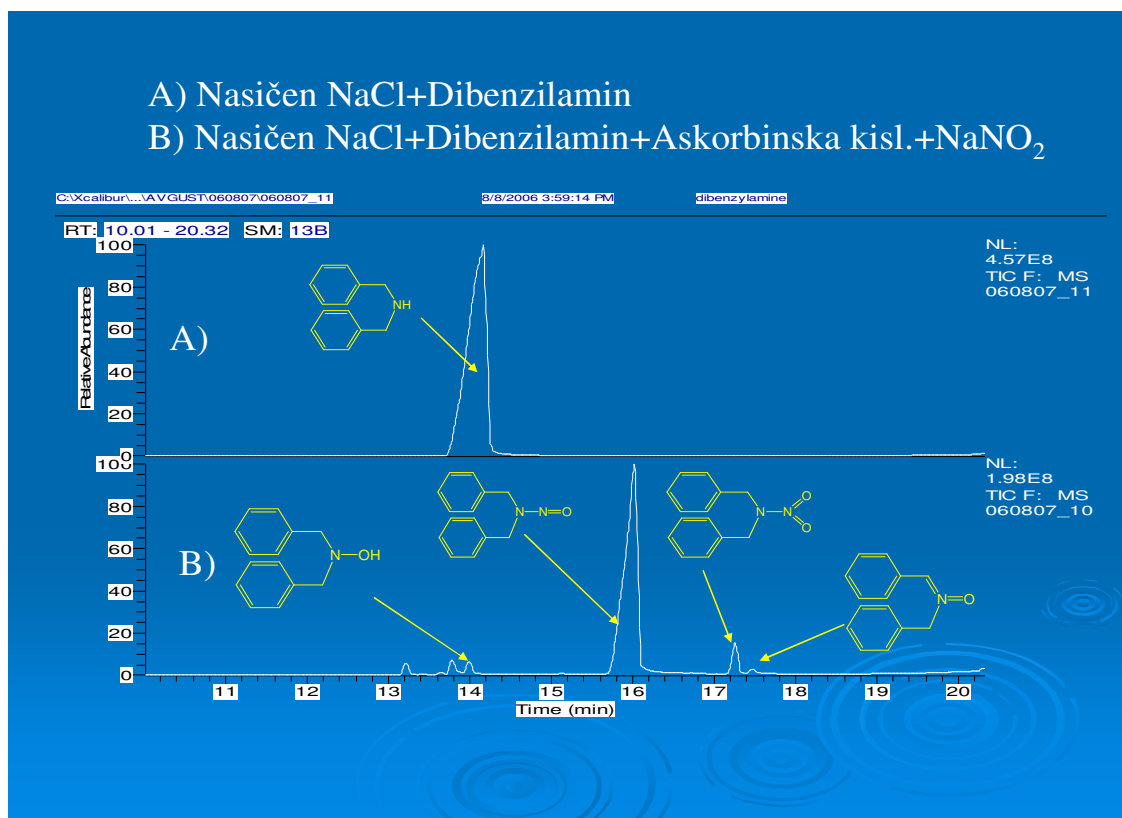
- N-nitroso dibenzilamin, je prisoten v živilu v koncentraciji 1,3 mg/kg, v umetnem črevesu, ki ovija živilo, v koncentraciji 0,26 mg/kg in v elastomerni mrežici, ki ovija živilo z ovojem iz umetnega črevesa v koncentraciji 1,6 mg/kg.
- N-nitroso dibenzilamin, ki je nastal ob neugodnih nitrozirajočih pogojih iz preostalega N-dibenzilamina, je v živilu prisoten v koncentraciji 61 mg/kg, v ovoju iz umetnega črevesa 15 mg/kg in v mrežici v koncentraciji 110 mg/kg vzorca.
- analizirali smo tudi vsebnost N-nitrozodibenzilamina v štirih vzorcih mrežici, ki še niso bile v stiku z živilom (Tabela 7.2). Ugotavljamo, da je v mrežicah N-nitrozodibenzilamin prisoten v koncentracijah od 0,98 mg/kg do 4,14 mg/kg mrežice; celoten delež N-nitrozodibenzilamina, ki nastane ob nitrozirajočih pogojih v kislem, pa v koncentracijskem območju od 69 mg/kg do 370 mg/kg še ne uporabljene (nove) mrežice.

Tabela 7.2: Vsebnosti N-nitrozodibenzilamina v še neuporabljenih, novih mrežicah.

	N-Nitrozodibenzilamin (mg/kg)	N-Nitrozodibenzilamin (mg/kg) Ob nitrozirajočih pogojih
Mrežica 1	4,14	370
Mrežica 2	1,78	170
Mrežica 3	0,98	290
Mrežica 4	4,04	69

Primerjava rezultatov pokaže, da vzorec same mrežice vsebuje N-nitrozodibenzilamin, ki je nastal ob tehnoloških procesih zamreženja gume ali ob vplivih dušikovih oksidov ob daljšem stanju na zraku ali pod vplivom drugih nitrozirajočih spojin. Vsebnosti N-nitrozodibenzilamina so ob uporabljenih pospeševalcih zamreženja gume kot sta N-dibenzilditiokarbamat ali tetrabenziltiuramdisulfid, in živilskih aditivov kot sta soli nitrita in nitrata in še ob prisotnosti eritorbinske ali askorbinske kisline, lahko zelo visoke. Rezultati analiz mrežice, ki je že bila v stiku z živilom, to potrjujejo. Izmerjene vsebnosti N-nitrozodibenzilamina v mrežici, ovoju umetnega črevesa in živilu so posledica medsebojnega prehajanja in delovanja tako spojin v elastomerni masi kot aditivov, ki se dodajajo suhomesnatemu živilu (nitrit, nitrat, askorbinska ali eritorbinska kislina) ob dolgotrajnem sušenju (nekaj mesecev, lahko pa tudi do leta in več!) in zorenju suhomesnatega izdelka.

Poznano in sprejeto dejstvo je, da askorbinska kislina, eritorbinska kislina in alfa-tokoferol preprečujejo nastanek nitrozaminov zaradi njihovih oksidacijsko-redukcijskih lastnosti. Ko se askorbinska kislina oksidira v dehidroaskorbinsko kislino, se dušikov anhidrid, močan nitrozirajoči reagent, ki nastaja iz natrijevega nitrita, reducira v dušikov oksid, ki ni nitrozirajoči reagent. Iz naših poiskusov simulacije poteka reakcij na nasoljeni površini vzorca sušene mesnine z mrežico ob prisotnosti nitrita in askorbinske kisline, smo izvedli reakcijo nitroziranja N,N-dibenzilamina v nasičeni raztopini natrijevega klorida ob dodatku natrijevega nitrita in askorbinske kisline. Reakcijske produkte podajamo na Sliki 7.3. Poteče skoraj kvantitativna reakcija amina do N-nitroso spojine. Stranski produkti so še spojine dibenzil-N-nitramin, dibenzilnitron in dibenzil-N-hidroksilamin.



Slika 7.3: Reakcija nitroziranja N,N-dibenzilamina v nasičeni raztopini natrijevega klorida z nitritom in askorbinsko kislino.

Rezultati določitev celokupne vsebnosti nitrozirajočih spojin v mrežicah, namenjenih stiku z mesnimi živili, so višji kot poročajo v nizozemski študiji (Bouma and Shothorst, 2003). Mislimo, da je pravi razlog v boljšem (dolgotrajnejšem) ekstrakcijskem (migracijskem) postopku z uporabo izooktana kot nepolarne topila, ki mu sledi enourna reakcija nitroziranja v kislem mediju. S takim postopkom smo dosegli boljši izplen nitrozirajočih spojin v gumijastih mrežicah, kot pa se ga da doseči z ekstrakcijo (migracijo) s 3% očetno kislino ali vodno raztopino 0,2 M HCl. Velika večina analitskih podatkov o vsebnostih N-nitrozodibenzilamina je omejena le na vsebnosti v mrežicah in malo je podatkov o vsebnostih v mesu oziroma v živilu.

Toksikološka ocena nevarnosti, ki jo predstavljajo vsebnosti N-nitrozodibenzilamina v gumijastih mrežicah in posebej v mesnih izdelkih, bi morala upoštevati tudi vsebnosti možno prisotnih N-nitraminov skupaj z vsebnostjo N-nitrozaminov. Ob dolgih difuzijskih časih in tesnem stiku mrežice z maščobno površino so koncentracije N-nitrozodibenzilamina v jedilnem delu živila visoke in lahko toksikološko pomembne. Glede na določene visoke vsebnosti N-nitrozodibenzilamina v živilu, bi bilo potrebno analizirati večje število različnih vzorcev (mrežice in mesni izdelki) pri eksperimentalnih pogojih migracije v apolarno topilo, kot najbližji približek za vzorec mesnega izdelka, da bi zagotovili statistično veljavne rezultate.

Po našem mnenju poteka reakcija nitroziranja ob prisotnosti nitrita in askorbinske kisline med potekom razsola, sušenja in zorenja mesa mnogo hitreje kot pa poteka redukcija HNO_2 do NO , kar vodi do prednostnega nastanka N,N-dibenzilnitrozamina.

Literatura

1. K. Bouma; R.C.Schothorst; Identification of extractable substances from rubber nettings used to package meat products, Food Additives and Contaminants, 2003, Vol. 20, No. 3, 300-307
2. Mi-Hyang Song; Soo-Jung Lee, Jung-Hye Shin, Sun-Young Choi and Nak-Ju Sung; Effect of the N-nitrosodimethylamine Formation in Ascorbate and Phenolic Portion from Citrus Juice, Korean J. Food & Nutr. Vol.15 No.2, 97-103 (2002)
3. E.Vončina, B.Križanec; Rubber nettings used to package meat products as source of N-nitroso-dibenzylamine and nitrosatable dibenzylamine, 1st European Chemistry Congress, 27-31 August 2006, Budapest, Hungary

8. ORGANSKE SPOJINE V PITNIH VODAH PRI UPORABI PLASTIČNIH CEVI

V pitnih vodah pogosto odkrijemo spojine antioksidantov sterično oviranih fenolov. Izvor teh spojin je v mnogih primerih zaradi uporabe plastičnih cevi in drugih polimernih materialov pri oskrbi s pitno vodo. Spojine se izpirajo iz stene cevi v pitno vodo. Kadar pitno vodo kloriramo, pričakujemo difuzijo klora v plinastem stanju in klora raztopljenega v vodi, v stene plastične cevi. Med oksidacijskim procesom kot je kloriranje ali ozoniranje vode prihaja do razgradnje polimera in do pretvorbe spojin antioksidantov, ki so vgrajeni v polimer. Osnovne spojine, ki nastanejo pri razgradnji v polimer vgrajenih antioksidantov, so sterično ovirani alkilirani fenoli, kot so 4-metil-2,6-di-t-butilfenol (BHT), 2,6-di-t-butilfenol, 2,4-di-t-butilfenol in druge fenolne spojine. Pri pogojih kloriranja tako v vodi nastanejo derivati osnovnih spojin antioksidantov in njihovi razgradni produkti. Zaradi visokega oksidacijskega potenciala klorirane vode se tvorijo prosti radikali kot so hidroksilni radikal, oksinitroksilni radikal in radikali halogenov, ki reagirajo s sterično oviranimi fenoli. To je razumljivo, saj so tovrstne spojine lovilci radikalov. Spojine ki so nastale pri dezinfekcijskem procesu, so halogenirani in/ali nitrirani sterično ovirani alkilirani fenoli kot so 2,6-di-t-butil-4-klorofenol, 2,6-di-t-butil-4-bromofenol in 2,6-di-t-butil-4-nitrofenol. Za nekatere sterično ovirane alkilirane fenole se predvideva, da imajo estrogene lastnosti in motijo normalno hormonalno ravnotežje, zato menimo, da bo potrebno izvajati monitoring spojin sterično oviranih alkiliranih fenolov in njihovih derivatov, ki nastajajo v pitnih vodah med dezinfekcijskim procesom kot je kloriranje ali ozoniranje vode.

Voda, ki zapusti vodarno, je lahko onesnažena, še preden prispe do potrošnika. Malo raziskav proučuje identifikacijo aditivov, ki difundirajo v pitno vodo iz cevi. Zaenkrat je znanje o kemizmu organskih spojin, ki lahko difundirajo v pitno vodo, še pomankljivo. Zmanjševanje kakovosti vode in spremembe okusa ter vonja lahko pripišemo predvsem distribucijskemu sistemu in materialom iz katerih so narejene vodovodne cevi.

Pri ovrednotenju kakovosti distribucijskega sistema je potrebno preverjati materiale s katerimi je voda v kontaktu, preden pride do potrošnika. To so vodovodna napeljava, vodovodne cevi in zbiralniki vode. Obstojnost materialov vodovodne napeljave glede okusa in vonja vode še ni raziskana, podatkov je malo, zato je potrebno tovrstne raziskave povečati. Študije so pokazale, da se pokažejo sprememba okusa in vonja pitne vode takrat, ko se izvede obnova vodovodne napeljave in se vgrajujejo novi materiali. Problemi povezani z okusom in vonjem pitne vode v distribucijskem sistemu so lahko biološkega izvora (gljive in bakterije) in kemijskega izvora, zaradi izvedbe vodovodne napeljave (mrtvi rokavi) in postopkov dezinfekcije (kloriranje, kloraminacija, ozoniranje). Vrsta materialov iz katerih so narejene vodovodne cevi in vrsta dezinfekcijskih sredstev vplivata na estetsko in kemijsko kakovost pitne vode na pipi. Prisotnost klora ima lahko škodljiv vpliv na materiale vodovodnih cevi in tako vpliva na okus in vonj pitne vode.

Polipropilen visoke gostote (HDPP), polietilen visoke gostote (HDPE), zamreženi polietilen (PEX), polivinil klorid (PVC) ali klorirani polivinil klorid (cPVC) so najbolj pogosti polimeri za izdelavo vodovodnih cevi. Polimere je potrebno testirati glede migracije organskih spojin v pitno vodo. Polimerni materiali vsebujejo različne organske in anorganske dodatke za izboljšanje trdnosti materialov, za izboljšanje izdelave ali za spremembo barve. Dodatki vsebujejo antioksidante in druge stabilizatorje, mehčalce, maziva in barvila. Na eni strani je pomembno imeti dobre mehanske lastnosti cevi, na drugi strani pa je potrebno preverjati možnost izluževanja organskih snovi v pitno vodo, da ne bi povečali njenega onesnaženja. Zato je potrebno analizirati osnovne additive v polimerih in prav tako njihove možne razgradne produkte. Za ovrednotenje kakovosti vode je potrebno določiti njihove koncentracijske nivoje.

Za določanje tovrstnih spojin običajno uporabljamo različne instrumentalne tehnike kot so GC/MS, HPLC/MS in druge. Glavne spojine, ki se izlužujejo iz plastičnih cevi, so 2,6-di-t-butil-4-metilfenol (BHT), 2,4-di-t-butilfenol, 2,6-di-t-butilfenol in 2,6-di-t-butilbenzokinon, ki so znani razgradni produkti antioksidantov. BHT se pogosto uporablja kot antioksidant v plastiki in ga zato že prištevamo med stalna okoljska onesnaževala. Ob fenolnih spojinah se iz plastičnih cevi v sledovih izlužujejo še različni estri, aldehidi, ketoni, aromatski ogljikovodiki in terpenoidi. Znano je tudi, da se množina antioksidantov

in stabilizatorjev v ceveh s časom manjša zaradi ekstrakcije v vročo vodo. Zaradi tega se tudi manjša zaščita cevi in so mehanske poškodbe zaradi termične in oksidativne razgradnje pogostejše.

Vonj vode, ki je v stiku s plastičnimi cevmi, opisujemo in ocenjujemo glede na koncept senzorične analize, ki je podan kot kvantitativno določena spodnja meja zaznave vonja (TON). Vzroki za spremembe okusa in vonja vode v plastičnih ceveh so lahko tudi biološkega izvora. Naravna mikrobiološka flora, ki je običajno prisotna v pitnih vodah, kolonizira notranje površine cevi, kar vodi do pojava nastanka biofilma³.

Vzrok spremembe okusa in vonja vode je često dezinfekcija (kloriranje, kloraminacija, ozoniranje). Prisotnost klora vpliva na lastnosti plastičnih cevi, predvsem na njihovo obstojnost. Stalna potreba za izboljšanje obstojnosti plastičnih cevi za vročo in hladno vodo vodi do uporabe različnih sestav polimera in različnih aditivov, ki so običajno kombinacije antioksidantov sterično oviranih fenolov. Na drugi strani pa številne spojine, ki jih najdemo v pitnih vodah po kloriranju, kažejo negativne vplive na kakovost vode.

Senzorične lastnosti in kakovost vode v plastičnih ceveh po kloriranju:

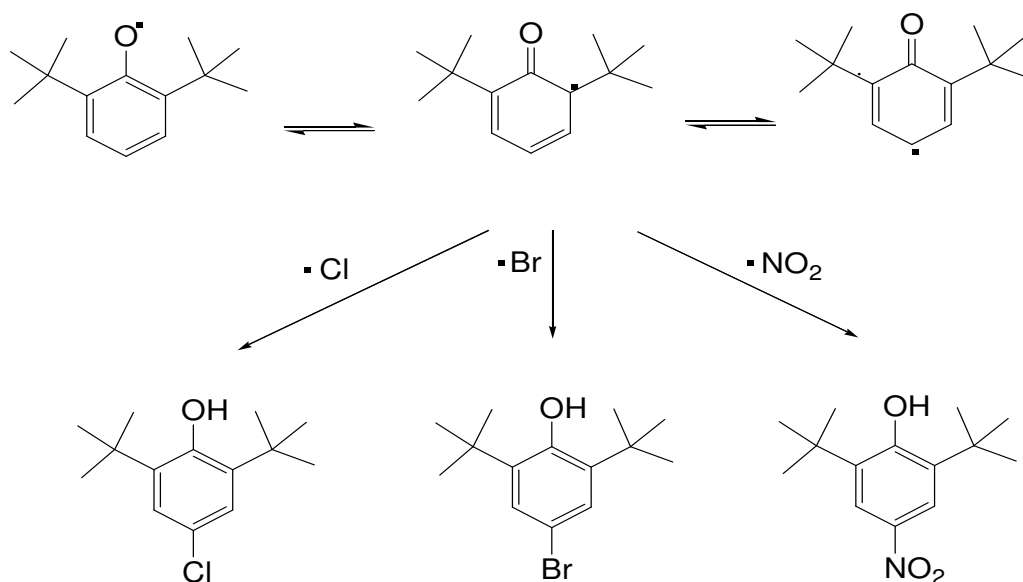
Kakovost vode v plastičnih ceveh se odraža v spremenjenem vonju, v odpuščanju organskih spojin, v nastanku trihalometanov in v večji porabi klora ali kloraminov. Študija je bila vodena in izvedena v skladu s protokolom, ki podaja odpuščanje spojin iz materialov, ki so v stiku s pitno vodo⁴. Okus vode iz HDPE cevi so strokovnjaki opisali kot "parafinsko/plastičen/citronast". Voda iz kloriranega polivinil klorida (cPVC) takšnega okusa ni imela. Vode, ki so bile v obeh vrstah plastičnih cevi, so imele visoko vrednost skupnega organskega ogljika TOC zaradi povečanega izpiranja organskih snovi iz sten cevi. Vrednosti so bile za HDPE: 0,14 mg TOC/cm², kar je bistveno več kot v primeru cPVC cevi. Poraba aktivnega klora je bila v primeru HDPE cevi 0,1–0,9 mg dezinfekcijskega sredstva/cm² površine cevi, kar je zopet več kot pri cPVC ceveh.

Dezinfekcija:

Nove vodovodne cevi in napeljave se običajno dezinficirajo s kloriranjem vode. Klorira se običajno šele po dobrem izpiranju in tlačnem testiranju. Daljša izpostavljenost višjim koncentracijam klora lahko povzroči poškodbo notranjih sten plastičnih cevi.

Poraba klora pri dezinfekciji:

Voda, ki je bila klorirana in v stiku s plastičnimi cevmi (HDPE in cPVC), je po kloriranju vsebovala manj klora kot voda, ki je tekla po primerjalnih steklenih ceveh. Porabo dezinfekcijskega sredstva lahko pripišemo interakciji med klorom in antioksidanti ali s samim polimerom.



Slika 8.1: Zaznane organske spojine v ekstraktih klorirane vode pri uporabi polimernih vodovodnih cevi.

2,6-di-t-butyl-4-nitrofenol (DBNP):

Poznan je primer, da so v ameriških podmornicah notranje površine porumenele. Preiskava je odkrila vzrok za porumenelost, ki je bil zaradi odsedanja spojine 2,6-di-t-butyl-4-nitrofenola po površinah. Spojina je nastala z nitriranjem 2,6-di-t-butylfenola, ki je bil dodan strojnemu olju. Nitriranje je poteklo ob prehodu aerosolov pri čiščenju zraka skozi elektrostatični precipitator. Toksičnost spojine DBNP ni dobro raziskana. Spojina je bila v letih 1960 predvidena kot mitocid za komercialno uporabo⁵. 2,6-di-t-butyl-4-nitrofenol je močan inhibitor shranjevanja energije v ATP preko oksidativne fosforilacije^{6,7}. Glede na pK_a vrednost 6,8 in večjo lipofilnost je DBNP boljši inhibitor kot 2,4-dinitrofenol s $pK_a=4,09$ zaradi pričakovane večje pasivne difuzije preko bioloških membran pri fiziološkem pH 7,4.

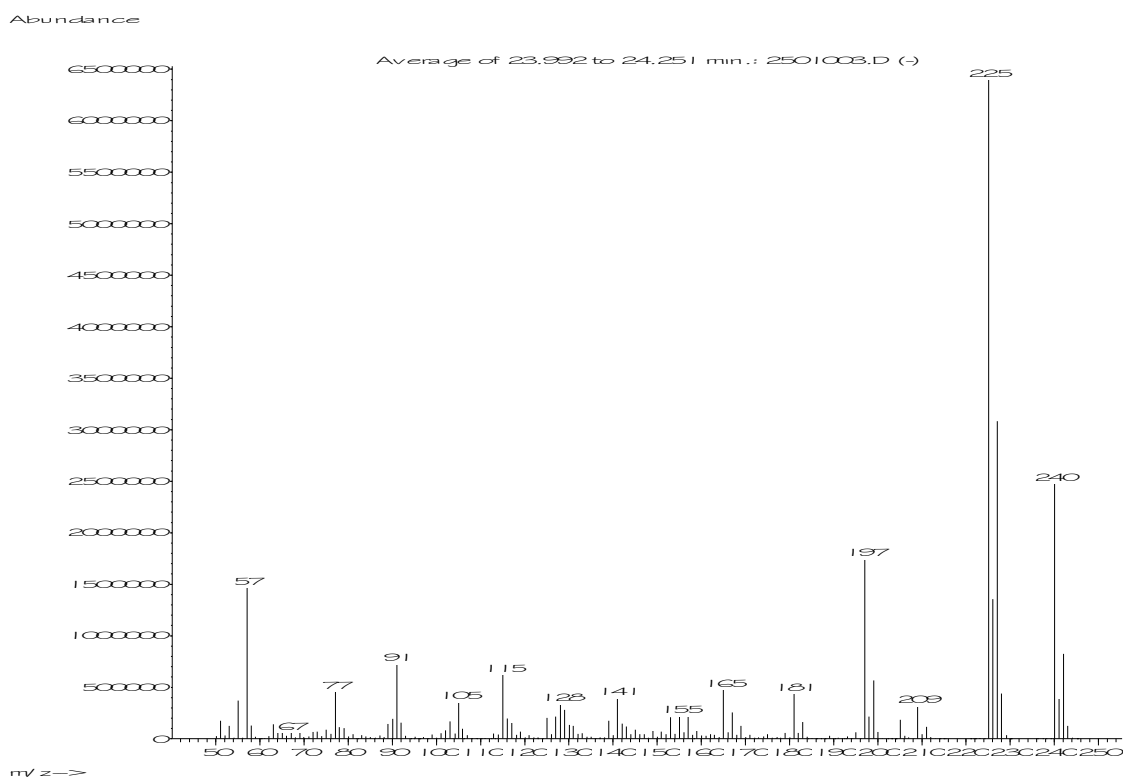
Po ekstrakciji tekoče-tekoče vzorcev pitnih vod smo ekstrakte analizirali s plinsko kromatografijo in masno spektrometrijo. Ekstrakte smo posneli na aparatu GC/MS Agilent MSD 5975. Uporabili smo kolono JW-DB-5MS (60m x 0,25mm I.D., z debelino nanosa 0,25 μ m). Masni spektri so bili posneti z elektronsko ionizacijo (EI). Za identifikacijo masnih spektrov smo uporabili podatke iz zbirke spektrov NIST in Willey knjižnice ali pa lastno interpretacijo masnih spektrov.

V tabeli 8.1 so prikazane različne organske spojine, ki smo jih identificirali v ekstraktih vzorcev pitnih vod s plinsko kromatografijo in masno spektrometrijo⁸. Večina spojin ima v strukturi prisoten fenolni obroč, substituiran s sterično oviranimi alkilnimi (terciarnimi butilnimi) skupinami na mestih 2,6- ali 2,4- aromatskega obroča.

CAS število	Spojina
128-37-0	4-metil-2,6-di-t- butilfenol
719-22-2	2,6-di-t- butil -1,4-benzokinon
128-39-2	2,6-di-t- butilfenol
489-01-0	3,5-di-t- butil 4-hidroksi-anisol
	2,6-di-t- butil -4-hidroksi-4-metil-2,5-cikloheksadien -1-on
728-40-5	2,6-di-t- butil -4-nitrofenol
4096-72-4	2,6-di-t- butil -4-klorofenol
1139-52-2	2,6-di-t- butil -4-bromofenol
2772-45-4	2,4-bis(dimetil)benzil-fenol
	2,4-bis(dimetil)benzil-6-t-butil-fenol
30748-85-7	2,4,6-tris(1-metil-1-fenil etil)-fenol
	2,6-di-t-butil-4-hidroksi metilen-3,5-cikloheksadienon
14035-33-7	3,5-di-t- butil -4-hidroksi-acetofenon
1620-98-0	3,5-di-t- butil -4- hidroksi -benzaldehyd
82304-66-3	7,9-di-t- butil -1-oksaspiro[4,5]deka-6,9-dien-2,8-dion
6683-19-8	3-(3,5-di-t- butil -4- hidroksi fenil)metil propanoat
88-26-6	3,5-di-t-butil-4- hidroksi benzil alkohol

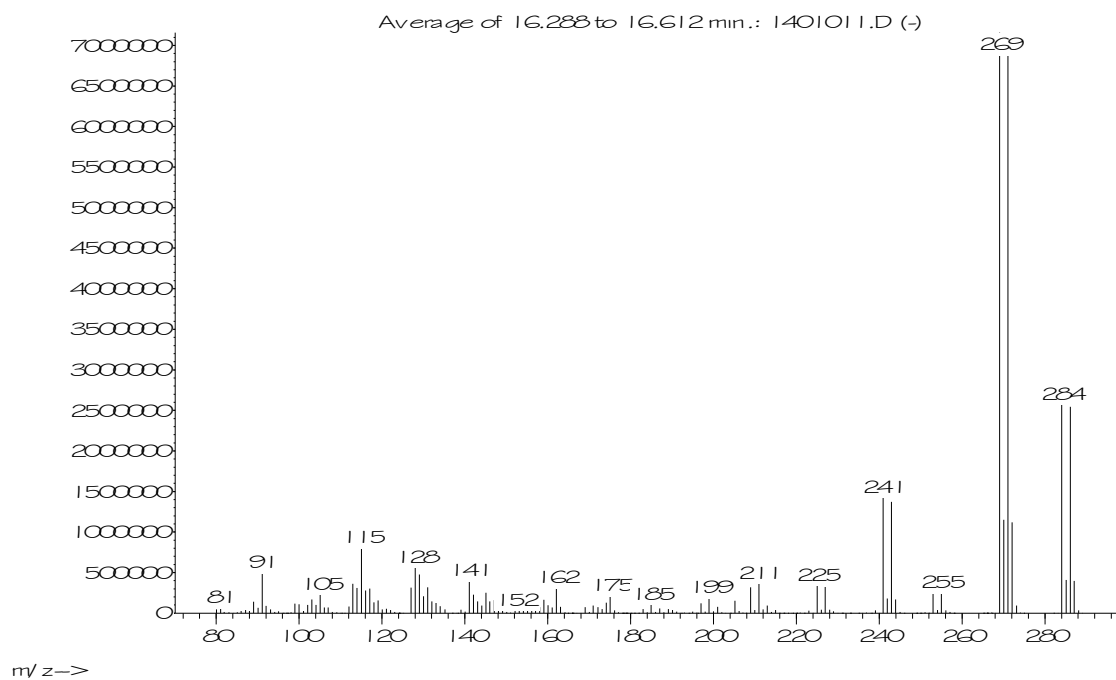
Tabela 8.1: Organske spojine v različnih vzorcih pitnih vod, ki smo jih zaznali s plinsko kromatografijo in masno spektrometrijo.

EI masni spektri 2,6-di-t-butil-4-klorofenola, 2,6-di-t-butil-4-bromofenola in 2,6-di-t-butil-4-nitrofenola so podani na slikah 2, 3 in 4.



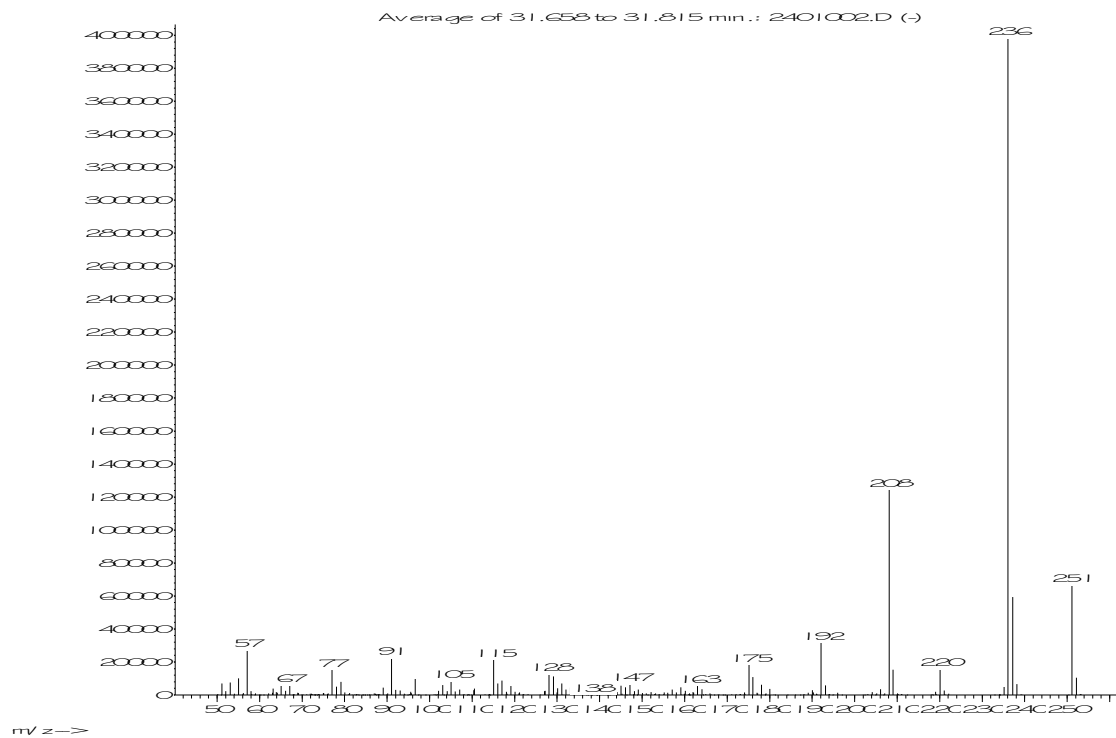
Slika 8.2: : EI masni spekter 2,6-di-t-butil-4-klorofenola.

Abundance



Slika 8.3: EI masni spekter 2,6-di-t-butil-4-bromofenola.

Abundance



Slika 8.4: EI masni spekter 2,6-di-t-butil-4-nitrofenola

Pri pogojih kloriranja lahko v pitnih vodah nastanejo derivati osnovnih spojin antioksidantov in razkrojnih produktov. Spojine v pitnih vodah, ki so nastale po dezinfekciji, so halogenirani in/ali nitrirani sterično ovirani fenoli. Fenolne spojine in nastali produkti imajo lahko škodljive vplive, ki še niso dovolj raziskani. Prisotni so skoraj v vseh vzorcih pitnih vod. Potrebno bi bilo raziskati različne karakteristike, toksikološke efekte in slediti koncentracijske nivoje fenolov in sorodnih spojin, ki smo jih identificirali v vodah. Redke raziskave ugotavljajo, da smo do sedaj zanemarjali negativni vpliv polimernih vodovodnih cevi na kakovost pitne vode. V bodoče bomo morali že pri proizvodnji polimerov, ki se uporabljajo za izdelavo vodovodnih cevi, upoštevati vpliv dodatkov v polimerih na okolje. Prav tako bomo morali posvečati veliko pozornost novim spojinam, ki lahko nastanejo pri kloriranju pitne vode. Zato bi bilo potrebno uvesti monitoring sterično oviranih fenolov in njihovih derivatov v vodah po postopku dezinfekcije.

Literatura

1. P.Tombouliau, L. Schweitzer, K. Mullin, J. Wilson, D. Khiari, Materials used in drinking water distribution systems: contribution to taste and odor, *Water Science and Technology*, 2004, 49, 9, 219-226
2. L. Schweitzer, P.Tombouliau, K. Atasi, T. Chen, D. Khiari, Utility quick test for analyzing materials for drinking water distribution systems for effect on taste and odor, *Water Science and Technology*, 2004, 49, 9, 75-80
3. M. Dailloux, M. Albert, C.laurian, S. Andolfatto, A. Lozniewski, P. Hartemann, L. Mathieu, Mycobacterium xenopi and Drinking Water Biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 6946-6948
4. T. H. Heim, A.M. Dietrich, Sensory aspects and water quality impacts of chlorinated and chloraminated drinking water in contact with HDPE and cPVC pipe, *Water research* 2007, 41, 757-764
5. W. K. Alexander, G. B. Briggs, K. R. Still, W.W. Jederberg, K. MacMahon, W. H. Baker, C. MacKer, Toxicity of 2,6-di-tert-butyl-4-nitrophenol (DBNP), *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 2001, 16, 4, 487-495
6. J.A. Rivera-Nevares, J.F. Wyman, D.L. von Minden, N. Lacy, M.L. Chabinyc, A.V. Fratini, D.A. Macys, Facile synthesis and physical and spectral characterization of 2,6-di-tert-butyl-4-nitrophenol (DBNP): a potentially powerful uncoupler of oxidative phosphorylation, *Environmental toxicology and chemistry*, 1995, 14, 2, 251-256
7. C.D. Selassie, R.P.Verma, S.Kapur, A.J.Shusterman, C. Hansch, QSAR for the cytotoxicity of 2-alkyl or 2,6-dialkyl, 4-X phenols: the nature of the radical reaction, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2002, 2, 1112-1117

8. D. Broca, E. Arvin, H. Mosbaek, Identification of organic compounds migrating from polyethylene pipelines into drinking water, *Water Research*, **2002**, 36
9. E. Vončina, B. Križanec, Organske spojine v pitnih vodah pri uporabi plastičnih cevi. *Slovenski kemijski dnevi 2008*, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2008,