

# Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija polibromiranih difenil etera iz ljudskog mlijeka

---

**Besednik, Lucija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:789551>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-08**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Lucija Besednik

# **Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija polibromiranih difenil etera iz ljudskog mlijeka**

## **Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistre kemije

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je u laboratoriju Jedinice za biokemiju i organsku analitičku kemiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada pod mentorstvom dr. sc. Darije Klinčić, znanstvenog suradnika i neposrednim mentorstvom dr. sc. Marije Dvorščak.

Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Nives Galić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Razvoj, validacija i primjena analitičkih metoda za određivanje PBDE-a (HrZZ-UIP-2017-05-6713).

## Zahvale

*Dragim mentoricama, dr. sc. Dariji Klinčić, dr. sc. Mariji Dvorščak i mag. chem. Karli Jagić...*

*Od srca Vam hvala na ukazanom povjerenju, prenesenom znanju, učenju, mentoriranju i pomoći prilikom izrade i pisanja ovog rada. Bez Vas ovaj rad ne bi bio to što je. Hvala Vam na svim savjetima i prilici koju ste mi pružile. Bez obzira što je ovaj rad zapravo završetak našeg druženja, neizmjereno mi je drago što uz Vas imam priliku završiti svoje školovanje. Posebno se želim zahvaliti dr. sc. Mariji koja je uvijek bila tu za mene i koja me je uz mentoricu vodila kroz cijeli ovaj period.*

*Nastavnom osoblju Kemijskog odsjeka...*

*Hvala Vam svima na prenesenom znanju i pruženoj prilici da mogu učiti od Vas. Posebna zahvala profesorima, docentima i asistentima Zavoda za analitičku kemiju i Zavoda za biokemiju od kojih sam imala priliku učiti prethodne dvije godine i zbog kojih znam u kojem usmjerenju želim ići!*

*Mojim prijateljima...*

*Hvala što ste mi uljepšali godine studiranja, na svim suzama i smijehu i neizmjerenoj podršci koju ste mi dali.*

*Mojoj obitelji...*

*Mami, tati, Noni, Tini i Niki. Hvala Vam na bezuvjetnoj podršci, motivaciji i sigurnosti tijekom svih ovih godina. Zbog Vas sam na kraju dana imala sigurno mjesto za smiriti svoje strahove, ali i sanjati svoje snove te izgraditi sebe u osobu koja sam danas. Bez Vas sve ovo ne bi bilo moguće i od srca Vam hvala na svemu što jeste!*

*Za kraj...*

*Dragi PMF, na svemu ti hvala!*

# Sadržaj

<b>SAŽETAK</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>3</b>
2.1. Fizikalno-kemijska svojstva polibromiranih difenil etera .....	3
2.2. Primjena polibromiranih difenil etera, izvori njihove emisije i raspodjela u okolišu .....	4
2.3. Toksičnost polibromiranih difenil etera.....	6
2.4. Analiza polibromiranih difenil etera.....	7
2.5. Razine polibromiranih difenil etera u ljudskom mlijeku .....	13
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>18</b>
3.1. Analizirani spojevi .....	18
3.2. Kemikalije.....	19
3.3. Instrumenti i pribor .....	19
3.4. Priprava standardnih otopina.....	20
3.5. Uzorci ljudskog mlijeka.....	21
3.5.1. Priprava uzoraka za liofilizaciju i liofilizacija .....	21
3.6. Analitički postupci određivanja polibromiranih difenil etera u ljudskom mlijeku .....	21
3.6.1. Optimiranje parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima spojeva PBDE iz uzorka ljudskog mlijeka .....	21
3.6.2. Postupak pročišćavanja ekstrakata.....	25
3.6.3. Priprava uzoraka za određivanje djelotvornosti metode .....	25
3.7. Plinskokromatografska analiza .....	26
3.7.1. Radni uvjeti .....	26
3.7.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza .....	26
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>28</b>
4.1. Linearnost odziva detektora i granice detekcije.....	28
4.2. Optimiranje uvjeta ekstrakcije potpomognute mikrovalovima polibromiranih difenil etera iz ljudskog mlijeka .....	31
4.2.1. Djelotvornost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima polibromiranih difenil etera iz tekućih uzoraka ljudskog mlijeka .....	32
4.2.2. Djelotvornost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima polibromiranih difenil etera iz liofiliziranih uzoraka ljudskog mlijeka.....	33

---

4.2.3. Djelotvornost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima polibromiranih difenil etera iz liofiliziranih uzoraka ljudskog mlijeka s dodatkom ultračiste vode.....	35
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>40</b>
<b>§ 6. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>42</b>
<b>§ 7. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>VIII</b>



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija polibromiranih difenil etera iz ljudskog mlijeka

Lucija Besednik

Razrađeni su uvjeti ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) za polibromirane difenil etere (PBDE) iz uzoraka ljudskog mlijeka. Istražen je utjecaj načina pripreme uzorka te su optimirani uvjeti tehnike MAE (vrsta i volumen otapala, temperatura ekstrakcije). Pročišćeni ekstrakti analizirani su plinskom kromatografijom uz detektor zahvata elektrona. Tehnika MAE pokazala je zadovoljavajuću djelotvornost za ekstrakciju spojeva PBDE iz uzoraka ljudskog mlijeka u tekućem stanju, dok u slučaju liofiliziranog uzorka mlijeka nije bila djelotvorna. Postupak ekstrakcije spojeva PBDE tehnikom MAE iz liofiliziranog ljudskog mlijeka otopljenog u ultračistoj vodi smjesom otapala  $\varphi$  (*n*-heksan, aceton) = 1:1 uz dodatak mravlje kiseline i propan-2-ola pri temperaturi od 80 °C tijekom 20 minuta izdvojen je kao najprikladniji. Analitički povrat spojeva bio je u rasponu od 61 % za BDE-47 do 83 % za BDE-183, uz relativnu standardnu devijaciju 7 %. U uzorku korištenom za razradu metode analiziranom bez dodatka analita pri odabranim uvjetima detektiran je samo BDE-153 (0,19 ng g<sup>-1</sup> masti).

(41 stranica, 10 slika, 7 tablica, 53 literaturnih navoda)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ljudsko mlijeko, plinska kromatografija, polibromirani difenil eteri

Mentor: dr. sc. Darija Klinčić, znanstveni suradnik

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Nives Galić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
  2. doc. dr. sc. Morana Dulić
  3. prof. dr. sc. Željka Soldin
- Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Datum diplomskog ispita: 18. rujna 2020.



University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Chemistry

Diploma Thesis

## ABSTRACT

Microvawe-assisted extraction of polybrominated diphenyl ethers from human milk

Lucija Besednik

Microwave-assisted extraction (MAE) procedures for polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) from human milk samples have been studied. The influence of the sample preparation method was investigated and the conditions of the MAE technique (type and volume of solvent, extraction temperature) were optimized. The purified extracts were analyzed by gas chromatography with an electron capture detector. The MAE technique has shown satisfactory efficiency for the extraction of PBDEs from liquid milk samples, while in the case of a lyophilized milk sample it was not effective. The process of extraction of PBDEs by MAE technique from lyophilized human milk dissolved in ultrapure water with a mixture of solvent  $\varphi$  (*n*-hexane, acetone) = 1: 1 with the addition of formic acid and propan-2-ol at a temperature of 80 ° C for 20 minutes was selected as the most suitable. Analytical recoveries of selected analytes ranged from 61 % for BDE-47 to 83 % for BDE-183, with a relative standard deviation of 7 %. In the sample used for method development, analyzed without the addition of analytes under selected conditions, only BDE-153 was detected (0,19 ng g<sup>-1</sup> lipid).

(41 pages, 10 figures, 7 tables, 53 references)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: gas chromatography, human milk, microwave-assisted extraction, polybrominated diphenyl ethers

Mentor: Dr. Darija Klinčić, Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Nives Galić, Professor

Reviewers:

1. Dr. Nives Galić, Professor
  2. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
  3. Dr. Željka Soldin, Professor
- Substitute: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Date of exam: 18<sup>th</sup> September 2020



## § 1. UVOD

Polibromirani difenil eteri (engl. *Polybrominated Diphenyl Ethers*, PBDE) su klasa bromiranih usporivača gorenja te su ciljano proizvedeni u svrhu smanjenja zapaljivosti tretiranih materijala, sprječavanja nastanka požara ili usporavanja njegovog širenja. Njihova komercijalna proizvodnja i upotreba počela je 60-tih i 70-tih godina prošlog stoljeća, a dodavani su velikom broju proizvoda, npr. tekstilnim materijalima, poliuretanskim pjenama koje su korištene kao punila za namještaj i sjedala automobila i aviona, te različitim elektroničkim i električnim aparatima.<sup>1</sup>

Široka upotreba izomera spojeva PBDE dovela je ubrzo do povećanja njihovih koncentracija u svim dijelovima okoliša, uključujući i žive organizme poput životinja i ljudi. Nakon što se utvrdilo da ovi spojevi posjeduju svojstva postojanih organskih zagađivala (engl. *Persistent Organic Pollutants*, POPs), kao što su postojanost u okolišnim uvjetima, mogućnost prijenosa zračnim masama na vrlo velike udaljenosti od mjesta primjene ili proizvodnje te lipofilnost, sposobnost bioakumulacije i toksičnost za okoliš i ljude, krenule su zabrane njihove upotrebe i proizvodnje. Posljedično, razine spojeva PBDE u okolišu i ljudima postepeno se smanjuju, međutim zbog njihovih svojstava, rasprostranjenosti, te činjenice da recikliranjem predmeta koji su bili tretirani tim spojevima oni ponovo dolaze u uporabu, bit će prisutni u živom i neživom dijelu okoliša još dugu niz godina.<sup>2,3</sup>

Što se tiče izloženosti opće populacije ljudi izomerima spojeva PBDE, dva su dominantna puta njihovog unosa u ljudski organizam. Jedan je putem hrane, i to prvenstveno hrane životinjskog podrijetla s većim udjelom masti (riba, meso, mliječni proizvodi), gdje se spojevi PBDE akumuliraju zbog svoje lipofilnosti,<sup>4</sup> dok je drugi putem ingestije i udisanja prašine.<sup>5,6</sup> Istraživanja ukazuju da niz čimbenika, kao npr. životna dob, način ishrane, mjesto stanovanja, zanimanje, blizina potencijalnih izvora zagađenja i mnogi drugi, utječe na to koji će put unosa u većoj mjeri doprinijeti ukupnoj izloženosti određene populacije ljudi.<sup>7-9</sup> Iznimku čini dojenačko razdoblje za koje su mnoga istraživanja pokazala da je tada ljudski organizam u najvećoj mjeri izložen unosu organskih zagađivala putem hrane.<sup>10</sup> Prema preporukama svjetske zdravstvene organizacije dojenje bi trebalo biti jedini način prehrane do šestog mjeseca starosti djeteta. Ljudsko mlijeko poznat je i široko korišten bioindikator ljudske izloženosti raznim zagađivačima, posebno lipofilnim koji se vežu na mast u mlijeku te

se tamo nakupljaju. Putem dojenja spojevi akumulirani u ljudskom mlijeku direktno prelaze u organizam dojenčeta, a ono zbog svoje male mase na taj način dobiva najveću dozu izraženo po kilogramu tjelesne mase. Na razine izomera spojeva PBDE u ljudskom mlijeku utječe više faktora, a kod roditelja koje im nisu profesionalno izložene i ne žive u blizini izvora tih spojeva u najvećoj mjeri su to njihove prehrambene navike.<sup>8,11</sup>

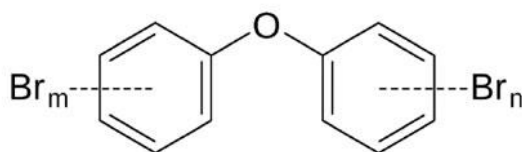
Analitički postupci određivanja izomera spojeva PBDE u ljudskom mlijeku uključuju sakupljanje uzorka, ekstrakciju spojeva pogodnim otapalom, pročišćavanje ekstrakta te kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Analiza se najčešće provodi plinskom kromatografijom visokog razlučivanja uz upotrebu detektora zahvata elektrona i/ili detekciju spektrometrijom masa.<sup>12</sup> Uz niske masene udjele izomera spojeva PBDE (reda veličine  $\text{ng g}^{-1}$  masti), analizu otežavaju i interferirajući spojevi i sastojci matrice uzorka čiji su udjeli često viši od udjela ciljanih analita. Stoga je izuzetno važno da je svaki dio analitičkog postupka što djelotvorniji i selektivniji.

Svrha ovog rada je razraditi i optimirati učinkovit postupak ekstrakcije sedam kongenera PBDE iz uzoraka ljudskog mlijeka primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (engl. *Microwave-Assisted Extraction*, MAE). Ispitan je utjecaj različitih parametara na učinkovitost postupka ekstrakcije od kojih je glavni odabir odgovarajućeg otapala. Do sada u literaturi nema podataka o primjeni MAE za ekstrakciju izomera spojeva PBDE iz uzoraka ljudskog mlijeka.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Fizikalno-kemijska svojstva polibromiranih difenil etera

Skupina spojeva PBDE ima strukturu bromirane molekule s dva benzenska prstena spojena kisikovim atomom. Deset je pozicija na molekuli na kojima bromov atom može zamijeniti vodikov, te postoji 10 homolognih grupa s prefiksima mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, heksa-, hepta-, okta-, nona- i deka-. Ovisno o broju i položaju bromovih atoma postoji 209 izomera i homologa spojeva PBDE koji se nazivaju kongenerima. Oni se prema Međunarodnoj uniji za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union for Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) označavaju brojevima od 1 do 209. Opća strukturna formula ovih spojeva je  $C_{12}H_{(9-0)}Br_{(1-10)}O$ , gdje je zbroj atoma vodika i broma uvijek jednak 10 (**slika 2.1**). Raspon molarnih masa kongenera PBDE je od 328 do 959  $g\ mol^{-1}$ .



**Slika 2. 1.** Opća strukturna formula polibromiranih difenil etera

Izomeri spojeva PBDE razlikuju se po svojim fizikalno-kemijskim svojstvima što dovodi do razlika u njihovom ponašanju i rasprostranjenosti u okolišu. Vrelište spojeva skupine PBDE je između 310 °C i 450 °C,<sup>13</sup> a radi se o hidrofobnim spojevima sa logaritamskim vrijednostima koeficijenta razdjeljenja između *n*-oktanola i vode ( $\log K_{ow}$ ) u rasponu od 5,08 za mono-BDE do 8,70 za deka-BDE.<sup>14</sup> Porastom broja bromovih atoma povećavaju se vrijednosti  $\log K_{ow}$ , odnosno lipofilnost spojeva, dok se topljivost u vodi i tlak pare snižavaju.<sup>14</sup> Dakle, povećanjem stupnja bromiranosti smanjuje se tendencija spojeva skupine PBDE da se otope u vodi ili zadrže u plinovitom obliku u atmosferi. Spojevi PBDE supstituirani s većim brojem Br atoma skloniji su sorbiranju na čestice u zraku ili na čestice u vodi. Mogućnost transporta zrakom na veće udaljenosti veća je za spojeve PBDE supstituirane s manjim brojem Br atoma zbog većeg tlaka pare, dok je za one s većim brojem

Br atoma prijenos na veće udaljenosti povezan s udaljenošću koju čestice mogu prijeći u atmosferi.

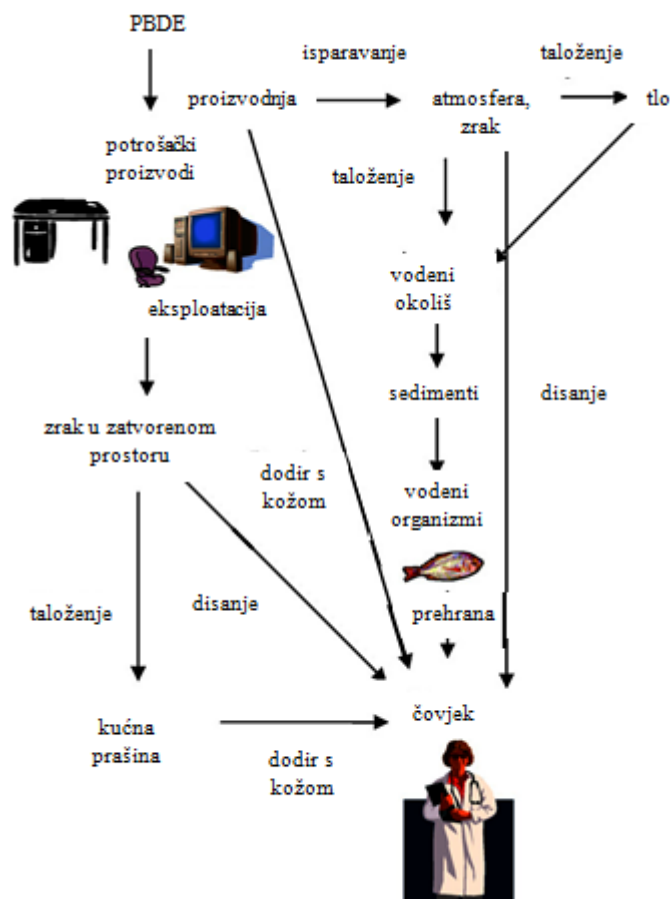
## 2.2. Primjena polibromiranih difenil etera, izvori njihove emisije i raspodjela u okolišu

Polibromirani difenil eteri sintetski su spojevi koji se ne nalaze u prirodi. Njihova proizvodnja i upotreba započela je u drugoj polovici 20. stoljeća i više od pola stoljeća su upotrebljavani kao usporivači gorenja.<sup>1</sup> Na tržištu su spojevi PBDE bili dostupni kao tri glavne formulacije: „penta“, „okta“ i „deka“, koje su se sastojale od relativno malog broja kongenera navedenih spojeva, a nazvane su prema stupnju bromiranosti najzastupljenije skupine kongenera. Dodavani su tekstilima, fleksibilnim poliuretanskim pjenama korištenim za izradu namještaja i sjedala za automobile/avione, električnim i elektroničkim komponentama te plastičnim materijalima korištenim za izradu kućišta televizora, osobnih računala i druge elektroničke opreme. Tipičan dodatak komercijalnih formulacija spojeva skupine PBDE varirao je od 5 % do 30 % mase materijala u koji su dodavani.<sup>14</sup>

Spojevi skupine PBDE su vrlo postojani u okolišu te je dokazana njihova prisutnost u svim dijelovima svijeta. Skloni su bioakumulaciji i biomagnifikaciji u kopnenim i morskim hranidbenim lancima, i toksični su za ljude i životinje. Zbog toga su dodani na popis spojeva obuhvaćenih *Stockholmskom konvencijom o postojanim organskim onečišćujućim tvarima*. Njome se propisuju uvjeti koje svaka stranka potpisnica Konvencije mora ispuniti kako bi se na globalnoj razini ukinula proizvodnja, uporaba, uvoz i izvoz postojanih organskih spojeva, s ciljem zaštite ljudskog zdravlja i okoliša. „Penta“ i „okta“ formulacije dodane su na popis Stockholmske konvencije 2009. godine.<sup>15</sup> Daleko najveći udio na tržištu imala je „deka“ formulacija, čije su proizvodnja i upotreba na europskom i američkom tržištu najkasnije zabranjene, 2017. godine. „Deka“ formulacija se sastoji gotovo isključivo (>97 %) od BDE-209, potpuno bromiranog kongenera. Koristila se u različite svrhe, kao dodatak tekstilnim materijalima, plastičnim materijalima za izolaciju žica, mobilnim telefonima, hladnjacima, televizorima te ostaloj električnoj i elektronskoj opremi, ali i građevnom i konstrukcijskom materijalu.<sup>1</sup>

Spojevi skupine PBDE nisu kemijski vezani za materijale u koje su dodavani stoga lako migriraju s predmeta u kojima su prisutni te se otpuštaju u okolni zrak, prašinu, vodu i

tlo, a ulaze i u žive organizme, uključujući i ljude (slika 2.2). Proizvodi koji sadrže materijale tretirane kongenerima spojeva PBDE predstavljaju izvor tih spojeva tijekom cijelog svog vijeka trajanja: od procesa proizvodnje, preko upotrebe/primjene, pa sve do odlaganja na odlagalištima otpada i tijekom procesa recikliranja.<sup>16</sup>



Slika 2.2. Kruženje spojeva PBDE u prirodi<sup>16</sup>

Prvi primalac spojeva PBDE je zrak gdje se oni zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava mogu vezati na organske čestice koje se nalaze u zraku ili ostaju u plinskoj fazi. Zrakom se prenose na velike udaljenosti te dopijevaju u vodu i tlo, a živi organizmi ih udišu. Osim taloženjem iz atmosfere, u vodeni okoliš spojevi PBDE dopijevaju i otpuštanjem u vodene tokove sa otpada na odlagalištima. U vodi se apsorbiraju na organske frakcije sedimenta, suspendirane čestice u vodi ili ulaze u vodene organizme. Procesom bioakumulacije nakupljaju se u tkivima organizama koja su bogata lipidima te na ovaj način ulaze u hranidbeni lanac.<sup>15</sup>

Dva glavna puta unosa spojeva PBDE u ljude su putem prehrane i prašine - ingestijom, inhalacijom ili putem kože, iako se smatra da put unosa ovih spojeva putem kože nije od većeg značaja. Mnogobrojna istraživanja ukazuju da je glavni izvor izloženosti za ljude hrana životinjskog podrijetla sa većim udjelom masti poput ribe, mesa i mliječnih proizvoda, gdje se navedeni spojevi akumuliraju zbog njihove lipofilnosti.<sup>4,17,18</sup> S druge strane, paralelna analiza hrane i bioloških uzoraka dovela je do spoznaja o značajnom unosu izomera spojeva PBDE putem prašine, koji se u nekim slučajevima istaknuo kao dominantan put unosa ovih spojeva u ljudski organizam.<sup>2,19,20</sup> Zbog svojstva lipofilnosti u ljudskom se organizmu zadržavaju u tkivima bogatim mastima poput seruma, plazme, ljudskog mlijeka te masnog tkiva.<sup>21-24</sup>

Tijekom godina porasla je svijest o štetnom utjecaju gomilanja elektroničkog otpada, odnosno odbačenih električnih i elektroničkih uređaja. Obzirom na brzi razvoj tehnologije, elektronički uređaji sve brže zastarijevaju tako da je elektronički otpad danas jedna od najbrže rastućih vrsta otpada. Taj otpad, osim sirovina koje se recikliranjem mogu ponovo iskoristiti, sadrži i toksične spojeve, između ostalog i izomere spojeva PBDE, koji se otpuštaju u okoliš procesima ispiranja, isparavanja ili kao produkti izgaranja otpada. Stoga je nužno pravilno skladištiti elektronički otpad i kontrolirati procese njegovog recikliranja.<sup>2,25</sup> Kao posljedica zagađenja okoliša u blizini mjesta za odlaganje ili recikliranje elektroničkog otpada, povišeni maseni udjeli izomera spojeva PBDE izmjereni su u zraku<sup>26</sup>, tlu i prašini<sup>2</sup> ali i u mlijeku roditelja koje su različiti vremenski period života provele u blizini mjesta za recikliranje elektroničkog otpada.<sup>7</sup>

### 2.3. Toksičnost polibromiranih difenil etera

Iako su u različitim biološkim uzorcima pronađeni mjerljivi maseni udjeli spojeva PBDE, o mehanizmu njihovog toksičnog djelovanja i štetnom utjecaju na ljudsko zdravlje malo se zna. Procjena toksičnosti ovih spojeva uglavnom se temelji na rezultatima istraživanja provedenim na životinjskim modelima.

Nađeno je da „penta” smjesa uzrokuje štetne učinke pri najmanjim dozama dok se „deka” smjesa generalno smatra najmanje toksičnom. Uočeni učinci „penta” smjese odnose se na neurobiheviornalne poremećaje i poremećaje u radu štitne žlijezde kod potomstva, „okta” smjesa kod štakora i zečeva primarno povećava fetalnu toksičnost/teratogenost, a „deka”

smjesa kod odraslih životinja uzrokuje morfološke promjene štitnjače, jetre i bubrega. Studije ispitivanja kancerogenosti, provedene samo za „deka” smjesu, pokazale su neke učinke kod vrlo visokih doza te je Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) zaključila da „deka” smjesa nije kancerogena za ljude.<sup>27</sup>

Epidemiološke studije pokazale su da je izloženost polibromiranim difenil eterima tijekom prenatalnog perioda povezana sa nižom razinom tireoidnog stimulirajućeg hormona (TSH), nižim kvocijentom inteligencije i smanjenim razvojem kognitivnih i motoričkih sposobnosti. Postnatalna izloženost povezana je također sa nižim kvocijentom inteligencije te uvećanom učestalosti hiperaktivnog i agresivnog ponašanja.<sup>28</sup> Jedno od mogućih objašnjenja za navedene učinke je promjena statusa hormona štitnjače. Naime, razvoj neurološkog sustava u velikoj mjeri ovisi o hormonima štitnjače, posebice tiroksinu (T4), koji ima sličnu stereokemijsku strukturu kao spojevi PBDE te se njihovim vezanjem na receptore hormona štitnjače ometa proizvodnja hormona.<sup>29</sup> Obzirom na važnost hormona u ljudskoj fiziologiji i činjenicu da su spojevi PBDE potencijalni endokrini modulatori (disruptori), odnosno da djeluju na način da ometaju biosintezu, izlučivanje, djelovanje ili metabolizam prirodnih hormona, postoji zabrinutost oko potencijalnog negativnog djelovanja endokrinih disruptora na zdravlje djece, reprodukciju, rani i adolescentni razvoj te ponašanje. U ljudskom organizmu je vrijeme poluživota spojeva skupine PBDE otprilike od 1,8 do 6,5 godina.<sup>30</sup>

#### **2.4. Analiza polibromiranih difenil etera**

Niske koncentracije analita, složeni sastav uzoraka i mnogobrojne interferencije glavni su razlozi što je analiza izomera spojeva PBDE u okolišnim i biološkim uzorcima složen i dugotrajan postupak. Nakon prikupljanja uzoraka, prema potrebi određene predobrade uzoraka te skladištenja, slijedi izdvajanje ciljnih analita iz matrice, instrumentna analiza i na kraju obrada podataka.

### 2.4.1 Uzorkovanje

Uzorci ljudskog mlijeka skupljaju se od prvorotki ili višerotki u različito doba laktacije, ovisno o potrebama istraživanja. Mlijeko je za potrebe daljnje analize potrebno pravilno skladištiti te se iz tog razloga uzorci ili liofiliziraju ili se čuvaju zamrznuti do analize. Neposredno prije analize potrebno je uzorke mlijeka dobro homogenizirati.

### 2.4.2 Ekstrakcija

Ekstrakcija je analitička separacijska tehnika koja se temelji na odvajanju analita iz krutine, suspenzije ili otopine uz pomoć otapala u kojem su ciljani analiti topljiviji. Ekstrakcijom se izdvajaju ciljani analiti iz matrice uzorka, a odabir tehnike ekstrakcije ovisi o dostupnoj instrumentaciji ispitnog laboratorija i tipu uzorka. Često se prije ekstrakcije dodaje sredstvo za denaturaciju proteina u mlijeku, te se u tu svrhu najčešće koriste kalijev ili natrijev oksalat, mravlja kiselina, etanol i smjesa klorovodične kiseline i propan-2-ola.<sup>7,8</sup>

Općenito se ljudsko mlijeko može analizirati u tekućem stanju ili u čvrstom stanju u koje ga se može prevesti postupkom liofilizacije. Za tekuće se uzorke najčešće primjenjuju tehnika ekstrakcije tekuće-tekuće te ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE). Za ekstrakciju čvrstih uzoraka koriste se ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu (engl. *Soxhlet extraction*), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *Ultrasound-assisted Extraction*, USE), ekstrakcija uz povišen tlak i temperaturu (engl. *Pressurised Liquid Extraction*, PLE, naziva se još i *Accelerated Solvent Extraction*, ASE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *Microwave-Assisted Extraction*, MAE) i ekstrakcija fluidom pri superkričnim uvjetima (engl. *Supercritical Fluid Extraction*, SFE).

Ekstrakcija tekuće-tekuće učinkovita je, jeftina i brza tehnika odvajanja i ukoncentriravanja analita koja se i danas vrlo često koristi za ekstrakciju spojeva PBDE iz ljudskog mlijeka.<sup>31-33</sup> Temelji se na razdiobi tvari između dva otapala koja se ne miješaju.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi tehnika je ekstrakcije koja se temelji na odvajanju analita iz matrice uzorka selektivnim vezanjem analita na sorbens. Za učinkovito odjeljivanje analita potrebna je jaka interakcija između analita i sorbensa. Učinkovitost ekstrakcije ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima sorbensa, polarnosti otapala, ionskoj jakosti, pH vrijednosti, brzini protoka i topljivosti spoja u izabranom otapalu.<sup>8</sup>



Jedna od najjednostavnijih tehnika ekstrakcije je ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu. Ova tehnika temelji se na kontinuiranoj ekstrakciji analita pogodnim otapalom koje kruži kroz aparaturu, a pokazala se učinkovitom za ekstrakciju spojeva PBDE iz ljudskog mlijeka.<sup>11,34</sup> Utrošak velikih volumena otapala te dugo trajanje njeni su glavni nedostaci te ju se nastoji zamijeniti tehnikama kraćeg vremena ekstrakcije te ekonomičnijeg utroška otapala.

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom jednostavan je postupak ekstrakcije u kojem se analiti iz uzorka ekstrahiraju odgovarajućim organskim otapalom u ultrazvučnoj kupelji. Prednosti ovog postupka su što ne zahtijeva skupu instrumentaciju te relativna brzina i jednostavnost. Nedostaci su veliki volumen otapala i moguća potreba za višekratnom ekstrakcijom radi postizanja zadovoljavajuće djelotvornosti.<sup>7,35</sup>

Često korištena tehnika ekstrakcije spojeva PBDE iz uzoraka ljudskog mlijeka je ekstrakcija uz povišen tlak i temperaturu. Tehnika je primjenjiva za čvrste i polučvrste uzorke, što uvjetuje korištenje liofiliziranih uzoraka ljudskog mlijeka za ekstrakciju.<sup>22,30,36–39</sup> Uzorak, često pomiješan sa sredstvom za sušenje, smješten je pri određenoj temperaturi i tlaku u ekstrakcijskoj posudi od nehrđajućeg čelika u koju se uz pomoć pumpe dovodi otapalo za ekstrakciju. Visoka učinkovitost ekstrakcije postiže se primjenom organskog otapala koje se pod tlakom zadržava u tekućem stanju pri temperaturama višim od njegova vrelišta. Povišena temperatura povećava brzinu difuzije, topljivost analita i time ubrzava ekstrakciju. Ekstrakcija se provodi pri temperaturama do 200 °C i tlakovima do 20 MPa. Visoki tlak može olakšati ekstrakciju spojeva koji se nalaze u porama matrice uzorka. Komercijalno dostupni sustavi ASE mogu se lako automatizirati i omogućavaju istovremenu ekstrakciju do 24 uzorka. Glavni nedostaci ove tehnike su nužnost pročišćavanja ekstrakta te relativno visoka cijena opreme.

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima je tehnika u kojoj se mikrovalnom energijom zagrijava otapalo koje je u kontaktu s uzorkom i time pospješuje prijelaz spojeva od interesa iz uzorka u otapalo. Priroda otapala je vrlo važan čimbenik koji utječe na djelotvornost svake vrste ekstrakcije, a najvažnije svojstvo otapala za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima je polarnost izražena dielektričnom konstantom. U pravilu, otapalo s većom dielektričnom konstantom (polarnije otapalo) apsorbira veću količinu mikrovalova, jače se zagrijava i djelotvornije ekstrahira spojeve iz matrice uzorka. U praksi se za ekstrakciju spojeva PBDE iz različitih vrsta uzoraka često koriste smjese polarnih i nepolarnih otapala. Kako se analiti lakše akumuliraju u kemijski sličnom otapalu, za

ekstrakciju spojeva poput skupine PBDE nužno je nepolarnom otapalu kao što je *n*-heksan dodati i polarno otapalo, kako bi došlo do apsorpcije mikrovalne energije. Pri tom je potrebno optimirati omjer polarnog i nepolarnog otapala kako bi se omogućilo održavanje temperature smjese otapala ispod kritične, jer nepolarna otapala slabo apsorbiraju mikrovalove ili ih propuštaju te se stoga ne zagrijevaju. Temperatura i vrijeme ekstrakcije su također bitni parametri koji utječu na učinkovitost ove metode ekstrakcije. Ekstrakcija je djelotvornija pri višim temperaturama, jer se povećava difuzija otapala u unutarnje dijelove matrice uzoraka i olakšava desorpcija sastojaka s aktivnih mjesta matrice.

Osnovne prednosti korištenja tehnike MAE su vrijeme trajanja same ekstrakcije koje je kraće u odnosu na neke klasične metode, upotreba manjih volumena otapala, prinosi ekstrahiranih analita su viši nego kod klasičnih tehnika, te automatizacija i mogućnost obrade većeg broja uzoraka istovremeno. Ono što se izdvaja kao nedostatak je činjenica da ona ne može biti primijenjena na uzorke koji sadrže spojeve koji su termički nestabilni ili se raspadaju duljim izlaganjem povišenoj temperaturi. Nakon završene ekstrakcije, potrebno je određeno vrijeme hlađenja reakcijske posude, a ekstrakti zahtijevaju daljnje pročišćavanje.

#### 2.4.3. Pročišćavanje

Postupkom ekstrakcije se osim spojeva od interesa iz matrice uzorka ekstrahira i niz nepolarnih i slabo polarnih interferirajućih spojeva koji su podjednako dobro topljivi u organskim otapalima. Ti spojevi negativno utječu na selektivnost i djelotvornost kromatografskog razdvajanja, povećavaju nesigurnost analize te umanjuju točnost i preciznost analitičkog postupka, stoga ih je potrebno u što većoj mjeri ukloniti iz ekstrakta za što su u većini slučajeva potrebni iscrpni postupci pročišćavanja.

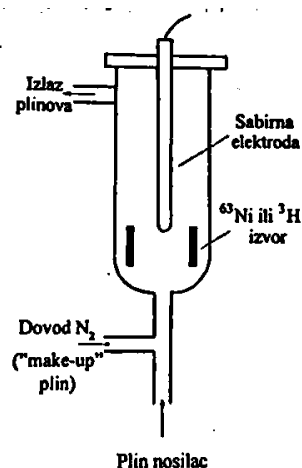
Ovisno o vrsti analita i uzorka pročišćavanje se može sastojati od jednog ili više uzastopnih koraka. Tip pročišćavanja ekstrakata uvelike ovisi o analiziranom uzorku. Jedan od najjednostavnijih načina pročišćavanja ekstrakta ljudskog mlijeka je njegovo mućkanje s koncentriranom sumpornom kiselinom. Dodatak koncentrirane sumporne kiseline destruktivna je tehnika koja se često koristi za uklanjanje masti u analizi spojeva PBDE u uzorcima ljudskog mlijeka, ali i kod drugih vrsta uzoraka sa većim udjelom masti.<sup>34,40</sup> Prema potrebi se ovaj korak može ponoviti više puta kako bi se uzorak do kraja pročistio. Kao nedestruktivna tehnika za uklanjanje masti često se upotrebljava gel propusna kromatografija

(engl. *Gel Permeation Chromatography*, GPC) kojom se spojevi odvajaju na temelju različitih molekulskih masa, odnosno različitih veličina molekula.<sup>8,34,36</sup>

Jedna od danas najčešće korištenih tehnika pročišćavanja ekstrakata, s mnogo različitih modifikacija, je pročišćavanje adsorpcijskom kromatografijom na sorbensima kao što su silikagel, aluminijev oksid i florisil. Silikagel može biti aktiviran vodom, deaktiviran sušenjem ili modificiran s kiselinom ili lužinom. Moguće je pripremiti višeslojne stupce različitih sorbensa ili povezati niz od nekoliko kolona s različitim sorbensima. Izborom prikladnih eluenta može se primjenom odgovarajućeg sorbensa ekstrakte istovremeno pročititi i frakcionirati kako bi se ekstrahirani spojevi za analizu odvojili u više frakcija koje sadrže jednu ili više klasa spojeva. Kolone s odgovarajućim sorbensom mogu se pripremiti u laboratoriju, a mnoge su i komercijalno dostupne.<sup>32,36</sup>

#### 2.4.4. Kvalitativna i kvantitativna analiza

Za odvajanje složenih smjesa slabo, ali dovoljno hlapljivih spojeva PBDE i njihovo kvantitativno određivanje, najprimjerenija je i najviše korištena plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) na kapilarnim kolonama. Pri tom se za detekciju analita često upotrebljava detektor zahvata elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD), koji je osjetljiv i selektivan za organohalogene spojeve, ne razara uzorak, prihvatljive je cijene i jednostavan za primjenu i održavanje, a dobivene kromatograme je relativno jednostavno interpretirati. Iz tih je razloga ECD i danas često primjenjivan detektor u analizi spojeva skupine PBDE ekstrahiranih iz različitih vrsta okolišnih i bioloških uzoraka, pa i ljudskog mlijeka.<sup>16,32,41,42</sup> Plin nosilac po izlasku iz kromatografske kolone se ionizira pomoću izvora  $\beta$ -zračenja (elektrona) kao što su  $^{63}\text{Ni}$  ili  $^3\text{H}$  (**slika 2.3**). To uzrokuje nastanak slobodnih elektrona koji uzrokuju stalnu struju elektrona. Elektroni putuju prema sabirnoj elektrodi suprotnog naboja - anodi. Plin nosilac eluira molekule analita s kromatografske kolone te ih nosi u smjeru detektora. Ukoliko je analit molekula sa elektrofilnim skupinama, dolazi do vezanja elektrona na te skupine što uzrokuje smanjenje struje elektrona i to detektor registrira kao kromatografski pik.

Slika 2.3. Detektor zahvata elektrona<sup>43</sup>

Glavni nedostatak ECD detektora je što nije specifičan za pojedini spoj već je njegov odziv podjednak za sve spojeve s istim brojem bromovih atoma u molekuli, a identifikacija spojeva temelji se isključivo na usporedbi vremena zadržavanja ekstrahiranih analita s vremenima zadržavanja standarda. ECD ne omogućava nedvojbenu identifikaciju analita, a zbog mogućeg koeluiranja analita i interferirajućih spojeva rezultati analize mogu biti pogrešni. Stoga je pri detekciji spojeva ECD detektorom nužno postići visoko razlučivanje analiziranih spojeva na kromatografskoj koloni i djelotvorno pročistiti ekstrakte kako bi se uklonili svi interferirajući spojevi iz matrice uzorka. Radi što sigurnije identifikacije spojeva primjenom ECD detektora u ekstraktima ljudskog mlijeka, uzorci se često paralelno analiziraju na dvije kolone različite polarosti. Uz kolonu sa slabo polarnom nepokretnom fazom (najčešće 5 % fenil - 95 % dimetil-polisiloksan) često se za potvrdu rezultata koristi i druga polarnija kolona s koje se analiti ispiru drugačijim redosljedom.<sup>16,32</sup>

Kao plinskromatografski detektor za analizu postojećih organskih zagađivala u ekstraktima različitih uzoraka najviše se koristi spektrometar masa, koji omogućuje veću selektivnost, osjetljivost i preciznost analize te nedvojbenu identifikaciju analiziranih spojeva. Spektrometrija masa omogućuje kvantitativno i kvalitativno određivanje spojeva na temelju dobivenih omjera mase i naboja ( $m/z$ ) fragmenata analiziranih kongenera polibromiranih difenil etera. Najčešće tehnike spektrometrije masa koje se koriste za analizu spojeva PBDE u ljudskom mlijeku su spektrometrija masa niske rezolucije (engl. *Low Resolution Mass Spectrometry*, LRMS) uz ionizaciju elektronima (engl. *Electron Ionization*, EI), negativnu kemijsku ionizaciju (engl. *Negative Chemical Ionization*, NCI) ili puno češće uz ionizaciju niskoenergijskim elektronima (engl. *Electron Capture Negative Ionization*, ECNI) te

spektrometrija masa visoke rezolucije (engl. *High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS) uz ionizaciju elektronima koja se često naziva i „zlatnim standardom“ u analizi postojanih organskih zagađivala koji se u uzorcima nalaze u ultra-tragovima.<sup>12,16</sup>

Spektrometrija masa niske rezolucije je jednostavna tehnika sa relativno pristupačnom cijenom opreme i njenog održavanja te je zato i jedna od najpopularnijih u analizi spojeva PBDE supstituiranih s većim brojem Br atoma. Uz kvadrupolni analizator mase s tehnikama ionizacije EI, NCI i ECNI, tehnika LRMS uspješno je prilagođena za kvantifikaciju polibromiranih difenil etera u ljudskom mlijeku.<sup>12,21,44</sup>

## 2.5. Razine polibromiranih difenil etera u ljudskom mlijeku

Prednost određivanja spojeva PBDE u ljudskom mlijeku u usporedbi s određivanjem u ostalim tipovima ljudskih uzoraka je neinvazivnost tehnike uzorkovanja. Međutim, ograničenja su spol i dob, jer se analizom mlijeka dobivaju samo podaci o izloženosti žena, i to u njihovoj reproduktivnoj dobi. Na razine spojeva PBDE u mlijeku utječe više faktora: redni broj i trajanje laktacije, jer se tim procesom iz tijela majke izlučuju PBDE spojevi; dob majke, jer se pretpostavlja da se s godinama izloženosti povećava količina spojeva PBDE u tijelu; prehrambene navike, jer se smatra da se s većim udjelom hrane životinjskog podrijetla povećava unos spojeva PBDE u organizam. Značajan je i utjecaj mjesta stanovanja i načina života, odnosno provodi li osoba veći dio dana u otvorenom ili zatvorenom prostoru, jer se smatra da je drugi dominantni put unosa PBDE izomera u organizam putem inhalacije ili ingestije kućne prašine, te blizina potencijalnih izvora zagađenja. Na primjer, značajno više masene koncentracije spojeva PBDE detektirane su u uzorcima mlijeka roditelja koje se nisu direktno bavile poslovima vezanim uz recikliranje elektroničkog otpada, ali su više od 20 godina živjele u mjestu gdje se veći dio stanovništva bavi tim poslovima (medijan  $\Sigma_8$ PBDE bio je  $19,5 \text{ ng g}^{-1}$  masti), nego u uzorcima mlijeka roditelja koje nisu živjele na takvom području (medijan  $\Sigma_8$ PBDE bio je  $3,88 \text{ ng g}^{-1}$  masti).<sup>7</sup> Razine izomera spojeva PBDE u ljudskom mlijeku najčešće se prikazuju obzirom na količinu masti, što omogućuje njihovu usporedbu s razinama izmjerenim u krvi ili masnom tkivu. Činjenica da se spojevi PBDE podjednako raspoređuju između tkiva koja sadrže masti<sup>22</sup> omogućuje usporedbu izloženosti ljudi i onda kad nije uzorkovana i analizirana ista vrsta uzorka.

U **tablici 2.1.** izdvojeni su maseni udjeli 7 kongenera PBDE (BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154 i -183) koje se najčešće analizira i detektira u ljudskom mlijeku, te kongenera BDE-209. Dok je u istraživanjima razina spojeva PBDE u okolišnim uzorcima poput prašine<sup>19</sup> te zraka i tla<sup>45</sup> koje uključuju i analizu kongenera BDE-209 on najčešće detektiran u najvišim masenim udjelima, u slučaju ljudskog mlijeka su u većini istraživanja detektirani niži maseni udjeli tog kongenera u odnosu na kongenere BDE-47 i BDE-153.<sup>31</sup> Obzirom da se kongener BDE-209 zadržava u ljudskom organizmu samo do 15 dana prije nego se raspadne, izloženost ovom spoju značajno doprinosi i povećanju udjela ostalih kongenera koji nastaju njegovim raspadom.<sup>8</sup>

Tablica 2.1. Raspon masenih udjela najčešće analiziranih spojeva PBDE u uzorcima ljudskog mlijeka skupljenim širom svijeta

Lokacija / Referenca	Vrijeme uzorkovanja	$\gamma$ / ng g <sup>-1</sup> masti										
		BDE-28	BDE-47	BDE-99	BDE-100	BDE-153	BDE-154	BDE-183	BDE-209			
sjeverozapad SAD-a <sup>45</sup>	2003.	0,26 do 17,4	2,63 do 201,0	0,79 do 49,2	0,50 do 76,5	0,84 do 169,0	0,025 do 3,94	0,006 do 1,55	0,048 do 4,26			
Slovačka <sup>31</sup>	2006. do 2007.	Krompachy	0,16	0,040	0,050	0,15	0,010	0,059	/			
		Košice	0,018	0,042	0,054	0,15	0,011	0,096	/			
		Sal'a	0,017	0,032	0,043	0,12	0,008	0,042	/			
		Nemecká	0,019	0,11	0,023	0,028	0,14	0,009	0,065	/		
Indija <sup>9</sup>	2009.	Kolkata	ND do 0,097	0,17 do 2,5	ND do 0,79	ND do 0,36	ND do 0,17	ND do 0,30	ND	ND do 0,63		
		odlagalište u Kolkati	0,03 do 0,87	0,67 do 3,9	0,017 do 0,36	0,034 do 0,56	0,056 do 1,2	ND do 0,98	ND do 0,20	ND do 0,75		
		Bangalore	0,044 do 0,088	0,087 do 0,70	0,016 do 0,094	0,035 do 0,093	0,046 do 0,25	ND do 0,099	ND	ND do 0,20		
		Chennai	0,045 do 0,088	0,056 do 0,87	ND do 0,099	ND do 0,76	0,023 do 0,98	ND do 0,65	ND do 0,45	0,26 do 2,0		
		Chidambaram	ND do 0,098	0,05 do 0,43	ND do 0,099	ND do 0,11	ND do 0,12	ND do 0,065	ND	ND do 0,44		
		Parangipettai	ND	0,065 do 0,87	ND	ND do 0,077	ND do 0,083	ND	ND	ND do 0,95		
Tunis, Afrika <sup>32</sup>	2010.	ND do 2,75	0,4 do 5,52	ND do 2,41	ND do 3,19	ND do 8,87	ND do 3,70	ND do 7,18	/			
Jug Kine <sup>46</sup>	2012.	0,27 do 2,44	0,48 do 8,36	0,12 do 5,53	ND do 0,55	ND do 7,13	ND do 5,87	ND do 11,03	ND do 0,48			
Uppsala, Švedska <sup>41</sup>	2010.	0,01 do 0,47	0,10 do 2,1	ND do 0,48	0,03 do 1,4	0,21 do 3,4	0,01 do 0,11	ND do 0,04	0,02 do 0,18			
Thessaloniki, Grčka <sup>47</sup>	2004. do 2005.	<0,10 do 0,73	<0,10 do 7,7	<0,10 do 2,9	<0,10 do 3,2	<0,10 do 1,2	<0,10 do 0,39	<0,10 do 0,63	/			
Francuska <sup>48</sup>	2011. do 2014.	0,01 do 0,45	0,06 do 8,67	ND do 2,18	0,02 do 1,79	0,21 do 3,32	0,01 do 0,61	ND do 1,75	0,01 do 11,60			
Danska <sup>48</sup>	1997. do 2002.	0,04 do 6,11	0,21 do 56,21	0,07 do 28,24	0,07 do 25,60	ND do 17,94	ND do 1,17	ND do 1,49	0,01 do 14,16			
Finska <sup>48</sup>	2003. do 2005.	0,12 do 1,09	0,14 do 13,86	0,08 do 3,74	0,12 do 1,70	0,37 do 3,09	0,02 do 0,17	0,01 do 0,10	/			
Kalifornija, SAD <sup>22</sup>	2009. do 2012.	/	4,35 do 723,0	1,03 do 364,0	0,63 do 97,5	0,52 do 107,0	/	/	/			
Wenling, Taizhou, Kina <sup>7</sup>	2012. do 2013.	/	2,63 do 214,0	0,72 do 72,0	0,44 do 39,0	0,22 do 67,3	/	/	/			
UK <sup>18</sup>	2011. do 2012.	0,19 do 2,89	0,40 do 29,0	0,12 do 4,36	0,08 do 2,83	2,24 do 31,6	0,33 do 22,2	0,39 do 4,49	ND do 45,0			
SAD <sup>24</sup>	2004. do 2005.	/	0,32 do 13,1	0,12 do 3,74	/	0,70 do 1,68	/	0,02 do 0,23	<0,19 do 1,04			
Peking, Kina <sup>34</sup>	2014.	0,6 do 17,6	5,39 do 462,5	1,3 do 128,0	0,9 do 65,2	0,7 do 163,4	0,2 do 6,8	0,2 do 2,9	/			
Uganda, Afrika <sup>8</sup>	2018.	0,022 do 0,448	ND do 0,481	ND do 0,228	ND do 0,077	0,091 do 1,02	ND do 0,049	ND do 0,154	ND do 21,8			
/ - nije navedeno; ND - nije detektirano		<0,01 do 0,3	<0,04 do 3,21	<0,03 do 0,91	<0,01 do 0,92	<0,01 do 1,93	<0,01 do 1,21	<0,03 do 1,33	<0,5 do 2,88			

Pregledom literature može se zaključiti da je veći broj istraživanja usmjeren na područje Kine i Amerike, dok je podataka o razinama spojeva skupine PBDE u ljudskom mlijeku skupljenom na području Europe manje. Kako su se spojevi PBDE u najvećoj mjeri i proizvodili i primjenjivali u Americi, posljedično su maseni udjeli tih spojeva izmjereni u uzorcima ljudskog mlijeka skupljenim na tom području viši nego u uzorcima iz drugih dijelova svijeta. Ta je činjenica potvrđena u preglednom radu iz 2017. godine<sup>49</sup> u kojem su sažeti rezultati istraživanja spojeva PBDE u uzorcima ljudskog mlijeka skupljenim u razdoblju od 2000. do 2015. godine. Prema njihovim zaključcima je raspon medijana sume masenih udjela spojeva PBDE u ljudskom mlijeku iz Sjeverne Amerike bio od 19,9 do 54,5 ng g<sup>-1</sup> masti; u mlijeku iz Europe od 0,4 do 6,3 ng g<sup>-1</sup> masti te od 1,5 do 11,5 ng g<sup>-1</sup> masti u mlijeku iz Azije. Kako su razine spojeva PBDE izmjerene u Americi bile 20 puta veće od razina izmjenjenih u Europi i Aziji, takvi rezultati upućuju da su ljudi na području Amerike i dalje u većoj mjeri izloženi skupini spojeva PBDE. S druge strane, rezultati istraživanja Guo i suradnika<sup>22</sup> ukazuju da se i u Americi maseni udjeli spojeva PBDE u ljudskom mlijeku smanjuju. Usporedbom razina spojeva PBDE analiziranih u ljudskom mlijeku skupljenom u razdoblju od 2003. do 2005. godine s rezultatima u uzorcima skupljenim u razdoblju od 2009. do 2012. godine zaključili su da je u promatranom razdoblju došlo do smanjenja masenih udjela analiziranih kongenera PBDE. Raspon sume detektiranih PBDE kongenera u prvom promatranom razdoblju bio je od 10,1 do 1310 ng g<sup>-1</sup> masti (medijan 55,8 ng g<sup>-1</sup> masti), a u drugom promatranom razdoblju od 11,2 do 435 ng g<sup>-1</sup> masti (medijan 36,8 ng g<sup>-1</sup> masti).

Vrlo niski maseni udjeli kongenera PBDE (BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154 i -183) izmjereni su u ljudskom mlijeku skupljenom od prvorotki u Slovačkoj u razdoblju 2006./2007. godine.<sup>31</sup> Raspon sume masenih udjela detektiranih kongenera PBDE bio je od 0,22 do 1,6 ng g<sup>-1</sup> masti, uz medijan od 0,43 ng g<sup>-1</sup> masti. Najveći udio u sumi masenih udjela detektiranih spojeva činili su kongeneri BDE-47 i BDE-153. Istih 7 kongenera analizirano je u ljudskom mlijeku u Grčkoj skupljenom 2004./2005. godine pri čemu je izmjeren nešto širi raspon sume masenih udjela detektiranih spojeva (0,32 do 13 ng g<sup>-1</sup> masti, uz medijan od 1,5 ng g<sup>-1</sup> masti), a kongeneri BDE-47 i BDE-153 su bili najčešće detektirani.<sup>11</sup>

Antignac i suradnici su usporedili razine spojeva PBDE u ljudskom mlijeku iz Francuske (skupljano 2011. do 2014.) te Danske i Finske (skupljano 1997. do 2002.).<sup>48</sup> Maseni udjeli spojeva PBDE su u uzorcima iz Francuske ( $\Sigma_7$ PBDE 0,5 do 15,3 ng g<sup>-1</sup> masti uz medijan 1,5 ng g<sup>-1</sup> masti) bili niži od onih izmjenjenih u uzorcima iz Danske ( $\Sigma_7$ PBDE od



1,2 do 111,1 ng g<sup>-1</sup> masti uz medijan 4,9 ng g<sup>-1</sup> masti) i Finske ( $\Sigma_7$ PBDE od 1,5 do 19,0 ng g<sup>-1</sup> masti uz medijan 5,2 ng g<sup>-1</sup> masti). Iako autori kod usporedbe rezultata nisu uzeli u obzir razliku u vremenu uzorkovanja, jedan od razloga nižih masenih udjela spojeva detektiranih u Francuskoj je i činjenica da su ti uzorci skupljani u vrijeme kada je porasla svijest o štetnosti spojeva PBDE i krenule su stupati na snagu zabrane njihovog korištenja. Autori koji su također usporedili razine spojeva PBDE u uzorcima ljudskog mlijeka iz tri europske države: Norveške (skupljano 2003. do 2006.), Nizozemske (skupljano 2011. do 2014.) i Slovačke (skupljano 2011. do 2012.) su uočene razlike u razinama pripisali upravo razlici u vremenu skupljanja uzoraka. U uzorcima ljudskog mlijeka iz Norveške koji su najranije skupljeni je medijan  $\Sigma_7$ PBDE (2,20 ng g<sup>-1</sup> masti) bio otprilike 2,4 puta viši od onog izmjenog u uzorcima iz Nizozemske, te 4,5 puta viši od onog izmjenog u uzorcima iz Slovačke.<sup>39</sup> Podjednak medijan sume analiziranih kongenera PBDE (BDE-28, -47, -100, -153, -154, -183 i BDE-209) izmjen je u uzorcima ljudskog mlijeka skupljenim 2010. godine u Švedskoj ( $\Sigma_7$ PBDE 0,53 do 6,6 ng g<sup>-1</sup> masti uz medijan 1,5 ng g<sup>-1</sup> masti).<sup>21</sup>

Uvidom u dostupnu literaturu nisu pronađeni podaci o razinama spojeva PBDE u ljudskom mlijeku skupljenom na području Hrvatske, dok je i za države koje ju okružuju pronađen samo rad iz 2007. godine u kojem su izmjerene masene koncentracije 11 kongenera PBDE (BDE-17, -28, -47, -66, -85, -99, -100, -138, -153, -154 i -183) u ljudskom mlijeku skupljenom u Rimu i Veneciji (Italija) u razdoblju 1998. do 2001. godine. Najzastupljeniji kongeneri bili su BDE-47, -99, -100 i -153 čija je suma masenih koncentracija činila i više od 80 % u ukupnoj sumi masenih koncentracija koja je bila u rasponu od 1,6 do 4,1 ng g<sup>-1</sup> masti.<sup>50</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Analizirani spojevi

U ovom radu analizirani su spojevi navedeni u **tablici 3.1.**

**Tablica 3.1.** Kratice i kemijska imena (prema organizaciji IUPAC) kongenera PBDE analiziranih u ovom radu.

Kratice	Kemijsko ime prema IUPAC-u	Prikaz strukture spoja
BDE-28	2, 4, 4'- tribromodifenil eter	
BDE-47	2, 2', 4, 4'- tetrabromodifenil eter	
BDE-99	2, 2', 4, 4',5'- pentabromodifenil eter	
BDE-100	2, 2', 4, 4', 6'- pentabromodifenil eter	
BDE-153	2, 2', 4, 4', 5, 5'- heksabromodifenil eter	
BDE-154	2, 2', 4, 4', 5, 6'- heksabromodifenil eter	
BDE-183	2, 2', 3, 4, 4', 5, 6'- heptabromodifenil eter	

### 3.2. Kemikalije

- standardi pojedinačnih kongenera PBDE: BDE-28, BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154 i BDE-183 ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  u *n*-nonanu) „LGC Standards GmbH“, Wesel, Njemačka
- *n*-heksan za plinsku kromatografiju „Merck KGaA“, Darmstadt, Njemačka
- aceton za plinsku kromatografiju „Merck KGaA“, Darmstadt, Njemačka
- sumporna kiselina, 95 % do 97 %, *p.a.*, „Merck KGaA“, Darmstadt, Njemačka
- etanol „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- mravlja kiselina 98 – 100 %, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- propan-2-ol „Merck KGaA“, Darmstadt, Njemačka
- kloroform „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- metanol J. T. Baker, Avantor Performance Materials, Denville, Nizozemska
- ultračista voda, pripremljena primjenom sustava Mili-Q za pročišćavanje vode, Milipore, Bedford, MA, SAD
- diklormetan „Merck KGaA“, Darmstadt, Njemačka
- acetonitril „Merck KGaA“, Darmstadt, Njemačka
- dušik (99,9995 %), dušik (99,999 %), helij (99,9999 %), SOL SPA, Monza, Italija

### 3.3. Instrumenti i pribor

- plinski kromatograf Agilent 7890B sa dvije kolone i dva detektora zahvata elektrona ( $^{63}\text{Ni}$ ), Agilent, Santa Clara, CA, SAD
- uređaj za mikrovalnu ekstrakciju „MarsX“, CEM Corporation, Matthews, NC, SAD
- teflonske PFA-posude za ekstrakciju, GreenChem Plus, CEM Corporation, Matthews, NC, SAD
- ultrazvučna kupelj „Elmasonic S 60“, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka
- liofilizator LABCONCO FreeZone Plus 2.5 Liter, LABCONCO, Kansas City, MO, SAD
- zamrzivač Ultra-Low Temperature Freezer, New Brunswick, Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka
- uparivač za uparavanje u struji dušika, N-evap, The Meyer, Washington, SAD

- analitička vaga Mettler Toledo PN1201, Greifensee/Zürich, Švicarska
- tehnička vaga Mettler AX205 DeltaRange, Greifensee, Švicarska
- uređaj za potresanje i miješanje „IKA MS 3 control“, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka
- pipete ep T.I.P.S., Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- PP štrcaljke BD DISCARDIT 300928 BX10, 2 mL, King Scientific, West Yorkshire, Velika Britanija
- PTFE-filtri, veličina pora 0,2  $\mu\text{m}$ , Acrodisc CR13, Waters, Milford, MA, SAD

### 3.4. Priprava standardnih otopina

Standardne otopine pojedinačnih kongenera PBDE u *n*-heksanu pripravljene su iz certificiranih izvornih standardnih otopina. Standardna otopina smjese kongenera PBDE u *n*-heksanu (Smjesa 0,  $\gamma = 250 \text{ ng mL}^{-1}$ ) pripravljena je iz pojedinačnih standardnih otopina spojeva PBDE. Daljnjim razrjeđivanjem otopine Smjesa 0 s *n*-heksanom pripremljen je niz standardnih otopina smjese kongenera PBDE korištenim za određivanje linearnosti odziva plinskrokromatografskog detektora i djelotvornosti mikrovalne ekstrakcije pri analizi uzoraka ljudskog mlijeka. Masene koncentracije pripremljenih standardnih otopina prikazane su u **tablici 3.2.**

**Tablica 3.2.** Masene koncentracije spojeva PBDE u standardnim otopinama korištenim kod ispitivanja linearnosti odziva detektora zahvata elektrona i analize uzoraka ljudskog mlijeka

Spoj	$\gamma / \text{ng mL}^{-1}$				
	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5
BDE-28	1,00	50,00	100,00	150,00	200,00
BDE-47	1,00	50,00	100,00	150,00	200,00
BDE-99	1,00	50,00	100,00	150,00	200,00
BDE-100	1,00	50,00	100,00	150,00	200,00
BDE-153	1,00	50,00	100,00	150,00	200,00
BDE-154	1,00	50,00	100,00	150,00	200,00
BDE-183	1,00	50,00	100,00	150,00	200,00

### 3.5. Uzorci ljudskog mlijeka

Za optimiranje postupka ekstrakcije potpomognute mikrovalovima spojeva PBDE iz uzoraka ljudskog mlijeka korišten je uzorak ljudskog mlijeka doniran od jedne roditelje. Mlijeko je istisnuto uz pomoć izdajalice u staklene posude prethodno oprane *n*-heksanom i osušene. Uzorci su do daljnje analize skladišteni na - 20 °C.

#### 3.5.1. Priprava uzoraka za liofilizaciju i liofilizacija

Uzorak ljudskog mlijeka je odmrznut, homogeniziran i razdijeljen na podjednake volumne alikvote,  $V \approx 20$  mL, u staklene bočice za liofilizaciju koji su zamrznuti na - 80 °C. Zamrznuti uzorci liofilizirani su korištenjem liofilizatora Labconco pri temperaturi komore liofilizatora od - 50 °C. Proces liofilizacije trajao je 48 sati, a liofilizati su do daljnje obrade čuvani u staklenim posudicama u eksikatoru na sobnoj temperaturi.

### 3.6. Analitički postupci određivanja polibromiranih difenil etera u ljudskom mlijeku

U ovom je radu ispitana učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima spojeva PBDE iz 50 mL tekućeg uzorka ljudskog mlijeka, iz 5 g liofiliziranog uzorka ljudskog mlijeka, te iz 5 g liofiliziranog uzorka ljudskog mlijeka s dodatkom 10 mL ultračiste vode.

#### 3.6.1. Optimiranje parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima spojeva PBDE iz uzorka ljudskog mlijeka

Cilj je bio razraditi metodu sa uzorkom ljudskog mlijeka koji je bio dostupan u većem volumenu, međutim potrebno je naglasiti da se radi o vrsti matrice čija dostupnost je jako ograničena. Stoga je učinkovitosti određene kombinacije parametara za MAE ispitivana analizom jednog uzorka sa dodatkom standardne otopine PBDE spojeva masene koncentracije 50 ng mL<sup>-1</sup> ili 25 ng mL<sup>-1</sup> i jednog uzorka bez dodatka spojeva koji su paralelno obrađeni na isti način opisan u *Poglavljima 3.6.1.1., 3.6.1.2. i 3.6.1.3.*

Za određivanje učinkovitosti ekstrakcije potpomognute mikrovalovima spojeva PBDE iz uzoraka ljudskog mlijeka odgovarajuća masa/volumen uzorka odmjeren je u teflonsku kivetu za mikrovalnu ekstrakciju volumena 100 mL. Ekstrakcija je provedena u uređaju za

ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima maksimalne snage 1200 W, a snaga magnetrona prilikom ekstrakcije podešena je ovisno o broju kiveta uz automatsko podešavanje intenziteta mikrovalova i umjereno ili maksimalno miješanje tekućeg ili liofiliziranog uzorka ljudskog mlijeka i otapala. Istražen je utjecaj sljedećih parametara na djelotvornost ekstrakcije:

- izbor otapala
- volumen otapala
- temperatura ekstrakcije

#### *3.6.1.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima polibromiranih difenil etera iz tekućih uzoraka ljudskog mlijeka*

Spojevi su ekstrahirani iz 50 mL ljudskog mlijeka, ali je uzorak zbog veličine kivete za MAE razdijeljen na dva dijela te su ekstrakti spojeni nakon postupka centrifugiranja.

Menzurom je odmjereno po 25 mL ( $\approx 25$  g) homogeniziranog mlijeka u obje teflonske kivete za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima i dodano je po 30 mL otapala. Ispitana je djelotvornost ekstrakcije spojeva PBDE iz tekućeg uzorka ljudskog mlijeka pri različitim kombinacijama uvjeta označenim oznakama T 1 do T 5. Radni uvjeti bili su sljedeći:

- 60 mL  $\varphi$  (*n*-heksan, aceton) = 1:1 uz dodatak 2 mL etanola, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 5 min do 80 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (T 1)
- 60 mL  $\varphi$  (kloroform, metanol) = 1:1, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 5 min do 80 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (T 2)
- 60 mL  $\varphi$  (kloroform, metanol) = 1:1, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 5 min do 100 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (T 3)
- 60 mL  $\varphi$  (kloroform, metanol) = 1:1, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 6 min do 120 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (T 4)
- 60 mL  $\varphi$  (metanol, *n*-heksan, kloroform) = 1:1:1, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 5 min do 80 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (T 5)

Nakon hlađenja reakcijske smjese do sobne temperature sadržaj kiveta za MAE je prebačen u kivete za centrifugiranje i centrifugiran pri određenim uvjetima ovisno o vrsti otapala primijenjenog za ekstrakciju.

#### *3.6.1.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima polibromiranih difenil etera iz liofiliziranih uzoraka ljudskog mlijeka*

Na analitičkoj vagi je u teflonsku kivetu za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima odvagano približno 5 g homogeniziranog uzorka liofiliziranog ljudskog mlijeka pripremljenog prema postupku opisanom u *Poglavlju 3.5.1* te je menzutom odmjeren određen volumen otapala. Ispitana je djelotvornost ekstrakcije spojeva PBDE iz liofiliziranog uzorka ljudskog mlijeka pri različitim kombinacijama uvjeta označenim oznakama L 1 do L 5. Radni uvjeti bili su sljedeći:

- 30 mL  $\varphi$  (*n*-heksan, aceton) = 1:1 uz dodatak 1 mL etanola, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 5 min do 80 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (L 1)
- 30 mL  $\varphi$  (*n*-heksan, aceton) = 1:1 uz dodatak 3 mL mravlje kiseline (98 - 100 %) i 6 mL propan-2-ola, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 5 min do 80 °C, vrijeme ekstrakcije 10 minuta (L 2)
- 40 mL  $\varphi$  (*n*-heksan, diklormetan, metanol) = 5:2:1, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 5 min do 80 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (L 3)
- 40 mL  $\varphi$  (diklormetan, *n*-heksan) = 3:2, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 10 min do 70 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (L 4)
- 60 mL  $\varphi$  (diklormetan, *n*-heksan) = 3:2, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 10 min do 80 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (L 5)

Nakon hlađenja reakcijske smjese do sobne temperature sadržaj kiveta za MAE prebačen je u kivete za centrifugiranje i centrifugiran pri određenim uvjetima ovisno o vrsti otapala primijenjenog za ekstrakciju.

### 3.6.1.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima polibromiranih difenil etera iz liofiliziranih uzoraka ljudskog mlijeka s dodatkom ultračiste vode

Na analitičkoj vagi je u teflonsku kivetu za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima odvagano približno 5 g homogeniziranog uzorka liofiliziranog ljudskog mlijeka pripremljenog prema postupku opisanom u *Poglavlju 3.5.1* koji je otopljen u 10 mL ultračiste vode te je menzutom odmjeren određen volumen otapala. U ovim je pokusima uzorcima dodavana standardna otopina spojeva PBDE masene koncentracije 25 ng mL<sup>-1</sup>. Ispitana je djelotvornost ekstrakcije spojeva PBDE iz tako pripremljenog uzorka ljudskog mlijeka pri različitim kombinacijama uvjeta označenim oznakama LV 1 do LV 7. Radni uvjeti bili su sljedeći:

- 30 mL  $\varphi$  (*n*-heksan, aceton) = 1:1 uz dodatak 1 mL etanola, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 5 min do 80 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (LV 1)
- 30 mL  $\varphi$  (*n*-heksan, aceton) = 1:1 uz dodatak 3 mL mravlje kiseline (98 – 100 %) i 6 mL propan-2-ola, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 5 min do 80 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (LV 2)
- 30 mL  $\varphi$  (kloroform, metanol) = 1:1, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 5 min do 80 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (LV 3)
- 40 mL  $\varphi$  (*n*-heksan, aceton) = 1:1 uz dodatak 1 mL etanola, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 5 min do 80 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (LV 4)
- 30 mL  $\varphi$  (*n*-heksan, aceton) = 1:1 uz dodatak 1 mL etanola, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 6 min do 100 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (LV 5)
- 30 mL  $\varphi$  (diklormetan, *n*-heksan) = 3:2, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 5 min do 80 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (LV 6)
- 30 mL  $\varphi$  (*n*-heksan, acetonitril) = 4:1 uz dodatak 1 mL etanola, zagrijavanje ekstrakcijske smjese 5 min do 80 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta (LV 7)



Nakon hlađenja reakcijske smjese do sobne temperature sadržaj kiveta za MAE prebačen je u kivete za centrifugiranje i centrifugiran pri određenim uvjetima ovisno o vrsti otapala primijenjenog za ekstrakciju.

*Postupak nakon ekstrakcije otapalom  $\varphi$  (kloroform, metanol) = 1:1*

Nakon ekstrakcije sa smjesom otapala  $\varphi$  (kloroform, metanol) = 1:1 kivete za MAE isprane su dva puta s po 3,5 mL ultračiste vode koja je spojena s ekstraktom te je dobivena suspenzija centrifugirana 15 minuta pri 2500 rpm. U tom je slučaju kapalicom pažljivo odvajan donji kloroformski sloj koji je ukoncentriran uparavanjem u vodenoj kupelji pod strujom dušika do 1 mL.

*Postupak nakon ekstrakcije ostalim smjesama otapala*

Nakon ekstrakcije primjenom drugih smjesa otapala, sadržaj kiveta za ekstrakciju je dekantiran u kivete za centrifugu, a dobivene suspenzije centrifugirane su 5 minuta pri 3500 rpm. Gornji sloj je kapalicom pažljivo odvojen od taloga i ukoncentriran uparavanjem u vodenoj kupelji pod strujom dušika do 1 mL.

*3.6.2. Postupak pročišćavanja ekstrakata*

U upareni kloroformski ili heksanski ekstrakt dodano je 5 mL *n*-heksana te je heksanski sloj prenesen kapalicom u prethodno izvaganu epruvetu i uparen do ostatka masti. Epruveta s masti preostalom nakon uparavanja je izvagana i određen je sadržaj masti u mlijeku. Mast je potom otopljena u 4 mL *n*-heksana i pročišćena mućkanjem s 4 mL 96 %-tne sumporne kiseline. Nakon centrifugiranja 5 minuta pri 3500 rpm, gornji sloj je odvojen i ekstrakt je uparen do 0,5 mL u slaboj struji dušika. Postupak čišćenja ponovljen je ako dobiveni ekstrakt nije bio u potpunosti bistar, dodatkom 2 mL 96 %-tne sumporne kiseline. Tako pripremljen uzorak profiltriran je kroz filtre veličine pora 0,2  $\mu\text{m}$  prije plinskokromatografske analize.

*3.6.3. Priprava uzoraka za određivanje djelotvornosti metode*

Metodom kojom su dobiveni najbolji povrati ekstrakcije spojeva skupine PBDE iz uzoraka ljudskog mlijeka analizirano je dodatnih sedam alikvota istog uzorka ljudskog mlijeka sa dodatkom standarda i jedan bez dodatka standarda te su pročišćeni postupkom opisanim u

Poglavlju 3.6.2. Razine spojeva PBDE u ljudskom mlijeku najčešće se, pa tako i u ovom radu, prikazuju s obzirom na količinu masti.

### 3.7. Plinskokromatografska analiza

#### 3.7.1. Radni uvjeti

Plinski kromatograf Agilent 7890B sa dvije kolone od taljenog silicijevog dioksida duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine filma 0,25  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) i dva detektora zahvata elektrona

**Kolona DB-1701** - nepokretna faza: 14 % cijanopropilfenil - 86 % dimetil-polisiloksan

**Kolona HP-5 MS** - nepokretna faza: 5 % fenil - 95 % dimetil-polisiloksan

Temperaturni program kolona: programirano zagrijavanje od početnih 90 °C (sa zadržavanjem 1 min na 90 °C) do 280 °C brzinom 20 °C  $\text{min}^{-1}$  (zadržavanje 5 min na 280 °C), te dalje brzinom od 5 °C  $\text{min}^{-1}$  do 300 °C (zadržavanje temperature 5 min)

- Protok plina nosioca (He): 1,2 mL  $\text{min}^{-1}$
- Protok make-up plina ( $\text{N}_2$ ): 30 mL  $\text{min}^{-1}$
- Temperatura detektora: 300 °C
- Temperatura injektora: 270 °C
- Volumen injektiranog uzorka: 1  $\mu\text{L}$

#### 3.7.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza

Heksanski sloj odijeljen nakon čišćenja ekstrakata pripremljenih mikrovalnom ekstrakcijom spojeva skupine PBDE iz uzoraka ljudskog mlijeka uparen je u struji dušika do 0,5 mL i analiziran plinskom kromatografijom uz detektor zahvata elektrona na kapilarnim kolonama HP-5 MS i DB-1701 prema vanjskim standardima pripremljenim u *n*-heksanu. Rasponi koncentracija PBDE spojeva u standardnim otopinama prikazani su u **tablici 3.2**.

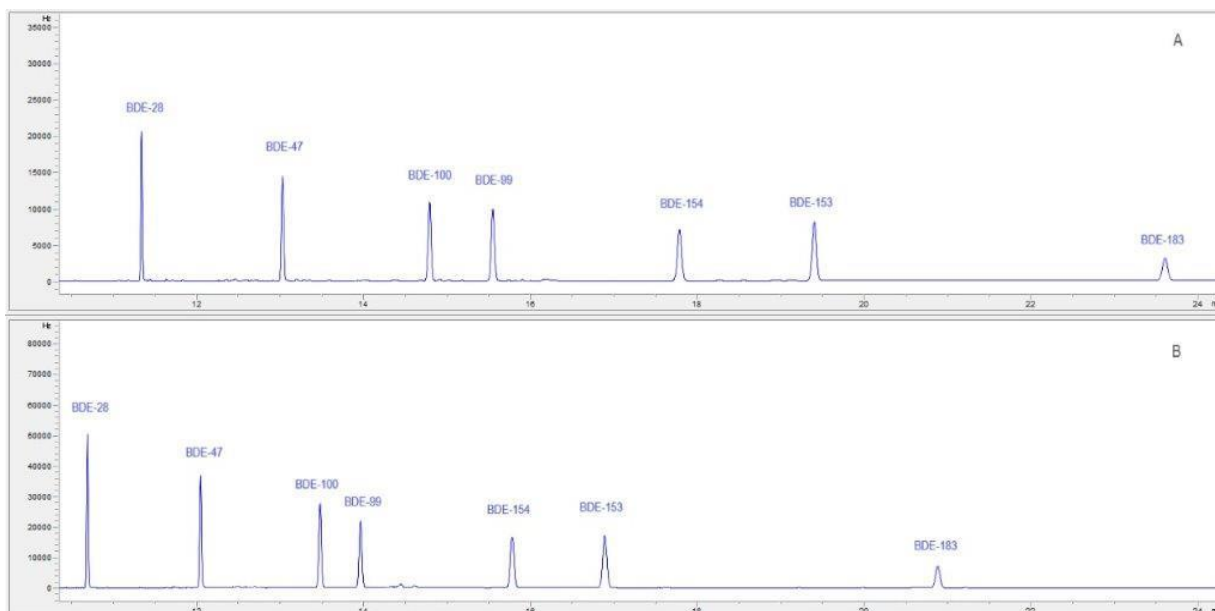
Kod GC-ECD analize su spojevi identificirani usporedbom vremena zadržavanja u kromatogramu uzorka s vremenom zadržavanja u kromatogramu standarda, pri čemu su u obzir uzeti samo spojevi identificirani na obje kolone. Koncentracije spojeva su i kod

određivanja djelotvornosti postupka mikrovalne ekstrakcije i kod određivanja masenih koncentracija/udjela spojeva u uzorcima ljudskog mlijeka izražavane kao srednja vrijednost rezultata na obje kolone.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

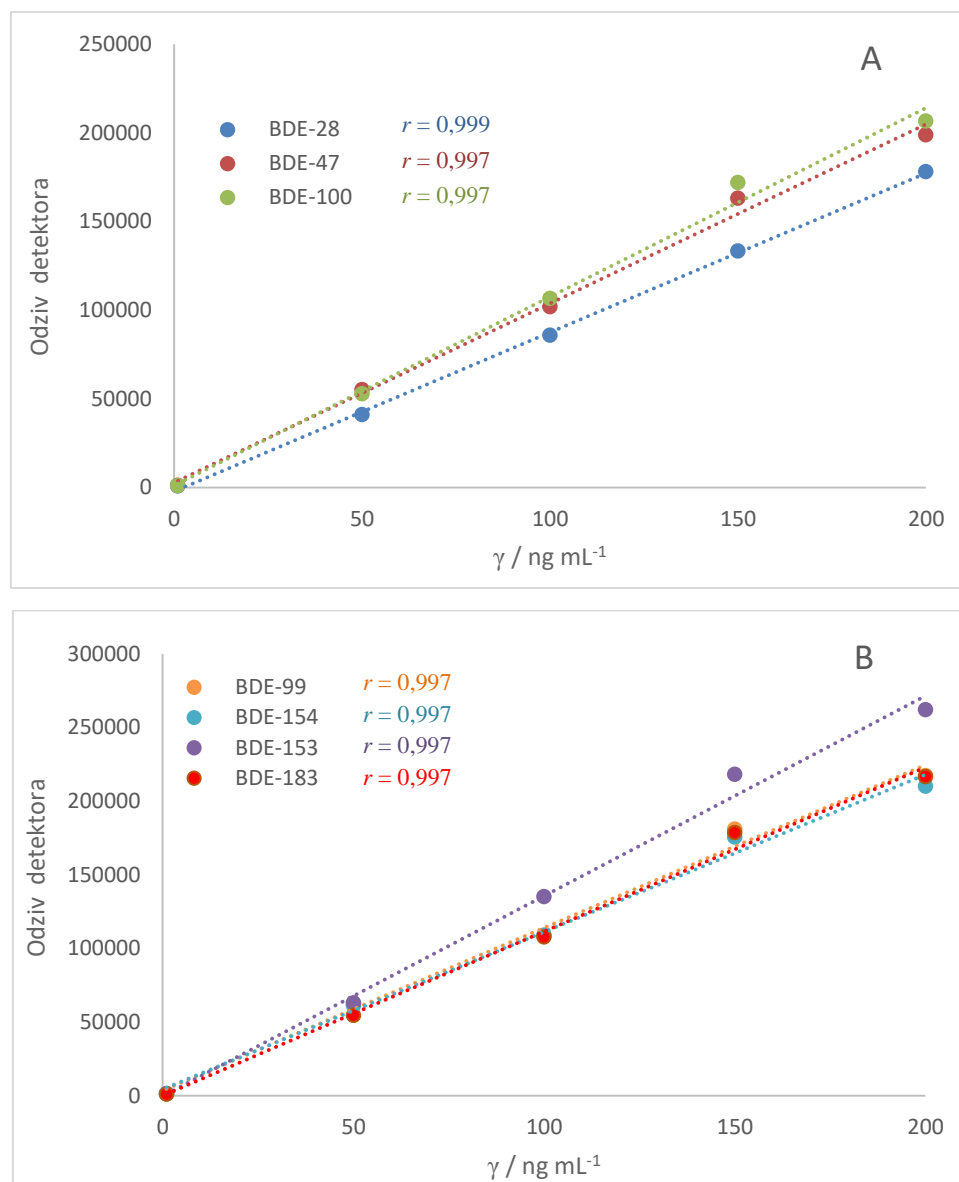
### 4.1. Linearnost odziva detektora i granice detekcije

Optimiranjem uvjeta plinskokromatografske analize za istovremenu analizu 7 kongenera PBDE uz dva detektora zahvata elektrona na dvije kolone različite polarности, postiglo se uspješno razdvajanje kongenera na obje kolone unutar 24 minute (**slika 4.1**). Detektor zahvata elektrona osjetljiv je i selektivan za organohalogene spojeve, uključujući i kongenere spojeva PBDE.<sup>42</sup>

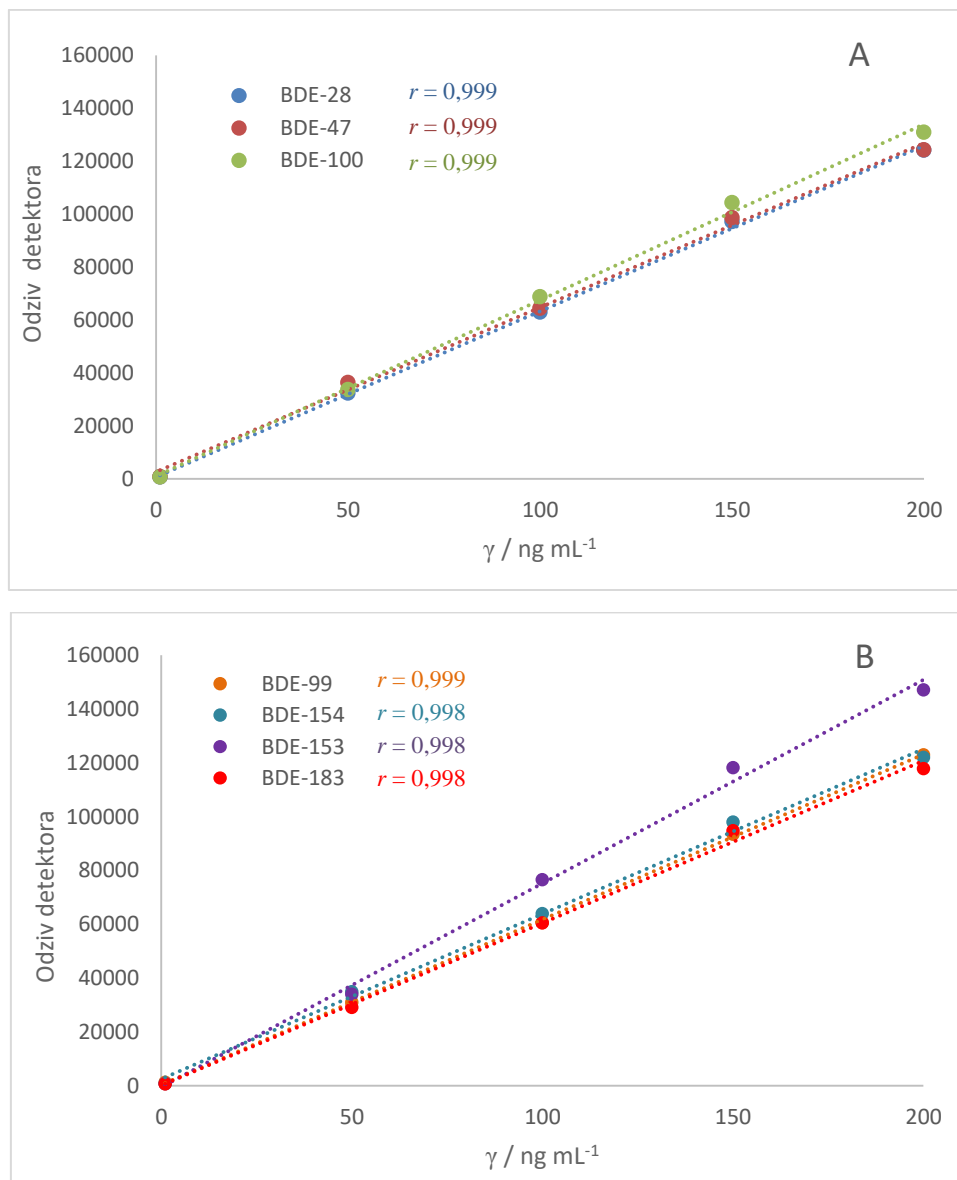


**Slika 4.1.** GC-ECD kromatogrami standardne otopine spojeva PBDE masene koncentracije  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  na koloni HP-5 MS (A) i na koloni DB-1701 (B)

Određivanje linearnosti odziva detektora važno je radi pravilnog kvantitativnog određivanja ispitivanih spojeva. Linearnost odziva detektora zahvata elektrona ispitana je analizom niza standardnih otopina spojeva PBDE pripremljenih u *n*-heksanu čije su masene koncentracije prikazane u **tablici 3.2**. Linearnom regresijom površina kromatografskih pikova i koncentracija pojedinih spojeva u standardnim otopinama od  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  do  $200 \text{ ng mL}^{-1}$  utvrđen je linearan odziv ECD-a za sve spojeve na obje primijenjene kolone uz koeficijente korelacije *r* veće od 0,997 (**slika 4.2** i **slika 4.3**).



**Slika 4.2.** Linearnost odziva detektora zahvata elektrona za BDE-28, BDE-47 i BDE-100 (A) te BDE-99, BDE-154, BDE-153 i BDE-183 (B) na koloni HP-5MS. Standardne otopine spojeva PBDE pripravljene su u *n*-heksanu



**Slika 4.3.** Linearnost odziva detektora zahvata elektrona za BDE-28, BDE-47 i BDE-100 (A) te BDE-99, BDE-154, BDE-153 i BDE-183 (B) na koloni DB-1701. Standardne otopine spojeva PBDE pripravljene su u *n*-heksanu

Točnost i preciznost određene su pomoću standardnih otopina na tri koncentracijske razine (1, 10 i 200 ng mL<sup>-1</sup>). Određena prosječna točnost viša je od 97 %, a preciznost izražena kao relativna standardna devijacija najmanje šest analiziranih replikata manja je od 5 %.

Granica detekcije spojeva direktno ovisi o osjetljivosti detektora. U ovom je radu granica detekcije određena pomoću standardne otopine s najnižim masenim koncentracijama spojeva PBDE čiji su signali u kromatogramu bili jasno vidljivi i minimalno tri puta veći od šuma osnovne linije. Obzirom na vrlo niske masene udjele analita u ljudskom mlijeku granica

detekcije je uzimana i kao granica određivanja analiziranih spojeva. Određena granica detekcije za sedam PBDE kongenera iznosi  $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$  ekstrakta.

#### **4.2. Optimiranje uvjeta ekstrakcije potpomognute mikrovalovima polibromiranih difenil etera iz ljudskog mlijeka**

Za ekstrakciju analita iz ljudskog mlijeka odabrana je tehnika ekstrakcije potpomognute mikrovalovima koja ima niz prednosti - smanjena upotreba otapala, smanjeno vrijeme ekstrakcije, povećanje prinosa analita, automatizacija i obrada većeg broja uzoraka istovremeno, a unatoč tome do sada nije istražena njena učinkovitost u svrhu akumuliranja spojeva PBDE iz uzoraka ljudskog mlijeka. Razrada uvjeta za djelotvornu ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima uključila je odabir otapala i njegovog volumena te optimiranje temperature ekstrakcije. Istražen je i utjecaj načina pripreme uzorka prije samog postupka ekstrakcije obzirom da se postupak MAE najčešće u literaturi primjenjuje za ekstrakciju različitih vrsta spojeva iz čvrstih uzoraka, a vrlo rijetko iz tekućih.

Kao što je navedeno ranije, tehnika ekstrakcije potpomognuta mikrovalovima spojeva PBDE iz uzoraka ljudskog mlijeka razrađivana je i optimirana na uzorku dostupnom u većem volumenu doniranom od jedne roditelje. Zbog toga je učinkovitost određene kombinacije parametara za MAE ispitivana analizom jednog uzorka sa dodatkom standardne otopine spojeva PBDE u *n*-heksanu i jednog uzorka bez dodatka spojeva koji su paralelno obrađeni na isti način. To znači da za pojedinu kombinaciju radnih uvjeta nije bilo moguće izračunati usporedivost (reproducibilnost) rezultata koja se izražava relativnom standardnom devijacijom, odnosno, reproducibilnost je izračunata samo za uvjete koji su razmatrani kao optimalni i pri kojima je analizirano više alikvota uzorka ljudskog mlijeka.

Analitički povrat se općenito računa kao razlika masene koncentracije određenog spoja u ekstraktu alikvota uzorka kojem je dodan standard i srednje vrijednosti masenih koncentracija istog spoja u ekstraktu alikvota uzorka bez dodanog standarda, podijeljena masenom koncentracijom spoja u dodanom standardu i pomnožena sa 100. Međutim, u ekstraktima uzoraka ljudskog mlijeka analiziranim većinom isprobanih kombinacija parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima nisu detektirani ciljani PBDE kongeneri.

#### 4.2.1. Djelotvornost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima polibromiranih difenil etera iz tekućih uzoraka ljudskog mlijeka

Učinkovitost analitičkog postupka za određivanje spojeva PBDE iz 50 mL tekućeg ljudskog mlijeka postupcima opisanim u *Poglavlju 3.6.1.1.* određena je analizom uzoraka kojima je prije ekstrakcije dodana standardna otopina PBDE spojeva masene koncentracije  $50 \text{ ng mL}^{-1}$ . Obzirom da se radi o spojevima koji su zabranjeni za upotrebu te su u ljudskom mlijeku prisutni u tragovima, za razradu metode uziman je veći volumen uzorka kako bi se postigla zadovoljavajuća osjetljivost analize pojedinih PBDE spojeva akumuliranih u ljudskom mlijeku. Unatoč tome ciljani PBDE spojevi nisu detektirani u uzorcima bez dodatka standardne otopine spojeva pripravljenim niti jednom kombinacijom primijenjenih otapala i radnih uvjeta ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

**Tablica 4.1.** Djelotvornost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima spojeva PBDE iz tekućih uzoraka ljudskog mlijeka primjenom različitih radnih uvjeta opisanih u *Poglavlju 3.6.1.1.*

Spoj	Povrat / %				
	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5
BDE-28	59	75	64	71	63
BDE-47	54	61	59	67	56
BDE-100	50	55	54	61	51
BDE-99	59	65	63	70	58
BDE-154	64	67	66	72	62
BDE-153	53	55	51	57	49
BDE-183	51	50	45	46	44

Prema vrijednostima analitičkih povrata prikazanim u **tablici 4.1.** može se zaključiti da su primijenjene kombinacije otapala i radnih uvjeta za MAE podjednako učinkovite za ekstrakciju odabranih spojeva PBDE iz tekućih uzoraka ljudskog mlijeka. Raspon analitičkih povrata za postupak ekstrakcije spojeva PBDE iz tekućeg ljudskog mlijeka primjenom 30 mL otapala  $\varphi$  (*n*-heksan, aceton) = 1:1 uz dodatak 1 mL etanola za svaki alikvot od 25 mL mlijeka (pokus T 1) bio je od 50 % za BDE-100 do 64 % za BDE 154. Međutim, kako u tom slučaju ne dolazi do miješanja uzorka i otapala čime se pospješuje učinkovitost mikrovalne ekstrakcije, taj postupak nije dalje uziman u obzir za optimiranje.



Analitički povrati spojeva PBDE iz 50 mL tekućeg uzorka ljudskog mlijeka primjenom 60 mL otapala  $\varphi$  (kloroform, metanol) = 1:1 (pokus T 2) bili su u rasponu od 50 % za BDE-183 do 75 % za BDE-28. Ispitan je utjecaj povećanja temperature ekstrakcije na 100 °C (pokus T 3) i 120 °C (pokus T 4) na učinkovitost postupka ekstrakcije primjenom jednakog volumena otapala istog sastava. Prema vrijednostima analitičkih povrata postignutim za te kombinacije radnih uvjeta (**tablica 4.1**) vidljivo je da nije došlo do značajnog poboljšanja djelotvornosti postupka ekstrakcije. Ekstrakcija smjesom metanola, *n*-heksana i kloroforma u jednakim udjelima (pokus T 5) pokazala se podjednako djelotvornom.

Obzirom na potrebu razdvajanja uzorka na dva dijela prilikom postupka ekstrakcije 50 mL uzorka, povećanu potrošnju otapala (ukupno 60 mL), dugotrajno ukoncentriravanje ekstrakta te činjenice da se zbog višestruke manipulacije uzorkom povećava i mogućnost potencijalnog unosa pogreške prilikom same analize, obustavljeno je daljnje optimiranje postupka MAE iz tekućeg ljudskog mlijeka.

#### 4.2.2. *Djelotvornost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima polibromiranih difenil etera iz liofiliziranih uzoraka ljudskog mlijeka*

Postupak mikrovalno potpomognute ekstrakcije se prema literaturi najčešće koristi za ekstrakciju spojeva iz čvrstih uzoraka te je uzorak ljudskog mlijeka preveden u čvrsto stanje postupkom liofilizacije opisanim u *Poglavlju 3.5.1*. Masa suhog ostatka nakon liofilizacije 50 mL ljudskog mlijeka je oko 5 g. Na taj način uzorak zauzima manji prostor u kiveti za MAE i moguće je u jednom koraku ekstrahirati spojeve iz veće količine uzorka. Učinkovitost analitičkog postupka za određivanje spojeva PBDE iz 5 g liofilizata ljudskog mlijeka postupcima opisanim u *Poglavlju 3.6.1.2*, određena je analizom uzoraka kojima je prije ekstrakcije dodana standardna otopina PBDE spojeva masene koncentracije 50 ng mL<sup>-1</sup>. Prema rezultatima prikazanim u **tablici 4.2**, vidljivo je da je učinkovitost ekstrakcije spojeva PBDE iz uzoraka liofiliziranog ljudskog mlijeka za sve kombinacije otapala i uvjeta za MAE manja nego iz tekućih uzoraka mlijeka. Vrijednosti analitičkih povrata pojedinih analita u većini su slučajeva niži od 50 %. Posljedično, ciljani PBDE spojevi nisu detektirani u uzorcima bez dodatka standardne otopine spojeva pripremljenim niti jednom kombinacijom primijenjenih otapala i radnih uvjeta ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

**Tablica 4.2.** Djelotvornost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima spojeva PBDE iz liofilizata ljudskog mlijeka primjenom različitih radnih uvjeta opisanih u *Poglavlju 3.6.1.2.*

Spoj	Povrat / %				
	L 1	L 2	L 3	L 4	L 5
BDE-28	42	33	41	55	56
BDE-47	30	30	35	49	54
BDE-100	28	28	32	44	49
BDE-99	35	32	37	49	54
BDE-154	31	33	36	48	55
BDE-153	26	26	28	37	42
BDE-183	26	29	28	30	31

Ispitana je učinkovitost postupka ekstrakcije spojeva PBDE iz liofilizata ljudskog mlijeka primjenom smjese otapala  $\varphi$  (*n*-heksan, aceton) = 1:1, koja se prema literaturi vrlo često koristi za ekstrakciju spojeva PBDE iz različitih vrsta uzoraka, uključujući i ljudsko mlijeko.<sup>9,21,51</sup> Uzorci su ekstrahirani jednakim volumenom otapala i primjenom jednakih uvjeta za MAE uz dodatak dva različita sredstva za denaturiranje proteina; etanola (pokus L 1) i mravlje kiseline i propan-2-ola (pokus L 2). U oba je pokusa djelotvornost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima istraživanih spojeva iz liofilizata ljudskog mlijeka bila vrlo niska (analitički povrat ~ 30 %). Zanimljivo je zapažanje da dodatak različitog sredstva za denaturaciju proteina u mlijeku nema utjecaj na učinkovitost primijenjenog postupka ekstrakcije. Ispitana je i učinkovitost postupka ekstrakcije primjenom smjese otapala  $\varphi$  (*n*-heksan, diklormetan, metanol) = 5:2:1, također pri temperaturi od 80 °C (pokus L 3). Takvom promjenom sastava ekstrakcijskog otapala nije se značajno povisila djelotvornost ekstrakcije spojeva PBDE iz liofilizata ljudskog mlijeka te su analitički povrati spojeva bili u rasponu od 28 % do 41 %.

Prema literaturi se za ekstrakciju spojeva PBDE iz uzoraka ljudskog mlijeka često koristi smjesa otapala *n*-heksana i diklormetana u različitim volumnim omjerima.<sup>8,37,38,52</sup> Primjena smjese otapala  $\varphi$  (diklormetan, *n*-heksan) = 3:2 povisila je djelotvornost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (pokusi L 4 i L 5), ali je analitički povrat istraživanih spojeva još uvijek za većinu spojeva PBDE bio manji od 50 %. Povećanjem volumena otapala na 60 mL i temperature ekstrakcije na 80 °C (pokus L5) u odnosu na 40 mL otapala i temperaturu ekstrakcije 70 °C (pokus L4) učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima spojeva PBDE iz liofilizata ljudskog mlijeka povećava se za svega 5 % ili manje.

#### 4.2.3. Djelotvornost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima polibromiranih difenil etera iz liofiliziranih uzoraka ljudskog mlijeka s dodatkom ultračiste vode

Rezultati prethodnih pokusa upućivali su na činjenicu da je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima učinkovitija kad je uzorak ljudskog mlijeka u tekućem stanju. Spojevi PBDE prisutni su u mlijeku u vrlo niskim masenim udjelima i potrebna je analiza veće količine uzorka kako bi se povećala osjetljivost metode. U slučaju tekućeg uzorka ljudskog mlijeka potrebna je analiza velikog volumena mlijeka koje zauzima previše prostora u teflonskoj kiveri i magnet ne može dovoljno dobro miješati uzorak s otapalom za ekstrakciju. Stoga je osmišljen pokus u kojem je liofiliziranom uzorku mlijeka dodan minimalan postotak ultračiste vode kako bi se uzorak „vratio“ u tekuće stanje a bez značajnog povećanja ukupnog volumena uzorka (**slika 4.4**). Nadalje, voda zbog svoje visoke dielektrične konstante od 80 značajno doprinosi polarnosti smjese uzorka i otapala, a što je preduvjet za uspješnu primjenu tehnike MAE.



**Slika 4.4.** Fotografije uzoraka ljudskog mlijeka: 50 mL tekućeg mlijeka (A), 5 g liofiliziranog mlijeka (B), 5 g liofiliziranog mlijeka otopljenog u 10 mL ultračiste vode (C)

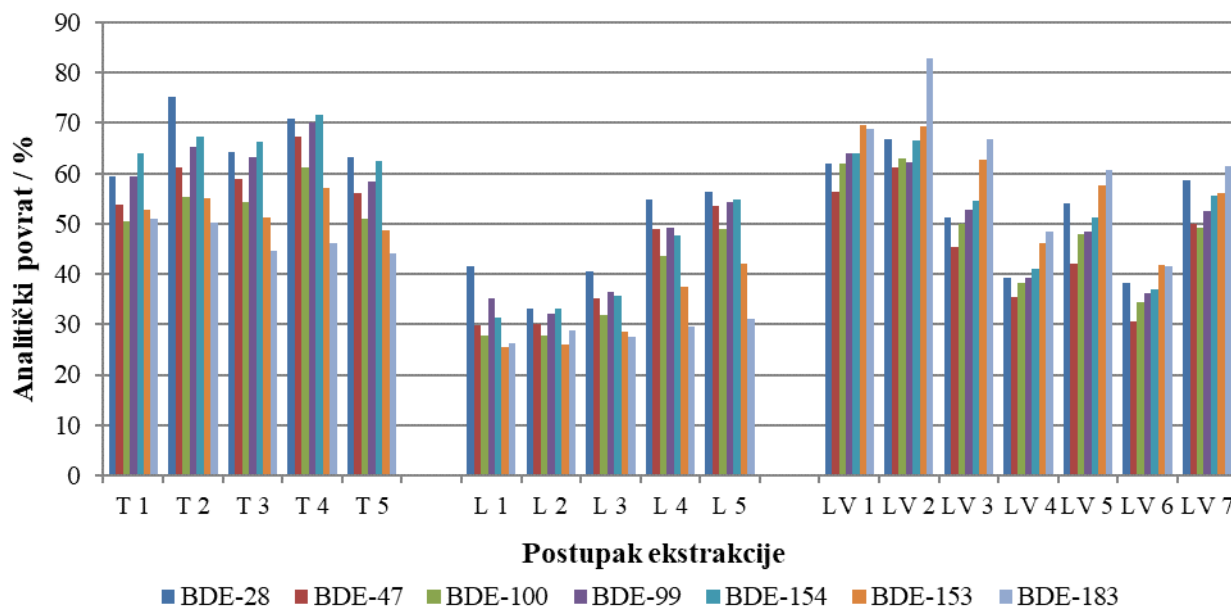
Uzorak liofiliziranog ljudskog mlijeka pripremljen prema postupku opisanom u *Poglavlju 3.5.1.* otopljen je u 10 mL ultračiste vode. Na taj je način povećana polarnost smjese, a ciljane analite moguće je ekstrahirati iz veće količine uzorka i uz manju potrošnju otapala. Određena je učinkovitost tehnike MAE iz tako pripremljenih uzoraka ljudskog mlijeka različitim postupcima opisanim u *Poglavlju 3.6.1.3.* Uzorcima je prije ekstrakcije dodana standardna otopina PBDE spojeva masene koncentracije  $25 \text{ ng mL}^{-1}$  kako bi se izračunao analitički povrat.

**Tablica 4.3.** Djelotvornost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima spojeva PBDE iz liofilizata ljudskog mlijeka otopljenog u ultračistoj vodi primjenom različitih radnih uvjeta opisanih u *Poglavlju 3.6.1.3.*

Spoj	Povrat / %						
	LV 1	LV 2	LV 3	LV 4	LV 5	LV 6	LV 7
BDE-28	62	67	51	39	54	38	59
BDE-47	56	61	45	35	42	30	50
BDE-100	62	63	50	38	48	34	49
BDE-99	64	62	53	39	48	36	53
BDE-154	64	67	54	41	51	37	56
BDE-153	70	69	63	46	58	42	56
BDE-183	69	83	67	48	61	41	61

Kako u prethodnim pokusima u uzorcima bez dodatka spojeva PBDE nisu detektirani ciljani analiti, zbog ograničenja količine dostupnog uzorka ljudskog mlijeka, u ovoj seriji pokusa su u prvoj fazi analizirani samo alikvoti sa dodatkom spojeva. Analitički povrati spojeva PBDE nakon ekstrakcije iz liofilizata ljudskog mlijeka otopljenog u ultračistoj vodi primjenom smjese otapala  $\varphi$  (*n*-heksan, aceton) = 1:1 uz dodatak 1 mL etanola pri temperaturi od 80 °C bili su u rasponu od 56 % do 70 % (postupak LV 1). To je značajno povećanje djelotvornosti postupka u odnosu na analitičke povrate nakon ekstrakcije pri istim radnim uvjetima iz liofilizata bez dodatka ultračiste vode (postupak L 1). Primjenom jednakog volumena iste smjese otapala uz dodatak drugačijeg sredstva za denaturaciju proteina pri jednakim radnim uvjetima za MAE uočen je podjednak pozitivan učinak dodatka ultračiste vode na djelotvornost postupka ekstrakcije (postupak LV 2 u usporedbi s postupkom L 2). Suprotno očekivanjima, optimiranjem volumena otapala za ekstrakciju i temperature ekstrakcije postupka LV 1 povišenjem volumena otapala za 10 mL (pokusi LV 4) i temperature za 20 °C (LV 5), snizila se djelotvornost ekstrakcije svih istraživanih spojeva PBDE.

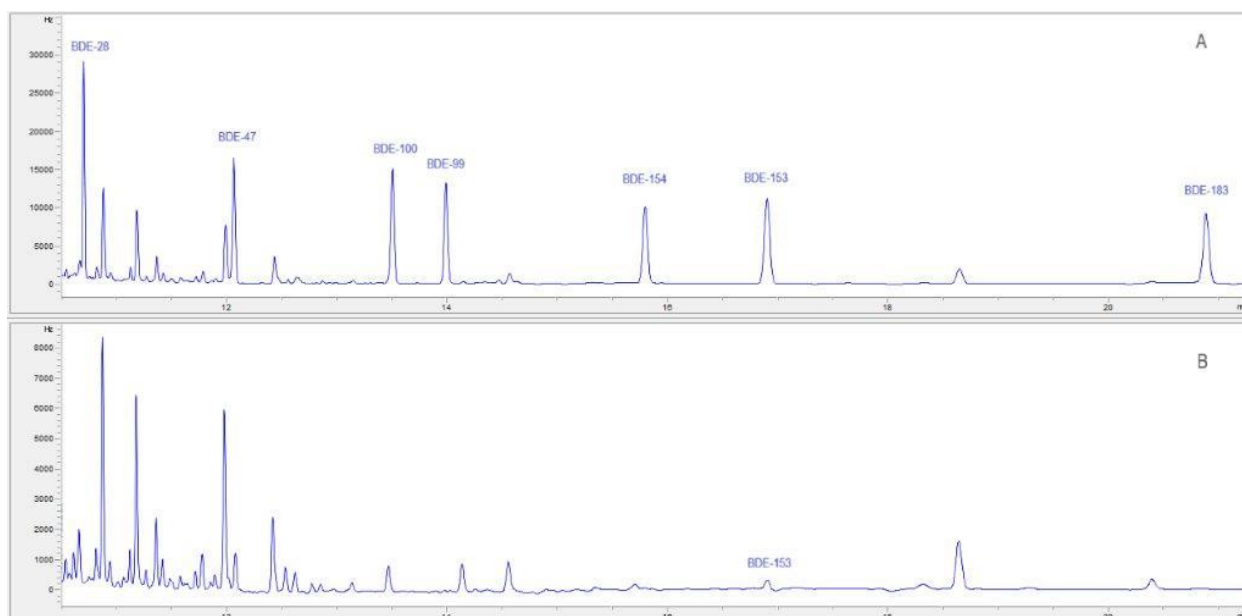
Ispitana je i djelotvornost postupka ekstrakcije potpomognute mikrovalovima spojeva PBDE iz liofiliziranog uzorka ljudskog mlijeka otopljenog u ultračistoj vodi primjenom još tri smjese otapala:  $\varphi$  (kloroform, metanol) = 1:1 (pokusi LV 3),  $\varphi$  (diklormetan, *n*-heksan) = 3:2 (pokusi LV 6) i  $\varphi$  (*n*-heksan, acetonitril) = 4:1 (pokusi LV 7). Prema vrijednostima analitičkih povrata spojeva PBDE prikazanim u **tablici 4.3.** vidljivo je da promjena smjese otapala nije imala pozitivan učinak na djelotvornost postupka ekstrakcije, odnosno, te su se smjese otapala pokazale još manje djelotvornima od ekstrakcije smjesom  $\varphi$  (*n*-heksan, aceton) = 1:1.



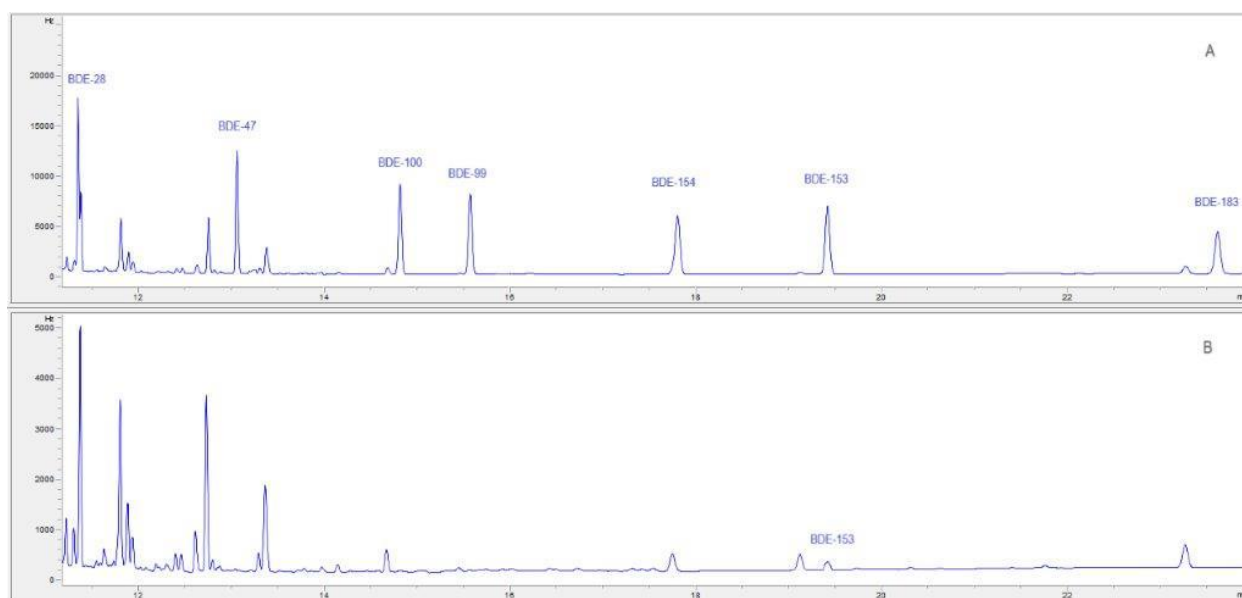
**Slika 4.5.** Usporedba analitičkih povrata spojeva PBDE iz različito pripremljenih uzoraka ljudskog mlijeka primjenom različitih uvjeta ekstrakcije potpomognute mikrovalovima opisanih u *Poglavljima 3.6.1.1., 3.6.1.2. i 3.6.1.3.*

U idućem su koraku prema postupcima LV 1 i LV 2 analizirani uzorci ljudskog mlijeka bez dodatka standardne otopine spojeva PBDE. Jedini spoj koji je detektiran u oba pripremljena ekstrakta je spoj BDE-153 pri čemu je prema proceduri LV 1 njegov maseni udio  $0,16 \text{ ng g}^{-1}$  masti, a prema proceduri LV 2  $0,19 \text{ ng g}^{-1}$  masti (**slika 4.6** i **slika 4.7**). Oba navedena masena udjela korigirana su za analitički povrat detektiranog kongenera. Podjednaka razina spoja BDE-153 detektirana je u uzorcima ljudskog mlijeka skupljenim na četiri lokacije u Slovačkoj.<sup>31</sup> Medijan masenog udjela spoja BDE-153 na pojedinoj lokaciji u tom istraživanju bio je od  $0,12$  do  $0,15 \text{ ng g}^{-1}$  masti, pri čemu je taj spoj uz BDE-47 u najvećoj mjeri doprinio ukupnoj sumi masenih udjela detektiranih spojeva PBDE. Upravo spoj BDE-47 je kongener skupine PBDE koji se najčešće detektira u uzorcima ljudskog mlijeka,<sup>11,24,36</sup> tako da iznenađuje činjenica da on nije detektiran u korištenom uzorku ljudskog mlijeka. Razlog bi mogao biti činjenica da se za razradu metode koristilo mlijeko roditelje drugorotke skupljano u razdoblju od 6 do 10 mjeseci nakon poroda. Osim toga, razlog što je detektiran samo kongener BDE-153, a ne i kongener BDE-47 bi mogla biti i razlika u njihovoj postojanosti i lipofilnosti što posljedično utječe na razliku u vremenu potrebnom da se njihova maksimalna koncentracija u ljudskom organizmu smanji na polovicu maksimalne koncentracije (engl.

*terminal elimination half-lives* ili *body-burden half-life*). Izračunato je da je za taj proces potrebno 1,8 godina u slučaju BDE-47 te čak 6,5 godina za BDE-153.<sup>53</sup>



**Slika. 4.6.** GC-ECD kromatogrami (kolona HP-5 MS) ekstrakta uzorka ljudskog mlijeka u koje su dodani spojevi PBDE (A) i u ekstraktu ljudskog mlijeka bez dodatka spojeva (B)



**Slika. 4.7.** GC-ECD kromatogrami (kolona DB-1701) ekstrakta uzorka ljudskog mlijeka u koje su dodani spojevi PBDE (A) i u ekstraktu ljudskog mlijeka bez dodatka spojeva (B)

Zaključeno je da je postupak pri radnim uvjetima LV 2 prikladan za ekstrakciju spojeva PBDE iz uzoraka ljudskog mlijeka te su za analizu pripremljeni dodatni alikvoti uzorka ljudskog mlijeka kako bi se osim same djelotvornosti odredila i ponovljivost cijelog postupka izražena kao relativna standardna devijacija. Rezultati su prikazani u **tablici 4.4.**

**Tablica 4.4.** Djelotvornost i ponovljivost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima ( $N = 8$ ) spojeva PBDE iz liofiliziranog ljudskog mlijeka otopljenog u ultračistoj vodi ekstrahiranih s 30 mL smjese otapala  $\varphi$  ( $n$ -heksan, aceton) = 1:1 uz dodatak 3 mL mravlje kiseline i 6 mL propan-2-ola pri temperaturi od 80 °C tijekom 20 minuta.

Spoj	Povrat / %			RSD / %
	Minimum	Maksimum	Srednja vrijednost	
BDE-28	57	71	64	7
BDE-47	54	67	60	7
BDE-100	55	70	62	7
BDE-99	54	69	61	7
BDE-154	60	76	67	7
BDE-153	63	80	70	7
BDE-183	80	95	84	6

$N$  – broj analiziranih uzoraka; RSD – relativna standardna devijacija

Srednje vrijednosti analitičkih povrata ekstrakcije potpomognute mikrovalovima spojeva PBDE iz uzoraka ljudskog mlijeka prema postupku koji je odabran kao najprikladniji bile su od 60 % za BDE-47 do 84 % za BDE-183 uz vrlo dobru ponovljivost rezultata. Takvi rezultati upućuju da dodatak vode liofiliziranom uzorku ljudskog mlijeka ima pozitivan utjecaj na postupak ekstrakcije, što je vjerojatno posljedica povećanja polarnosti smjese uzorka i otapala za ekstrakciju čime se povećava djelotvornost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima spojeva iz matrice. Vrijednosti relativne standardne devijacije ukazuju da je primijenjen postupak ponovljiv, što je u skladu s očekivanjima kod primjene ekstrakcije potpomognute mikrovalovima koja se izvodi u zatvorenom sustavu pri kontroliranim uvjetima.

## § 5. ZAKLJUČAK

Optimirani su uvjeti za istovremenu plinskrokromatografsku analizu sedam kongenera PBDE na dvije kapilarne kolone HP-5 MS i DB-1701 duljine 30 m uz detekciju spojeva detektorima zahvata elektrona. Uspješno razdvajanje kongenera postignuto je unutar 24 minute na obje kolone. Linearan odziv detektora postignut je pri masenim koncentracijama spojeva u *n*-heksanu u rasponu od 1 ng mL<sup>-1</sup> do 200 ng mL<sup>-1</sup>, uz koeficijent korelacije > 0,997. Preciznost i točnost metode, ispitane na tri koncentracijske razine (1, 10 i 200 ng mL<sup>-1</sup>), bile su vrlo dobre. Određena prosječna točnost viša je od 97 %, a preciznost izražena kao relativna standardna devijacija najmanje šest analiziranih replikata manja je od 5 %.

Optimiran je postupak ekstrakcije potpomognute mikrovalovima za akumuliranje spojeva PBDE iz uzoraka ljudskog mlijeka čija učinkovitost u tu svrhu, unatoč njenim prednostima, prema dostupnoj literaturi do sada nije istražena. Razrada uvjeta za djelotvornu ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima uključila je odabir otapala i njegovog volumena te optimiranje temperature ekstrakcije, a dodatno je istražen utjecaj načina pripreme uzorka prije samog postupka ekstrakcije. Iako se tehnika MAE najčešće koristi za ekstrakciju različitih analita iz čvrstih uzoraka, u ovom radu se pokazala djelotvornom i za ekstrakciju spojeva PBDE iz uzoraka ljudskog mlijeka u tekućem stanju primjenom smjese otapala  $\varphi$  (kloroform, metanol) = 1:1 pri 100 °C (analitički povrat bio je od 46 % do 72 % uz medijan od 67 %). Takvi rezultati upućuju da bi tehnika MAE, uz dodatno optimiranje, mogla biti učinkovita zamjena za klasičnu tehniku ekstrakcije tekuće-tekuće u slučaju drugih vrsta postojećih organskih zagađivala, poput polikloriranih bifenila, koji su unatoč dugogodišnjoj zabrani korištenja i dalje prisutni u mjerljivim masenim udjelima u uzorcima ljudskog mlijeka.

Tehnika ekstrakcije potpomognute mikrovalovima pokazala se nedjelotvornom za ekstrakciju spojeva PBDE iz liofiliziranih uzoraka ljudskog mlijeka. Raspon analitičkih povrata spojeva pri ispitanim uvjetima bio je od 26 % do 56 % uz medijan od 35 %. Takvi rezultati upućuju da se uklanjanjem prirodno prisutne vode iz uzorka ljudskog mlijeka, čime se smanjuje polarnost smjese uzorka i otapala, smanjuje i djelotvornost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.



Spojevi PBDE djelotvorno su ekstrahirani pomoću tehnike MAE iz 5 g liofiliziranog ljudskog mlijeka otopljenog u 10 mL ultračiste vode s 30 mL smjese otapala  $\varphi$  (*n*-heksan, aceton) = 1:1 uz dodatak 3 mL mravlje kiseline i 6 mL propan-2-ola pri temperaturi od 80 °C tijekom 20 minuta. Navedena analitička metoda koja uključuje tehniku MAE i završnu plinskrokromatografsku analizu pročišćenih ekstrakata uz detektor zahvata elektrona, djelotvorna je i precizna za određivanje 7 spojeva PBDE u uzorcima ljudskog mlijeka. Analitički povrat spojeva PBDE bio je u rasponu od 60 % za BDE-47 do 84 % za BDE-183, uz relativnu standardnu devijaciju 7 %.

U uzorku ljudskog mlijeka korištenom za razradu metode analiziranom bez dodatka spojeva PBDE pri odabranim uvjetima detektiran je samo BDE-153 u masenom udjelu od 0,19 ng g<sup>-1</sup> masti. Taj rezultat i činjenica da u ekstraktima uzoraka ljudskog mlijeka analiziranim većinom isprobanih kombinacija parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima nisu detektirani ciljani PBDE kongeneri ukazuje da su razine tih spojeva u uzorcima ljudskog mlijeka vrlo niske. Obzirom da se za razradu metode koristilo mlijeko roditelje drugorotke skupljano u razdoblju od 6 do 10 mjeseci nakon poroda, potrebno je analizirati dodatne uzorke ljudskog mlijeka kako bi se donijeli konkretni zaključci o masenim udjelima ovih spojeva u ljudskom mlijeku u Hrvatskoj.

## § 6. LITERATURNI IZVORI

1. UNEP. Guidance for the Inventory of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) Listed under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. *United Nations Environ. Program.* **127** (2017) 66–75.
2. C. M. Ohajinwa, P. M. Van Bodegom, Q. Xie, J. Chen, M. G. Vijver, O. O. Osibanjo, W. J. G. M. Peijnenburg, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **16(3)** (2019) 360
3. Y. Wu, G. Z. Miller, J. Gearhart, K. Romanak, V. Lopez-avila, M. Venier, *Environ. Sci. Technol. Lett.* **6(1)** (2019) 14–20.
4. M. Bedi, N. von Goetz, C. Ng, *Environ. Int.* **138** (2020) 105652.
5. H. Q. Anh, V. D. Nam, T. M. Tri, N. M. Ha, N. T. Ngoc, P. T. N.Mai, D. H. Anh, N. T. Minh, N. A. Tuan, T. B. Minh, *Environ. Geochem. Health* **39(4)** (2017) 935–954.
6. N. Wu, T. Herrmann, O. Paepke, J. Tickner, R. Hale, E. Harvey, M. La Guardia, M. D. McClean, T. F. Webster, *Environ. Sci. Technol.* **41 (5)** (2007) 1584–1589.
7. X. Li, Y. Tian, Y. Zhang, Y. Ben, Q. Lv, *J. Environ. Sci. (China)* **52** (2017) 305–313.
8. H. Matovu, M. Sillanpää, P. Ssebugere, *Sci. Total Environ.* **692** (2019) 1106–1115.
9. G. Devanathan, A. Subramanian, A. Sudaryanto, S. Takahashi, T. Isobe, S. Tanabe, *Environ. Int.* **39(1)** (2012) 87–95.
10. B. Johnson-Restrepo, K. Kannan, *Chemosphere* **76(4)** (2009) 542–548.
11. L. Dimitriadou, G. Malarvannan, A. Covaci, E. Iossifidou, J. Tzafettas, V. Zournatzi-Koioi, O. I. Kalantzi, *Sci. Total Environ.* **539** (2016) 350–358.
12. A. A. Sagiroglu, S. E. K. Tekkeli, C. Onal, D. Dincel, A. Onal, *J. Chil. Chem. Soc.* **65** (2020) 4726–4736.
13. E. Akortia, J. O. M. L. Okonkwo, S. D. Osae, A. P. Daso, O. I. Olukunle, C. Abdul, *Environ. Rev.* **24(3)** (2016) 253–273.
14. A. Kierkegaard, U. Sellström, M. S. McLachlan, *J. Chromatogr. A* **1216(3)** 364–375.
15. D. Klinčić, M. Dvorščak, M. Jagić, K. Mendaš, G. Herceg Romanić, *Environ. Sci. Pollut. Resi* **27(6)** (2020) 5744–5758.
16. S. Król, B. Zabiegała, J. Namieśnik, *Talanta* **93** (2012) 1–17.
17. A. J. Fraser, T. F. Webster, M. D. McClean, *Environ. Health Perspect.* **117(10)** (2009)

- 1520–1525.
18. L. Bramwell, S. Harrad, M. Abou-Elwafa Abdallah, C. Rauert, M. Rose, A. Fernandes, T. Pless-Mulloli, *Chemosphere* **189** (2017) 186–197.
19. P. Rantakokko, E. Kumar, J. Braber, T. Huang, H. Kiviranta, E. Cequier, C. Thomsen, *Chemosphere* **223** (2019) 99–107.
20. K. Kademoglou, F. Xu, J. A. Padilla-Sanchez, L. S. Haug, A. Covaci, C. D. Collins, *Environ. Int.* **102** (2017) 48–56.
21. P. O. Darnerud, S. Lignell, M. Aune, M. Isaksson, T. Cantillana, J. Redeby, A. Glynn, *Environ. Res.* **138** (2015) 352–360.
22. W. Guo, A. Holden, S. Crispo, R. Gephart, M. Petreas, J. Park, *Chemosphere* **150** (2016) 505–513.
23. L. Bramwell, A. Fernandes, M. Rose, S. Harrad, T. Pless-Mulloli, *Chemosphere* **116** (2014) 67–74.
24. S. A. Marchitti, S. E. Fenton, P. Mendola, J. F. Kenneke, E. P. Hines, *Environ. Health Perspect.* **125(4)** (2017) 706–713.
25. I. M. S. K. Ilankoon, Y. Ghorbani, M. N. Chong, G. Herath, T. Moyo, J. Petersen, *Waste Manag.* **82** (2018) 258–275.
26. Q. Qin, X. Xu, Q. Dai, K. Ye, C. Wang, X. Huo, *Environ. Geochem. Health.* **41** (2019) 93–123.
27. P. O. Darnerud, *Environ. Int.* **29(6)** (2003) 841–583.
28. E. A. Gibson, E. L. Siegel, F. Eniola, J. B. Herbstman, P. Factor-Litvak, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **15(8)** (2018) 1636.
29. J. D. Meeker, P. I. Johnson, D. Camann, R. Hauser, . *Sci. Total Environ.* **407(10)** (2009) 3425–3429.
30. D. S. Drage, F. A. Harden, T. Je, J. F. Mueller, P. Hobson, L. L. Toms, *Environ. Int.* **122** (2019) 363–368.
31. J. Chovancová, K. Čonka, A. Kočan, Z. S. Sejáková, *Chemosphere* **83(10)** (2011) 1383–1390.
32. S. Ben Hassine, W. Ben Ameer, N. Gandoura, M. R. Driss, *Chemosphere* **89(4)** (2012) 369–377.
33. K. Jakobsson, J. Fång, M. Athanasiadou, A. Rignell-Hydbom, Å. Bergman, *Environ.*

- Int.* **47** (2012) 121–130.
34. T. Chen, M. Huang, J. Li, J. Li, Z. Shi, *Sci. Total Environ.* **689** (2019) 278–286.
35. P. Berton, S. B. Mammana, D. A. Locatelli, N. B. Lana, A. B. Camargo, J. C. Altamirano, *Electrophoresis* **38** (2017) 460–468.
36. J. She, A. Holden, M. Sharp, M. Tanner, C. Williams-Derry, K. Hooper, *Chemosphere* **67(9)** (2007) S307–S317.
37. M. A. E. Abdallah, S. Harrad, *Environ. Int.* **63** (2014) 130–136.
38. L. Zhang, S. Yin, Y. Zhao, Z. Shi, J. Li, Y. Wu, *Chemosphere* **189** (2017) 32–38.
39. E. Čechová, Š. Vojta, P. Kukučka, A. Kočan, T. Trnovec, L. P. Murinova, M. de Cock, M. van de Bor, J. Askevold, M. Eggesbø, Martin Scheringer, *Environ. Int.* **108** (2017) 137–145.
40. S. Lacorte, M. G. Ikonomou, *Chemosphere* **74(3)** (2009) 412–420.
41. M. Byczkiewicz, M. Jabłoński, *Polish J. Environ. Stud.* **24(3)** (2015) 961–968.
42. P. Koryt'ar, A. Covaci, J. De Boer, A. Gelbin, *J. Chromatogr. A* **1065** (2005) 239–249.
43. N. Galić, V. Drevenkar, *Skripta Iz Kolegija Instrumentna Analitika 2* (2006)
44. M. H. B. Müller, A. Polder, O. B. Brynildsrud, E. Lie, K. B. Løken, W. B. Manyilizu, R. H. Mdegela, F. Mokiti, M. Murtadha, H. E. Nonga, J.U. Skaare, J. L. Lyche, *Environ. Int.* **89–90** (2016) 38–47.
45. B. Cetin, S. Yurdakul, M. Odabasi, *Sci. Total Environ.* **646** (2019) 1164–1171.
46. Z. J. Chen, H. Y. Liu, Z. Cheng, Y. B. Man, K. S. Zhang, W. Wei, J. Du, M. H. Wong, H. S. Wang, *Environ. Int.* **73** (2014) 77–84.
47. A. Basis, D. Voutsas, C. Samara, *Environ. Pollut.* **215** (2016) 113–124.
48. J. P. Antignac, K. M. Main, H. E. Virtanen, C. Y. Boquien, P. Marchand, *Environ. Pollut.* **218** (2016) 728–738.
49. J. Zhang, L. Chen, L. Xiao, F. Ouyang, Q. -Y. Zhang, Z. -C Luo, *Epidemiology* **28** (2017) S89–S97.
50. A. M. Ingelido, T. Ballard, E. Dellatte, A. di Domenico, F. Ferri, A. R. Fulgenzi, T. Herrman, N. Iacovella, R. Miniero, O. Pöpke, M. G. Porpora, E. De Felip, *Chemosphere* **67(9)** (2007) 301–306.
51. J. A. Björklund, U. Sellström, C. A. de Wit, M. Aune, S. Lignell, P. O. Darnerud, *Indoor Air* **22(4)** (2012) 279–288.

52. Ö. Erdoğrul, A. Covaci, N. Kurtul, P. Schepens, *Environ. Int.* **30(5)** (2004) 659–666.
53. H. J. Geyer, K. –W. Schramm, P. O. Darnerud, M. Aune, E. A. Feicht, K. W. Fried, B. Henkelmann, D. Lenoir, P. Schmid, T. A. McDonald, *Organohalogen Compd.* **2004** **66** (2015) 3820–3825.

## § 7. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Lucija Besednik

Datum rođenja: 02. prosinca 1995.

Mjesto rođenja: Zabok

### Obrazovanje

2002-2010 Osnovna škola Veliko Trgovišće, Područna škola Dubrovčan

2010-2014 Srednja škola Gimnazija Antuna Gustava Matoša, Zabok

2014-2018 Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016 Otvoreni dan kemije