IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Polibromodibenzodiossine e Polibromodibenzofurani: metodi di analisi e livelli di contaminazione negli alimenti

I risultati della ricerca corrente condotta dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise. Anno 2015, Teramo 13 Giugno 2017

Gianfranco Diletti

LNR diossine e PCB in alimenti e mangimi

IZS AM 08/13 RC

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute, Dipartimento della Sanità Pubblica Veterinaria, della Sicurezza Alimentare e degli Organi Collegiali per la Tutela della Salute

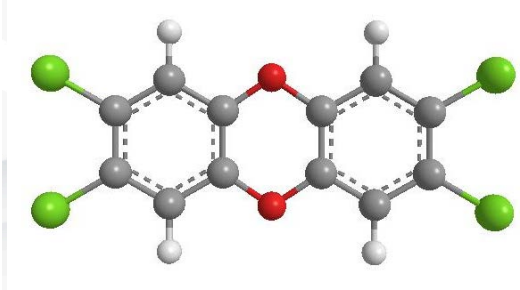
Progetto IZS AM 08/13 RC

Introduzione

Obiettivi della ricerca

Obiettivi che la ricerca si propone di raggiungere:

- ***Sviluppo di un metodo di analisi per la determinazione dei livelli di contaminazione da PBDD e PBDF negli alimenti;***
- **Determinazione dei livelli di contaminazione da PBDD e PBDF in alcuni alimenti di origine animale;**
- **Valutazione dell'esposizione umana attraverso la dieta.**



Polibromodibenzodiossine (PBDD) e Polibromodibenzofurani (PBDF)

Sono composti organici bromurati prodotti non intenzionalmente dall'uomo ma che si originano per degradazione fotolitica e termica in alcune classi di ritardanti di fiamma, o come sottoprodotti indesiderati durante la produzione delle miscele tecniche di polibromodifenileteri (PBDE)

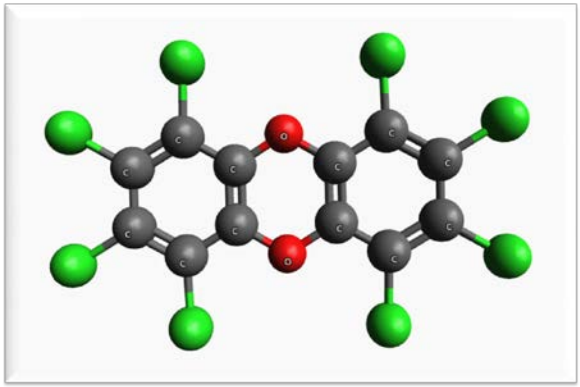
Introduzione

PBDD - PBDF

POLIBROMODIBENZODIOSSINE (PBDD)

Due anelli benzenici bromurati legati da due ponti a ossigeno

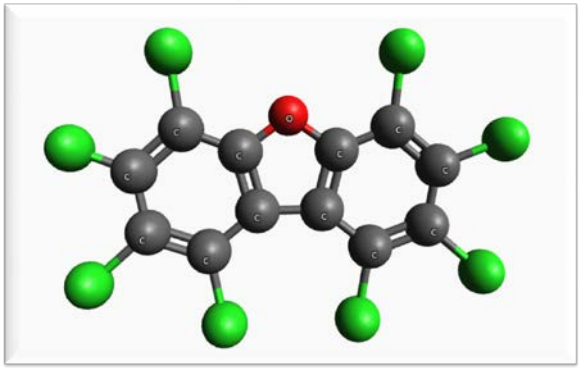
75 isomeri



POLIBROMODIBENZOFURANI (PBDF)

Due anelli benzenici bromurati legati da un ponte a ossigeno

135 isomeri



= **H** or **Br** = **C** = **O**

Introduzione

PBDD - PBDF

Proprietà chimico-fisiche

- Bassa tensione di vapore;
- Elevata temperatura di fusione e di ebollizione;
- Alto coefficiente di distribuzione ottanolo/acqua (log Kow > 6);
- Elevata solubilità nei grassi;
- Scarsa solubilità in acqua;
- Degradabili ai raggi UV.

Introduzione

PBDD - PBDF

Proprietà tossicologiche

Dati di letteratura suggeriscono che i sette congeneri di PBDD e i dieci congeneri di PBDF 2,3,7,8 sostituiti abbiano un profilo di tossicità assimilabile a quello dei loro omologhi clorurati. L'effetto "diossina simile" è probabilmente dovuto ad un comune meccanismo di azione attraverso il legame con il recettore arilico (AhR) presente sulle membrane cellulari.

Gli studi condotti su animali da laboratorio indicano, quali effetti tossici sulla salute:

- **atrofia del timo;**
- **teratogenesi;**
- **effetti sistema riproduttivo;**
- **immunotossicità;**
- **diminuzione dei livelli di ormoni tiroidei;**
- **cloracne**

Introduzione

PBDD - PBDF

Come si producono e modalità di rilascio

- **Sottoprodotti indesiderati dei processi di combustione in presenza di sorgenti di Bromo (in particolare ritardanti di fiamma bromurati);**
- **Sottoprodotti nella sintesi di ritardanti di fiamma;**
- **Degradazione fotolitica di miscele tecniche di decabromodifenileteri;**
- **Formazione biogenica (tri-tetra bromurati) in ambiente marino in presenza di bromofenoli.**

Introduzione

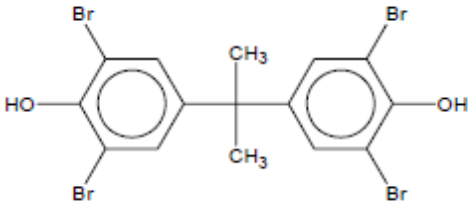
PBDD - PBDF

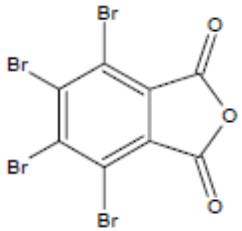
Utilizzo dei ritardanti di fiamma (BFR)

I BFR comprendono circa 20 classi di cui 3 sono state impiegate largamente: tetrabromobisfenolo A (TBBPA), esabromociclododecano (HBCD), e tre miscele commerciali di PBDE (deca-BDE, octa-BDE, penta-BDE)

Covalentemente legati ai polimeri:

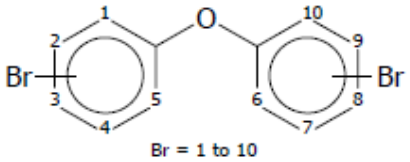
- **Tetrabromobisfenolo A**
- **Anidride tetrabromoftalica**

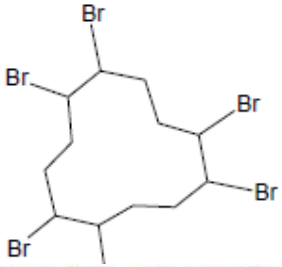




Additivati ai polimeri:

- **Polibromodifenileteri**
- **Esabromociclododecano**





Con ritardanti di fiamma

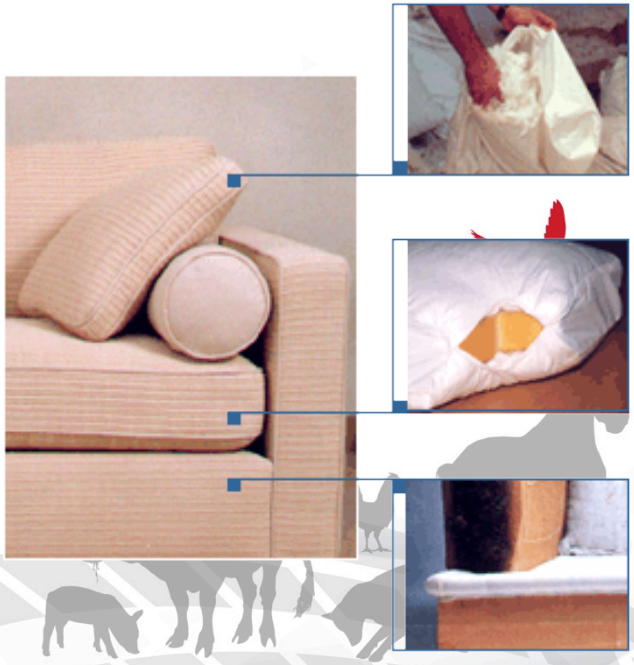
Senza ritardanti di fiamma

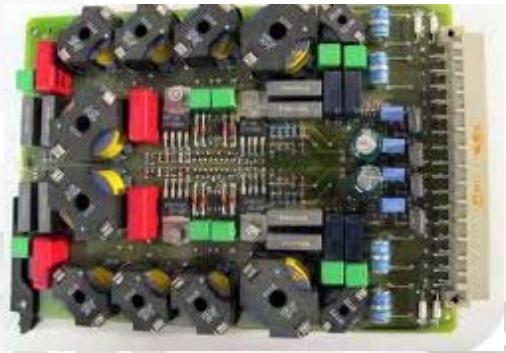
Introduzione

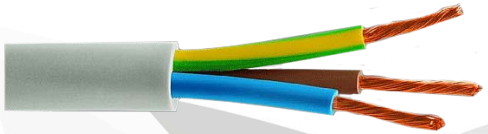
PBDD - PBDF

Utilizzo dei ritardanti di fiamma (BFR)

In particolare sono impiegati nella produzione di elettrodomestici, strumenti elettronici, veicoli, tappezzerie, prodotti tessili, arredamenti ecc..







Introduzione

PBDD - PBDF

Perché ci preoccupano

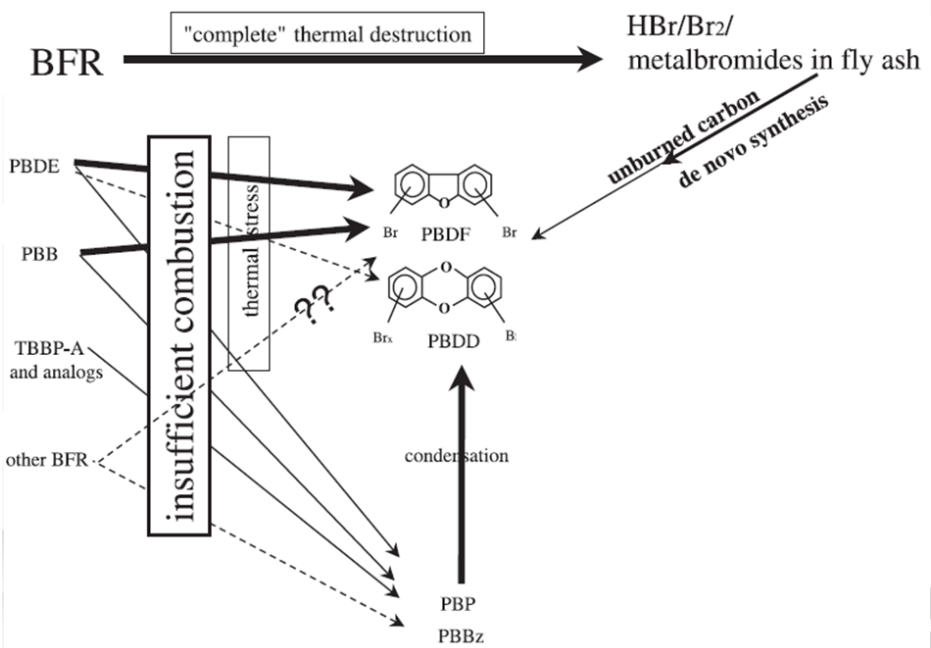
- I BFR entrano nella catena alimentare;
- Gli alimenti rappresentano la principale via di esposizione per l'uomo;
- Gli effetti biologici sono legati alla loro persistenza nei diversi comparti ambientali e ai fenomeni di bioaccumulo osservato in numerose specie

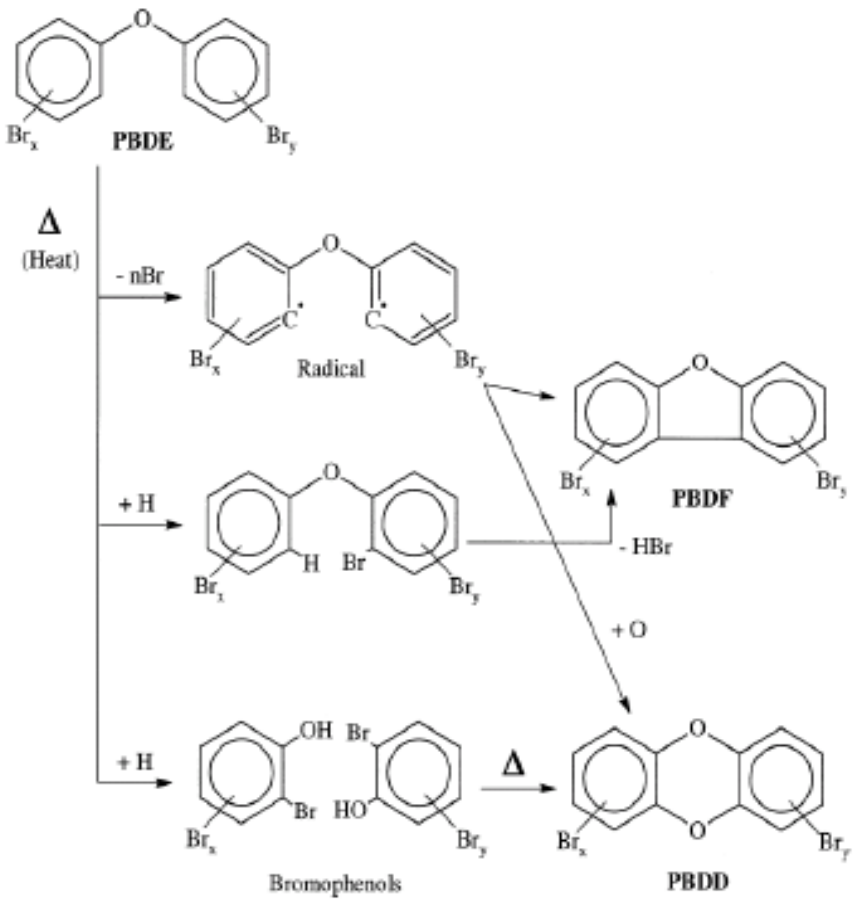
Introduzione

PBDD - PBDF

Perché ci preoccupano

Inoltre la loro combustione può determinare la formazione dei composti bromurati più tossici come i PBDD e PBDF





Introduzione

PBDD - PBDF

Perché ci preoccupano

5.3.2014 IT Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 65/39

RACCOMANDAZIONE DELLA COMMISSIONE

del 3 marzo 2014

sul monitoraggio di tracce di ritardanti di fiamma bromati negli alimenti

(Testo rilevante ai fini del SEE)

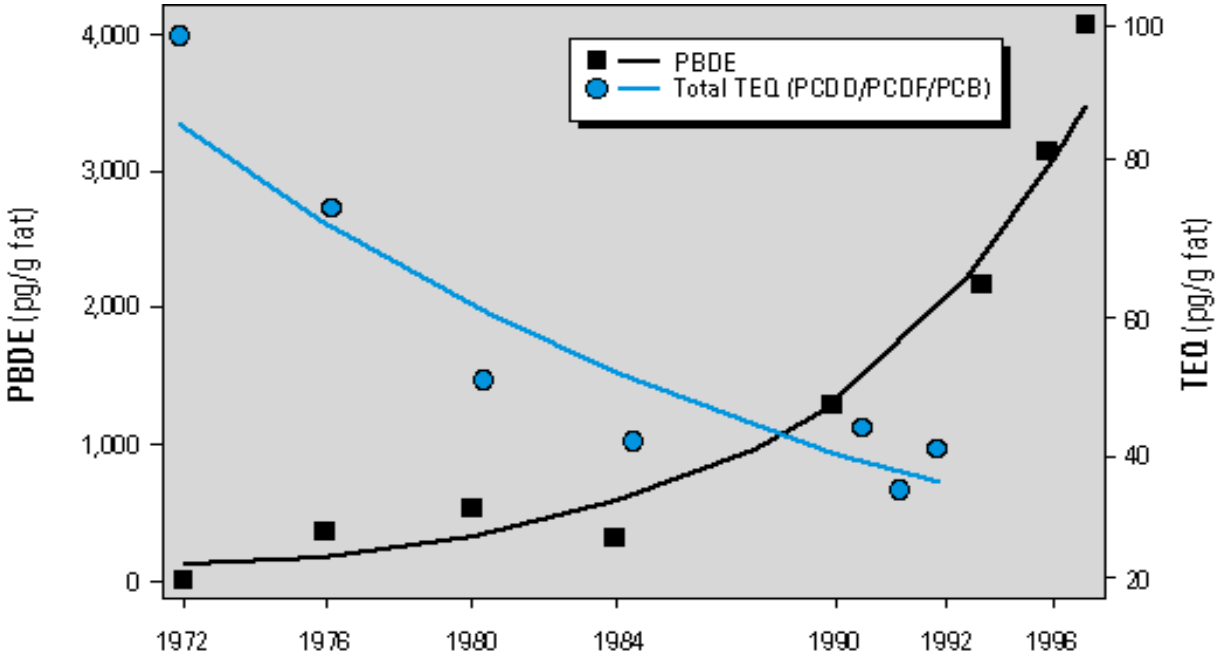
(2014/118/UE)

1) È necessario che nel 2014 e nel 2015 gli Stati membri effettuino il monitoraggio della presenza di ritardanti di fiamma bromati negli alimenti. Il monitoraggio dovrebbe interessare un'ampia varietà di prodotti alimentari che tenga conto delle abitudini di consumo al fine di consentire una stima esatta dell'esposizione……..

Introduzione

I BFR nell'ambiente

Tali inquinanti ambientali sono divenuti ubiquitari (acqua, aria e terreno) la loro concentrazione nell'ambiente, negli ultimi anni, è aumentata in maniera considerevole.



Livelli PBDE, Diossine e PCB nel latte materno in Svezia

Norén and Mieronyté, O.C. 1998

Materiali e metodi

Procedura analitica sviluppata

Estrazione

Omogeneizzazione

Diluizione isotopica ($^{13}C_{12}$ – PBDD/F)

Estrazione ASE; partizione Liq-Liq

Purificazione

Purificazione per partizione con H_2SO_4

Purificazione cromatografica (Silica multistrato-Allumina – carbone/celite)

Analisi strumentale

HRGC/HRMS

Sensibilità

Selettività

Interpretazione risultati

Materiali e metodi

Congeneri selezionati

PBDD/F Naturali	Standard interno ($^{13}C_{12}$)	Standard di iniezione ($^{13}C_{12}$)
	Bromodiossine	
2,3,7,8-TBrDD	2,3,7,8-TBrDD- $^{13}C_{12}$	1,2,3,7,8-PeBrDF- $^{13}C_{12}$
1,2,3,7,8-PeBrDD	1,2,3,7,8-PeBrDD- $^{13}C_{12}$	
1,2,3,4,7,8-HxBrDD	1,2,3,4,7,8-HxBrDD- $^{13}C_{12}$	1,2,3,7,8,9-HxBrDD- $^{13}C_{12}$
1,2,3,6,7,8-HxBrDD	1,2,3,6,7,8-HxBrDD- $^{13}C_{12}$	
1,2,3,7,8,9-HxBrDD		
1,2,3,4,6,7,8-HpBrDD	1,2,3,4,6,7,8-HpBrDD- $^{13}C_{12}$	
OBrDD	OBrDD- $^{13}C_{12}$	
	Bromofurani	
2,4,6,8-TBrDF	2,3,7,8-TBrDF- $^{13}C_{12}$	1,2,3,7,8-PeBrDF- $^{13}C_{12}$
2,3,7,8-TBrDF		
1,2,3,7,8-PeBrDF	2,3,4,7,8-PeBrDF- $^{13}C_{12}$	
2,3,4,7,8-PeBrDF		
1,2,3,4,7,8-HxBrDF	1,2,3,4,7,8-HxBrDF- $^{13}C_{12}$	1,2,3,7,8,9-HxBrDD- $^{13}C_{12}$
1,2,3,4,6,7,8-HpBrDF	1,2,3,4,6,7,8-HpBrDF- $^{13}C_{12}$	
OBrDF	OBrDF- $^{13}C_{12}$	

Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

Materiali e metodi

Procedura analitica

❑ DILUIZIONE ISOTOPICA

Consiste nell'aggiungere al campione, prima dell'estrazione, una quantità nota di un composto marcato con isotopo stabile il $^{13}C_{12}$ che abbia le stesse caratteristiche chimico-fisiche degli analiti ricercati, ma un diverso valore di massa.

Le perdite del composto naturale interessano in ugual misura quelle del marcato, lasciando invariato il loro rapporto quantitativo.

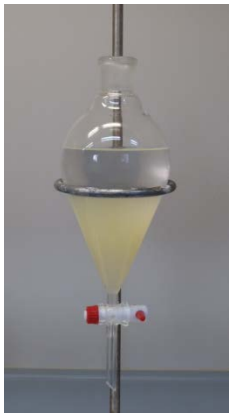
Con questa tecnica si verifica la bontà del processo analitico campione per campione.

Materiali e metodi

Procedura analitica

ESTRAZIONE

LATTE



ESTRAZIONE LIQUIDO-LIQUIDO

ETANOLO/AMMONIACA
ETERE ETILICO
ETERE DI PETROLIO

ALTRI ALIMENTI

ESTRAZIONE ASE ™

ESANO/ACETONE (80:20, v/v)
T = 125°C
P = 1500 psi
3 cicli di estrazione

Materiali e metodi

Procedura analitica

- **PURIFICAZIONE (fase 1)**

Estratto

Fase 1: partizione liquido – liquido

ACIDO SOLFORICO CONCENTRATO
SOLUZIONE ACQUOSA DI NaCl

Materiali e metodi

Procedura analitica

- **PURIFICAZIONE (fase 2)**

PBDD/F
PCB
PCDD/F
PBDE

Fase 2: purificazione su colonna di silica, alumina, carbone

POWER-PREP™

1. Silica multistrato
2. Allumina basica
3. Carbone

diclorometano:esano 5:95 (v/v)

PCB + PBDE

toluene

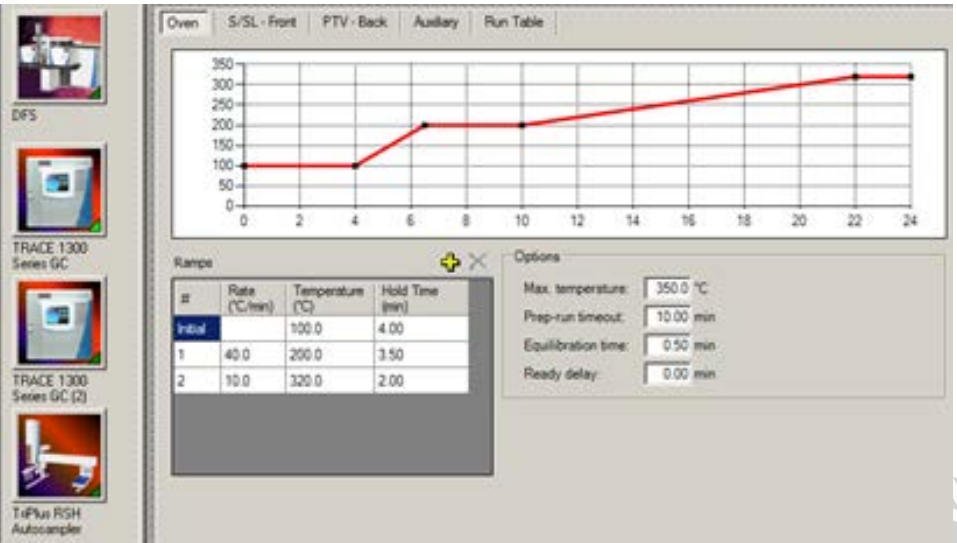
PCDD/F
+
PBDD/F

GC-HRMS

Materiali e metodi

Procedura analitica

❑ HRGC-HRMS



SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

- ✓ **DB-5 MS (15 m x 0.25 mm x 0.10 mm)**
- ✓ **Splitless;**
- ✓ **T_{inj} = 260 °C;**
- ✓ **T_{tr} = 290 °C**

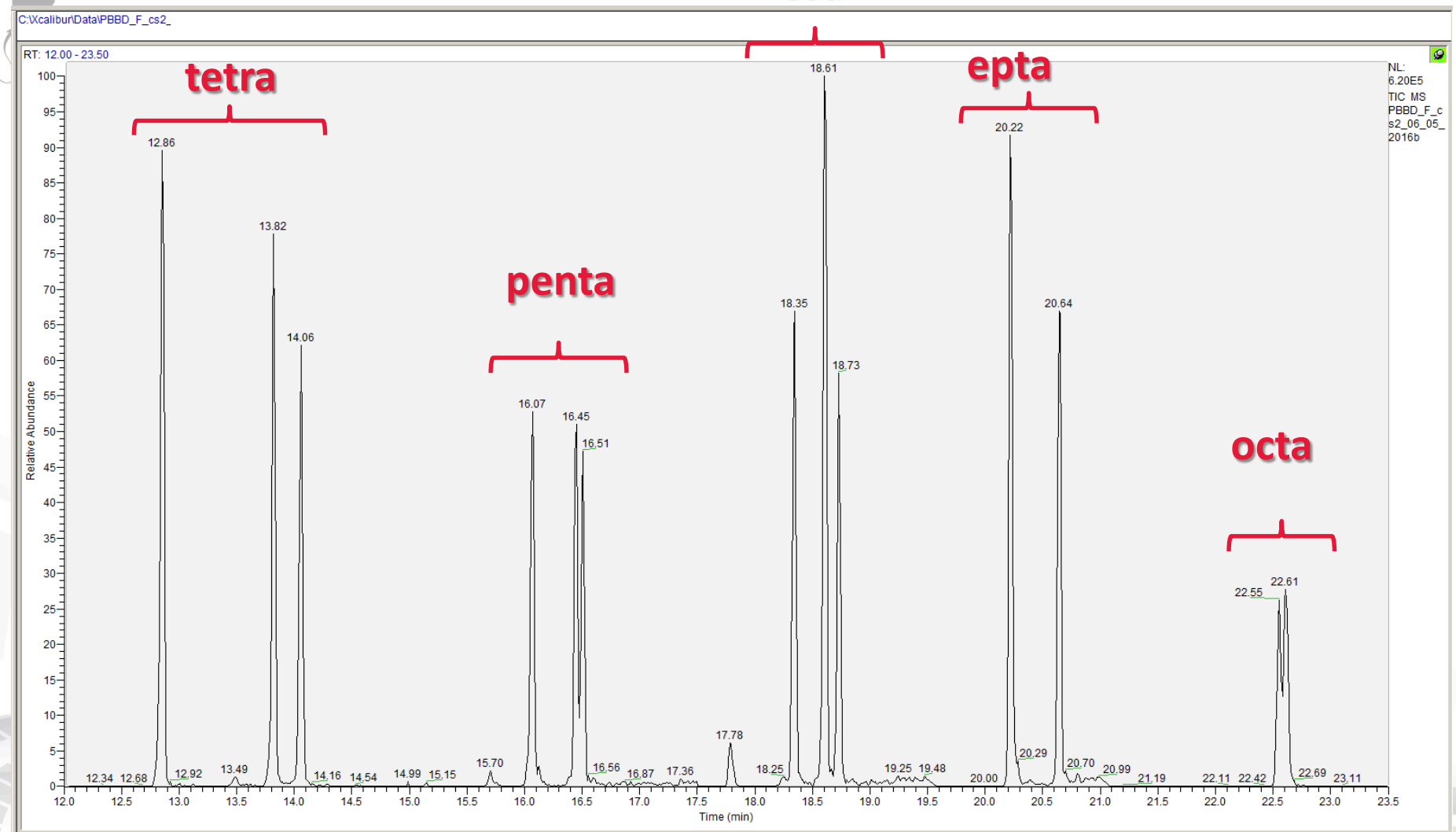
DETERMINAZIONE DEGLI ANALITI

- ✓ **Risoluzione ≥ 10 000**
- ✓ **Acquisizione in SIM mode**

Risultati e discussione

Procedura analitica

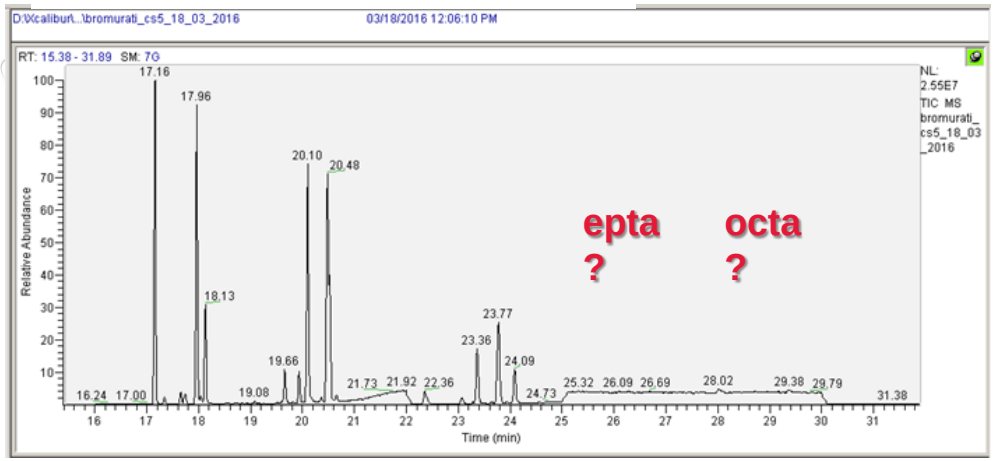
- **Cromatogrammi**



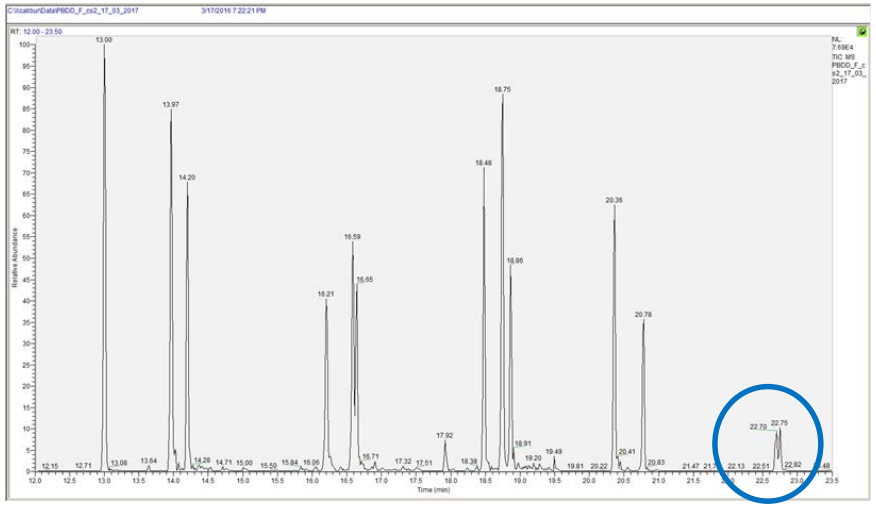
Risultati e discussione

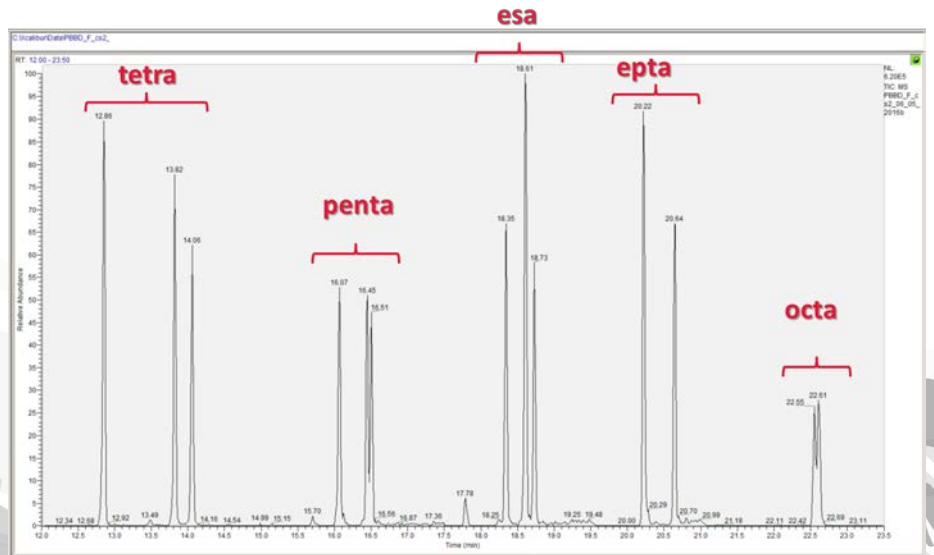
Procedura analitica

✓ **DB-5 MS**
(60 m x 0.25 mm x 0.10 mm)



✓ **DB-5 MS**
(30 m x 0.25 mm x 0.10 mm)



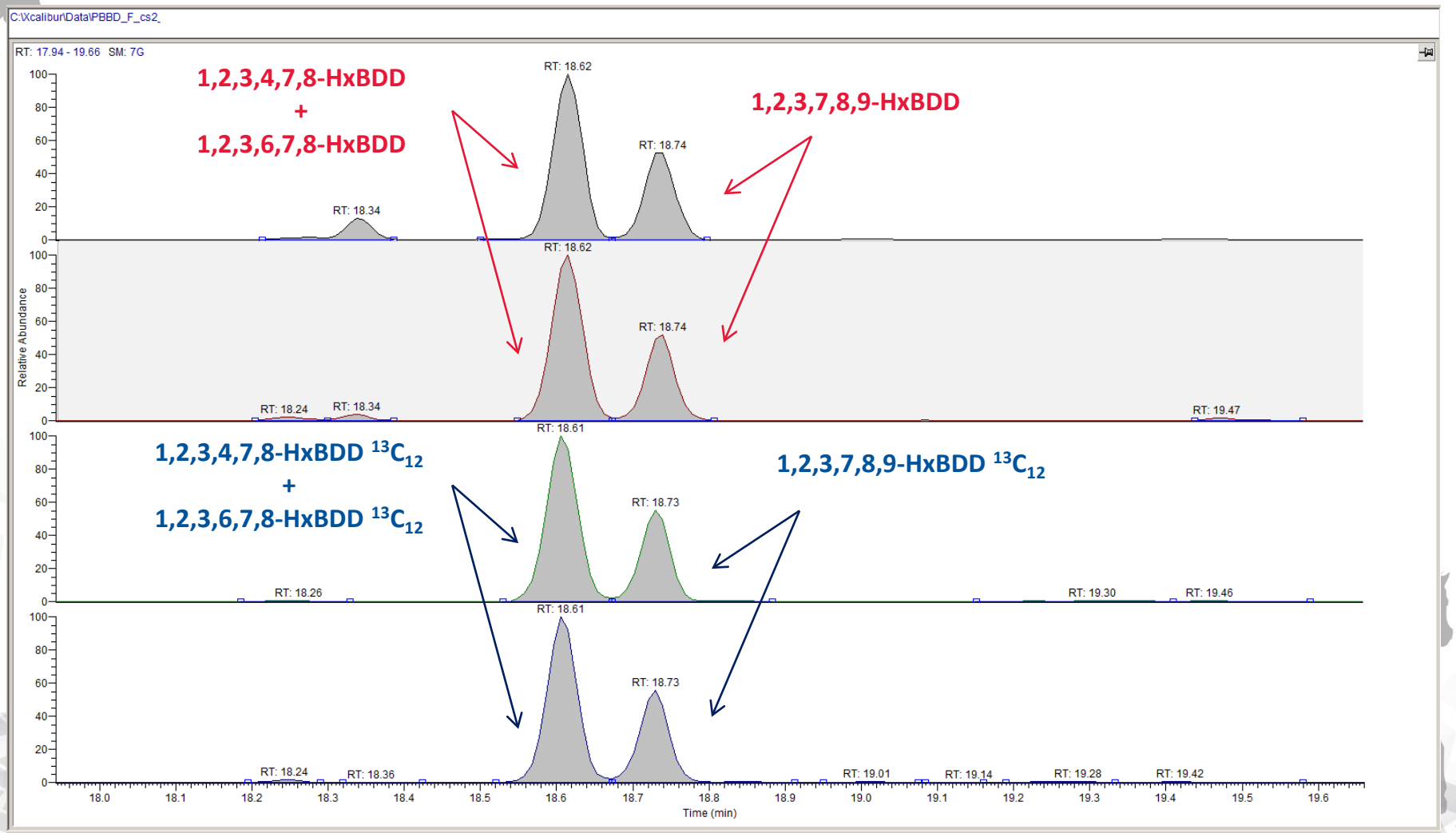


✓ **DB-5 MS**
(15 m x 0.25 mm x 0.10 mm)

Risultati e discussione

Procedura analitica

❑ Cromatogrammi



Materiali e metodi

Validazione del metodo

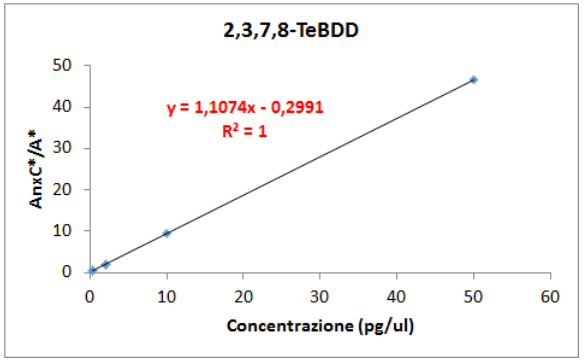
Sono stati analizzati 18 campioni negativi di muscolo di pesce a tre livelli di aggiunta corrispondenti a concentrazioni di 1, 2 e 4 pg/g di ogni congenere. I parametri considerati sono di seguito riportati:

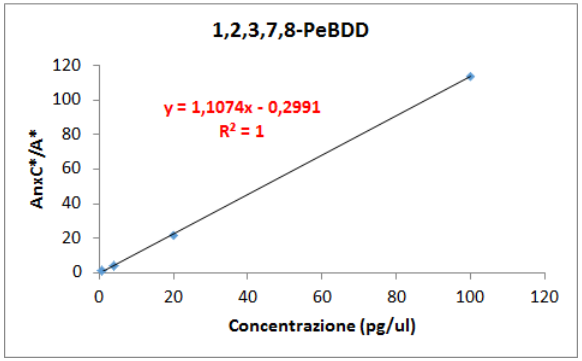
- **Linearità di risposta;**
- **Specificità;**
- **Precisione (ripetibilità/riproducibilità);**
- **Esattezza;**
- **Limite di quantificazione.**

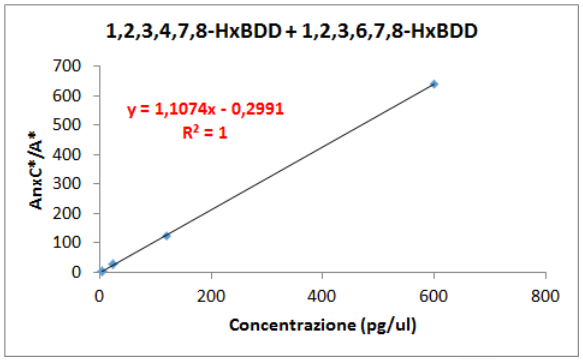
Risultati e discussione

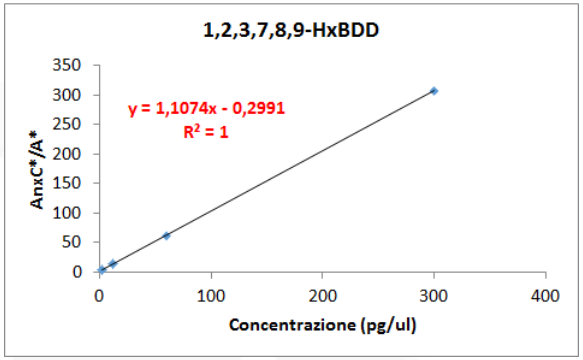
Validazione del metodo

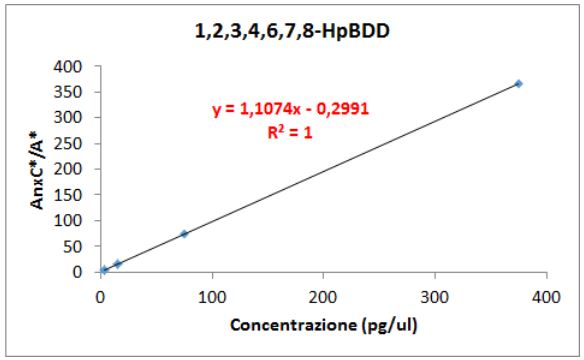
Linearità di risposta PBDDs

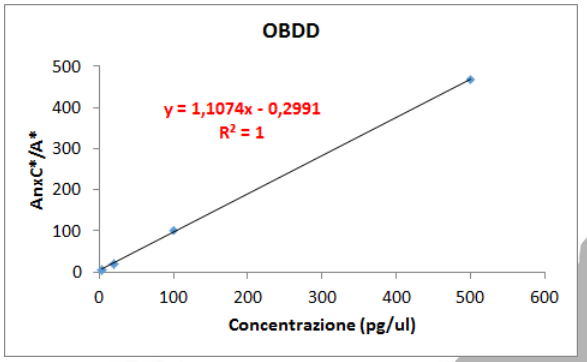








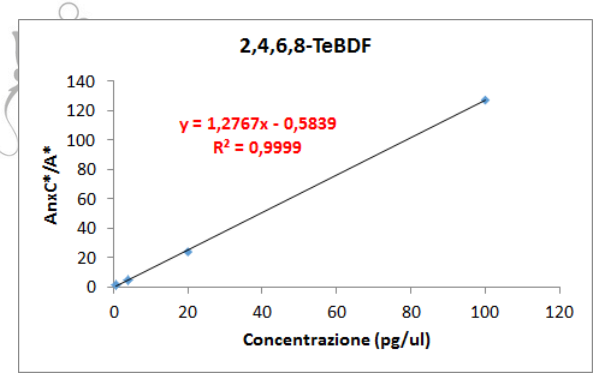


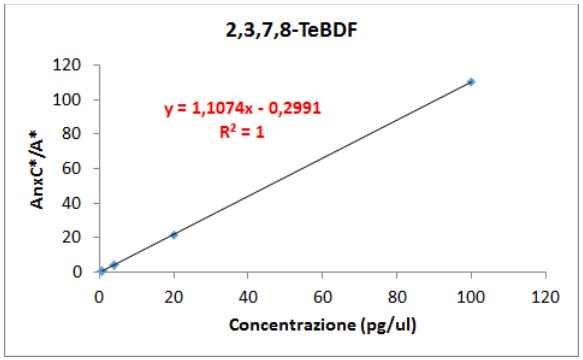


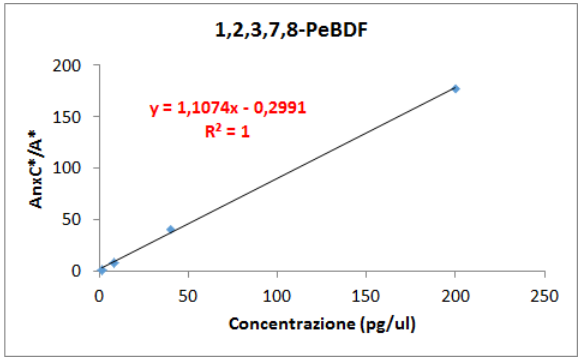
Risultati e discussione

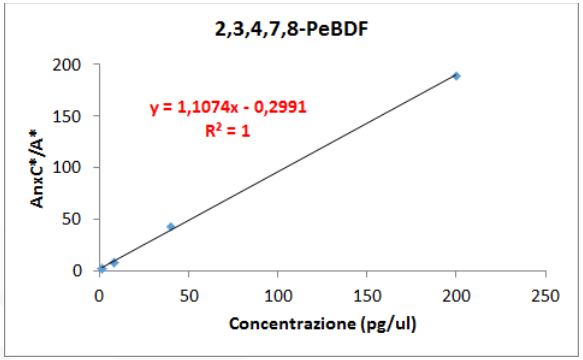
Validazione del metodo

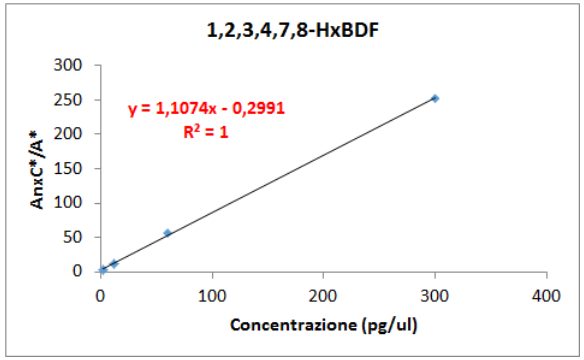
❑ Linearità di risposta PBDFs

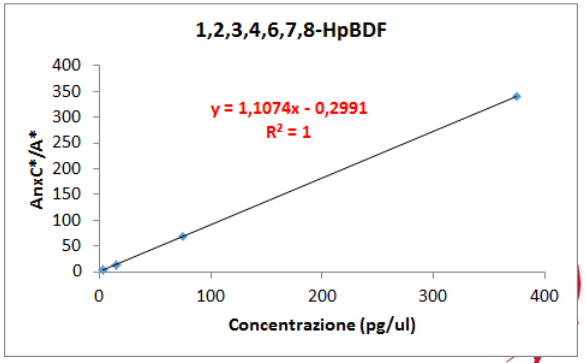


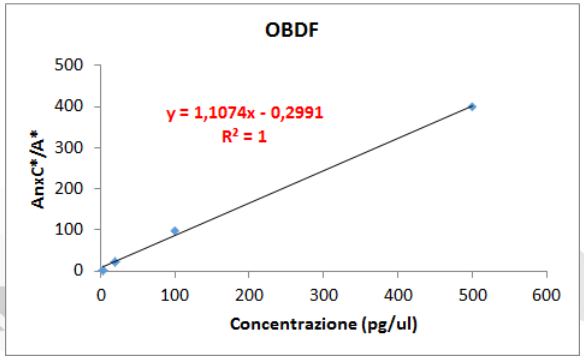












Risultati e discussione

Validazione del metodo

Specificità

Elenco degli isomeri di PCB, PCDD, PCDF e PBDE con cui sono state condotte prove di interferenza su colonna cromatografica

DIOSSINE	Quantità (ng)	PCB diossina-simili	Quantità (ng)	PCB indicatori	Quantità (ng)
Policlorodibenzo-*p*-diossine (PCDD)		non-orto-PCB			
2378-TCDD	1	PCB-77	2	PCB-28	5
12378-PeCDD	5	PCB-81	2	PCB-52	5
123478-HxCDD	5	PCB-126	2	PCB-101	5
123678-HxCDD	5	PCB-169	2	PCB-153	5
123789-HxCDD	5			PCB-138	5
1234678-HpCDD	5			PCB-180	5
OCDD	10				
Policlorodibenzofurani (PCDF)		mono-orto-PCB		Polibromodifenileteri	
2378-TCDF	1	PCB-123	2	BDE-28	25
12378-PeCDF	5	PCB-118	2	BDE-47	25
23478-PeCDF	5	PCB-114	2	BDE-66	25
123478-HxCDF	5	PCB-105	2	BDE-100	25
123678-HxCDF	5	PCB-167	2	BDE-99	25
234678-HxCDF	5	PCB-156	2	BDE-85	25
123789-HxCDF	5	PCB-157	2	BDE-154	25
1234678-HpCDF	5	PCB-189	2	BDE-153	25
1234789-HpCDF	5			BDE-183	25
OCDF	10				

Risultati e discussione

Validazione del metodo

❑ Ripetibilità, esattezza e incertezza di misura

Prove di ripetibilità condotte su 18 campioni negativi di muscolo di pesce a tre livelli di aggiunta corrispondenti a concentrazioni di 1, 2 e 4 pg/g

Analita	Esattezza (%)	Riproducibilità (RSD%)	Incertezza (%)
2,3,7,8-TeBDD	93,4	8,6	31,2
1,2,3,7,8-PeBDD	97,0	9,5	31,8
1,2,3,4,7,8-HxBDD + 1,2,3,6,7,8-HxBDD	106,0	9,4	30,7
1,2,3,7,8,9-HxBDD	110,2	12,4	35,1
OBDD	102,8	19,6	46,1
2,3,7,8-TeBDF	99,6	7,3	28,9
1,2,3,7,8-PeBDF	99,1	10,8	34,1
2,3,4,7,8-PeBDF	103,8	10,7	35,0
1,2,3,4,7,8-HxBDF	106,8	8,7	28,6
1,2,3,4,6,7,8-HpBDF	96,1	9,4	32,7

Risultati e discussione

Validazione del metodo

- **Limite di quantificazione (LOQ)**

PESCE/CARNE: 0,010 – 0,60 pg/g prodotto intero

LATTE: 0,005 – 0,20 pg/g prodotto intero

Una compressa di aspirina da 0.5 g disciolta all'interno di uno stadio pieno d'acqua, determina una concentrazione di circa 0.3-0.5 pg/g di acido acetilsalicilico.

Risultati e discussione

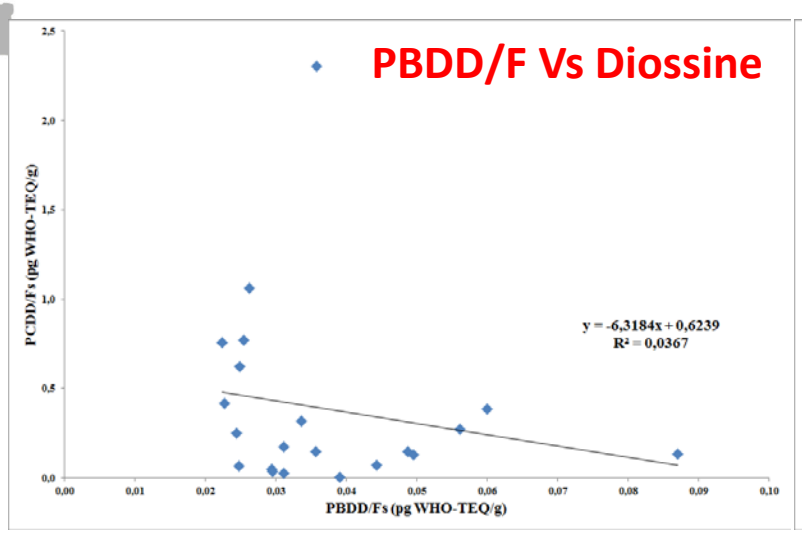
Analisi su campioni reali: risultati analitici

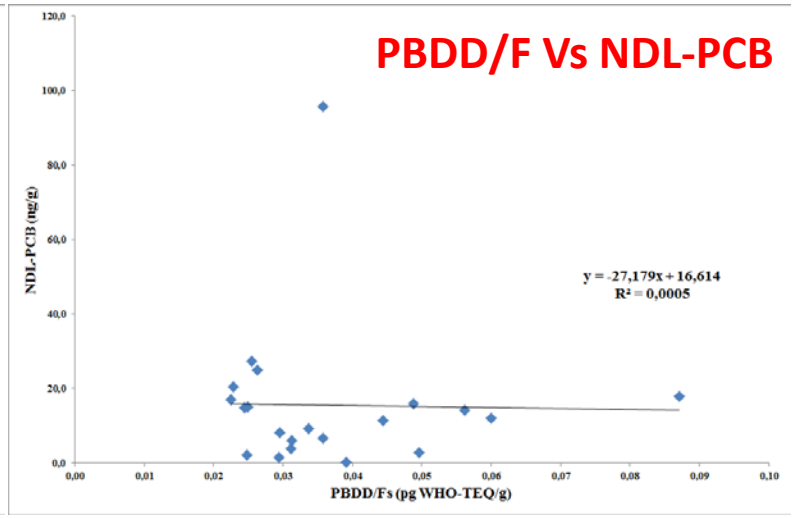
Livelli medi di contaminazione negli alimenti

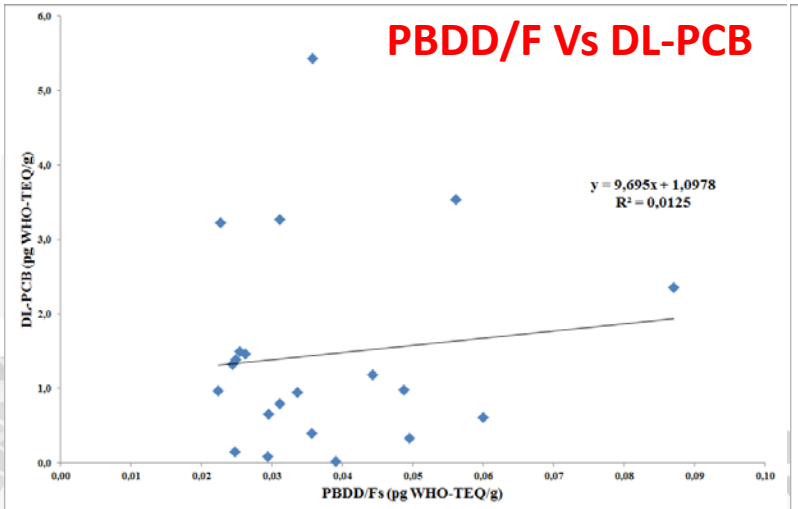
Matrice esaminata	n° campioni esaminati	Valore medio (pg WHO-TEQ/g)
Latte bovino	4	0,020
Carne suino	4	0,017
Carne bovino	4	0,030
Carne pollo	4	0,010
Uova	4	0,050
Pesci e molluschi	26	0,070

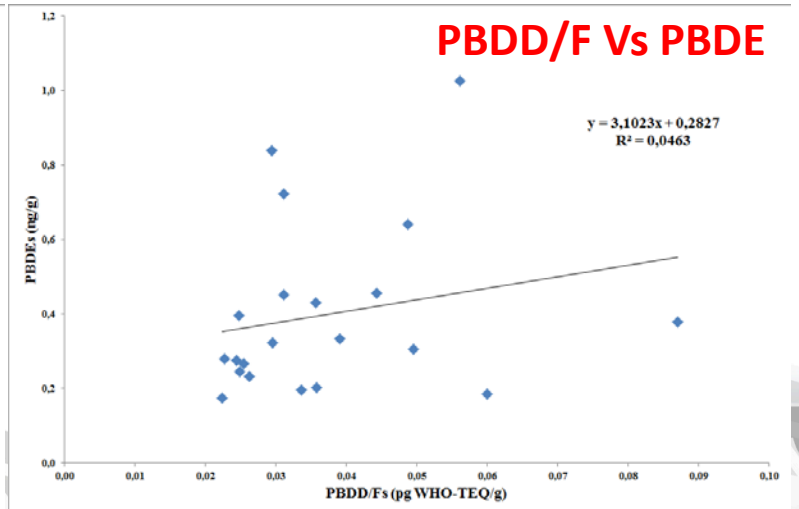
Risultati e discussione

Correlazioni tra le diverse classi di contaminanti







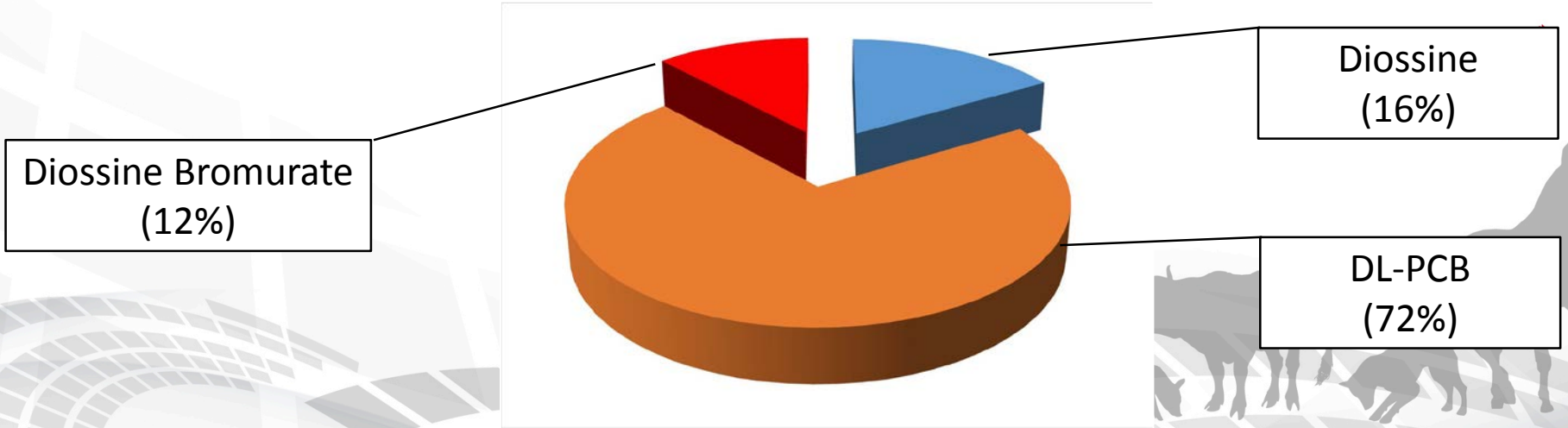


Risultati e discussione

Stima di assunzione con la dieta

Livelli mediani di contaminazione nei pesci e assunzione giornaliera

Concentrazione (pg WHO-TEQ/g)			Daily Intake (pg WHO-TEQ/kg p.c/giorno)		
Diossine Bromurate (n. 26)	Diossine (n. 381)	DL-PCB (n. 381)	Diossine Bromurate	Diossine	DL-PCB
0,036	0,050	0,217	0,018	0,025	0,108



Conclusioni

- Il metodo validato permette l'analisi simultanea di più classi di contaminanti;
- gli alimenti analizzati hanno mostrato bassi livelli di contaminazione da diossine bromurate;
- i livelli di contaminazione rilevati, sono comparabili con quelli presenti in letteratura;
- l'esposizione con gli alimenti a tali contaminanti sembra essere relativamente modesta e meno rilevante rispetto a diossine e PCB;
- questa ricerca, rappresenta il primo studio sulla presenza di diossine bromurate negli alimenti provenienti dal territorio italiano.

Conclusioni

BFR YORK2017
7th-10th May 2017

Simultaneous determination of PCDD/Fs, PCBs, PBDEs and PBDD/Fs in fish and mussels from the Mediterranean Sea

Ceci R.*, De Benedictis A., De Massis M.R., Leva M., Pirito L., Vairano I., Diletti G.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Campo Boario, Teramo, Italy
*Presenting author: r.ceci@izs.it

IZSAM G.CAPORALE TERAMO
PCDD/F e PCB
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Introduction

Brominated flame retardants (BFRs), such as polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), have been largely used in a variety of consumer products for many decades in order to inhibit the initial phase of a developing fire and prevent human injury. Furthermore, incineration of waste containing BFRs can also generate persistent environmental contaminants such as polybrominated dibenzo-*p*-dioxins and furans (PBDD/Fs). The structural similarity of PBDD/Fs and PBDEs to dioxins and polychlorinated biphenyls (PCBs) and their consistent detection in biota and environmental samples are evidence of the persistent nature of these contaminants. In addition, these contaminants are chemicals of concern because of their persistence, bioaccumulation, and potential for toxicity, both in animals and in humans[1-4].

Human exposure to these contaminants can occur from a variety of routes, including consumption of contaminated food. Therefore is important to evaluate the occurrence of these contaminants in food, in order to estimate the human dietary exposure to these compounds.

Aim of this study was to evaluate the levels of PCDD/Fs, dioxin-like PCBs (DL-PCBs), non-dioxin-like PCBs (NDL-PCBs), PBDEs and PBDD/Fs in fish samples. This study is part of a larger investigation that is still ongoing.

Materials and methods

Sampling

A total of 60 samples (including eggs, meat, milk, fish and mussels) were randomly collected between January 2014 and February 2016 by the regional veterinary services, covering the national territory. The samples were stored frozen prior to analysis. Up to now, 21 samples of fish and mussels have been analyzed for PCDD/Fs, DL-PCBs, NDL-PCBs, PBDEs and PBDD/Fs. Details on the fish and mussel species are reported in **Table 1**. Fish samples were collected from the Mediterranean sea off the coast of Sicily and Apulia. Samples of mussels were collected from aquaculture industry in mussel farming located near the industrial area of Taranto, known to be contaminated by PCDD/Fs and PCBs.

Analytes and standards

The following analytes were determined: the **17**, 2378-chloro-substituted PCDD/Fs; non-*ortho*-substituted PCBs (IUPAC numbers **77, 81, 126, 169**); mono *ortho*-substituted PCBs (IUPAC numbers **28, 52, 101, 105, 114, 118, 123, 138, 153, 156, 157, 167, 180, 189**); PBDEs (IUPAC numbers **28, 47**, 66, 85, **99, 100, 153, 154, 183**); and 14 PBDD/Fs

Bibliografia

L.S. Birnbaum, D.F. Staskal, J.J. Diliberto. 2003. Health effects of polybrominated dibenzo-p-dioxins (PBDDs) and dibenzofurans (PBDFs). Environment International 29, 855– 860.

- Birnbaum, L. S., & Staskal, D. F. 2004. Brominated flame retardants: cause for concern? Environ Health Perspect, 112(1), 9-17.
- A. Fernandes, P. Dicks, D. Mortimer, M. Gem, F. Smith, M. Driffield, S. White, M. Rose. 2008. Brominated and chlorinated dioxins, PCBs and brominated flame retardants in Scottish shellfish: methodology, occurrence and human dietary exposure. Molecular Nutrition and Food Research, 52, 238–249.
- A. Fernandes, D. Mortimer, M. Gem, P. Dicks, F. Smith, S. White, M. Rose. 2009. Brominated dioxins (PBDD/Fs) and PBDEs in marine shellfish in the UK. Food Additives and Contaminants 26 (6), 918–927.
- J. Hagberg. 2009. Analysis of brominated dioxins and furans by high resolution gas chromatography/high resolution mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1216, 376–384.
- van den Berg M, Denison MS, Birnbaum LS, De Vito MJ, Fiedler H, Falandysz J, Rose M, Schrenk D, Safe S, Tohyama C, Tritscher A, Tysklind M, Peterson R (2013) Polybrominated Dibenzo-p-Dioxins, Dibenzofurans, and Biphenyls: Inclusion in the Toxicity Equivalency Factor Concept for Dioxin-Like Compounds, Toxicol. Sci 133(2), 197–208.
- R. Weber, B. Kuch. 2003. Relevance of BFRs and thermal conditions on the formation pathways of brominated and brominated–chlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans. Environment International, 29, 699–710.
- Zacs D., Rjabova J., Viksna A., Bartkevics V., Method development for the simultaneous determination of polybrominated, polychlorinated, mixed polybrominated/chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in fish, Chemosphere 118 (2015) 72–80

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Vi ringrazio per la pazienza che avete avuto nell’ascoltarmi