

# ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΕ ΛΙΠΑΡΕΣ ΦΑΣΕΙΣ

Δρ. Ιωάννης Ιεραπετρίτης, Δρ. Αλέξανδρος Λιούπης, Κατερίνα Βλάχου, Δρ. Ευγενία  
Λαμπή  
e-mail: [gxk-plastics@ath.forthnet.gr](mailto:gxk-plastics@ath.forthnet.gr)

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μια από τις χρήσεις των εστέρων του φθαλικού οξέος είναι ως πλαστικοποιητές σε πλαστικά από πολυβινυλοχλωρίδιο, πολλά από τα οποία χρησιμοποιούνται για επαφή με τρόφιμα, όπως μεμβράνες περιτύλιξης, πλαστικοί σωλήνες μεταφοράς κ.λ.π. Λόγω της υψηλής λιποδιαλυτότητας των ενώσεων αυτών παρατηρείται πολύ υψηλή μετανάστευση σε λιπαρά τρόφιμα.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού σε έλαια των δι-αιθυλοεξυλο-, διβούτυλο-, βενζυλοβουτυλο-, δι-ισοεννεανυλο- και δι-ισοοδεκυλο- φθαλικών εστέρων, με αέρια χρωματογραφία και ανιχνευτές FID και MSD με προηγούμενο διαχωρισμό τους από τη λιπαρή ύλη με χρωματογραφία πηκτής. Επιπλέον, αξιολογούνται τα ποιοτικά χαρακτηριστικά και η επίδοση της αναπτυχθείσας μεθόδου.

Επίσης, συγκρίνονται τεχνικές διαχωρισμού των ιδιαίτερα λιπόφιλων φθαλικών εστέρων από τη λιπαρή φάση με χρωματογραφία διαχωρισμού πηκτής και εκχύλιση στερεού – υγρού, καθώς και τεχνικές προσδιορισμού με αέρια και υγρή χρωματογραφία και διάφορους ανιχνευτές.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι φθαλικοί εστέρες αποτελούν την κύρια πηγή πλαστικοποιητών για το PVC, το οποίο με τη βοήθειά τους δίνει στα πολυμερή που κατασκευάζονται από αυτό, τις επιθυμητές ιδιότητες ελαστικότητας και αντοχής. Οι φθαλικοί εστέρες είναι εστέρες του 1,2 βενζοδικαρβοξυλικού οξέος με αλκοόλες οι οποίες περιέχουν γραμμικές οι διακλαδισμένες αλκυλικές αλυσίδες. Λόγω δε της ασθενούς πρόσδεσης των φθαλικών εστέρων στο πλέγμα του πολυμερούς πολυβινυλοχλωριδίου (δεσμοί Van Der Waals), παρατηρείται ταχύτατη διάχυσή τους στο πολυμερικό πλέγμα και μεταφορά τους με ισορροπία φάσεως από το πλαστικό στο περιβάλλον, είτε προς την ανθρώπινη τροφική αλυσίδα μέσω των υλικών PVC που έρχονται σε επαφή με τα λιπαρά τρόφιμα, είτε προς το έδαφος και την ατμόσφαιρα αποτελώντας ένα σημαντικό περιβαλλοντικό ρυπαντή.

Το πλαστικοποιημένο PVC χρησιμοποιείται για την περιτύλιξη τροφίμων (cling film ή stretch film), στα παρεμβύσματα που χρησιμοποιούνται για το σφράγισμα των πωμάτων των γυάλινων βάζων, αλλά και σε σωλήνες για τη μεταφορά υγρών τροφίμων όπως νερό και λάδι.

Οι κυριότεροι φθαλικοί εστέρες που χρησιμοποιούνται για την πλαστικοποίηση του πολυβινυλοχλωριδίου είναι οι ακόλουθοι: dibutyl phthalate(DBP), diisobutyl

phthalate(DIBP), benzylbutyl phthalate(BBP), diethylhexyl phthalate(DEHP), diisonyl phthalate (DiNP) και diisodecyl phthalate(DiDP). Οι τρεις τελευταίοι χρησιμοποιούνται και στις ισομερείς τους μορφές, δηλαδή το dioctyl phthalate (DOP) που είναι ισομερές του DEHP, ενώ τα DiNP και DiDP βρίσκονται πάντα ως μίγμα των διαφόρων ισομερών τους μορφών με ποικιλία αλκοολών. Οι φθαλικοί εστέρες αποτελούν εξαιρετικά λιπόφιλες χημικές ουσίες, με αποτέλεσμα να αποθηκεύονται σε αξιοσημείωτες ποσότητες σε λιπαρές φάσεις στη φύση (π.χ. λιπαρά τρόφιμα, έλαια, γάλα)

Όσον αφορά στις τοξικολογικές επιπτώσεις τους έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες έκθεσης κυρίως για τα DEHP/DOP και DBP. Η επιβάρυνση από τα μίγματα των DiNP, DiDP δεν έχει περιγραφεί επαρκώς. Σύμφωνα με τις γνωμοδοτήσεις της επιστημονικής επιτροπής της EFSA για τα υλικά σε επαφή με τρόφιμα οι ανεκτές ημερήσιες δόσεις (TDI) για τα DEHP/DOP και DBP, βάσει μελετών αναπαραγωγής σε ζώα, εκτιμούνται στα 0.05mg/kg bw και 0.01mg/kg bw αντίστοιχα. Επισημαίνεται, όμως, από την επιστημονική ομάδα ότι η ημερήσια έκθεση στα DEHP/DOP και DBP από την κατανάλωση φυσικών τροφίμων, λόγω περιβαλλοντικής επιβάρυνσης, βρίσκεται στα επίπεδα των παραπάνω TDI. Ως εκ τούτου, η απόφαση για θεσμοθέτηση ορίου μετανάστευσης των φθαλικών εστέρων από τα υλικά σ' επαφή με τρόφιμα αντιμετωπίζει τη δυσκολία εκτίμησης αντικειμενικής ημερήσιας έκθεσης και διασφάλισης της υγείας και ασφάλειας του καταναλωτή.

Από την άλλη πλευρά η παρουσία των φθαλικών εστέρων στο περιβάλλον, δημιουργεί προβλήματα σχετικά με την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων προσδιορισμού της ειδικής μετανάστευσης ειδικά όταν οι δοκιμές προσομοίωσης ή οι προσδιορισμοί πραγματοποιούνται σε τρόφιμα, δεδομένου ότι δεν μπορεί να προσδιορισθεί ποια ποσότητα φθαλικών εστέρων έχει προέλθει από το υλικό και ποια από φυσική επιμόλυνση. Το επίπεδο φυσικής επιμόλυνσης εξαρτάται όχι μόνο από τη λιποπεριεκτικότητα του τροφίμου αλλά και από τη γεωγραφική θέση καλλιέργειας ή εκτροφής. Ως εκ τούτου, είναι αρκετά δύσκολο να υπάρξουν αντικειμενικές μελέτες για το επίπεδο φυσικής επιμόλυνσης ανά κατηγορία τροφίμων. Για το λόγο αυτό επιλέγονται προσομοιωτές τροφίμων για την εξέταση της μετανάστευσης από τα πλαστικά. Επιπλέον, το περιβάλλον των εργαστηρίων που εκτελούν τους προσδιορισμούς είναι επιβαρυνμένο σε φθαλικούς εστέρες, με αποτέλεσμα να υπάρχουν σημαντικές αλληλεπιδράσεις με επίπτωση στην ορθότητα και επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

Ένα σημαντικό πρόβλημα που τέθηκε στο Εργαστήριο Υλικών και Αντικειμένων σ' Επαφή με Τρόφιμα του Γενικού Χημείου του κράτους, αφορούσε στην ύπαρξη φθαλικών εστέρων σε ελαιόλαδα. Το κυριότερο πρόβλημα που έπρεπε να αντιμετωπισθεί ήταν η απομόνωση των φθαλικών εστέρων από τη λιπαρή φάση, δεδομένης της υψηλής λιποφιλικότητας αυτών. Λόγω της μεγάλης χημικής συγγένειας των φθαλικών εστέρων με τις λιπαρές ύλες ο διαχωρισμός τους από αυτές είναι εξαιρετικά επίπονος και με μικρές ανακτήσεις. Ένα επιπλέον πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπισθεί είναι οι επιδράσεις από την επιμόλυνση των διαλυτών και από την ατμόσφαιρα ενός εργαστηρίου που ασχολείται γενικά με πλαστικοποιητές.

Αναπτύχθηκαν τεχνικές εκχύλισης και χρωματογραφικού προσδιορισμού με διάφορους ανιχνευτές και συγκρίθηκαν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά επίδοσης αυτών.

## 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κατά την πειραματική διεργασία συγκρίθηκαν τεχνικές εκχύλισης και διαχωρισμού από τη λιπαρή φάση με χρωματογραφία πηκτής και εκχύλισης υγρής στερεάς φάσης. Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν και συγκρίθηκαν τεχνικές προσδιορισμού με υγρή χρωματογραφία και ανιχνευτή απορρόφησης υπεριώδους, και αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτές ιονισμού φλόγας και φασματογραφίας μάζας.

Όσον αφορά στις τεχνικές διαχωρισμού δοκιμάστηκαν οι εξής διαφορετικοί τρόποι καθαρισμού:

A) Χρωματογραφία πηκτής (GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY), βασιζόμενη στην επιλεκτική κατακράτηση των μορίων ανάλογα με τον όγκο τους. Χρησιμοποιήθηκε στήλη 15mm x 500 mm, Υλικό πλήρωσης PS-3%DVB. Διαλύτης έκλουσης εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (80:20), Ροή: 0,4 ml/min. Συλλογή κλάσματος 32-140 ml. Οι ποσότητες του διαλύτη που εκλούν τους φθαλικούς εστέρες απομακρύνονται με συμπύκνωση σε περιστροφικό συμπυκνωτή υπό κενό.

B) Εκχύλιση στερεάς υγρής φάσης, βασιζόμενη στην έκλυση των φθαλικών εστέρων μέσω κατανομής μεταξύ υγρής φάσης από διαλύτη ακετονιτρίλιο και κατακράτηση των λιπαρών υλών στη στερεή φάση με μοριακές δυνάμεις. Χρησιμοποιήθηκαν στήλες C18 με διαφορετικές ποσότητες στερεάς φάσης. Περαιτέρω διαχωρισμός επιτυγχάνεται με ψύξη του διαλύματος μετά την έκλυση για μια νύχτα.

Όσον αφορά τις τεχνικές προσδιορισμού των εστέρων που διαχωρίστηκαν εφαρμόστηκαν:

A) Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης - HPLC-UV με Προστήλη: C18 αντίστροφης φάσης, Στήλη: C18 αντίστροφης φάσης 4,6x150 mm, 5μm, Κινητή Φάση: Ακετονιτρίλιο:H<sub>2</sub>O βαθμιδωτής έκλουσης και Ροή 2ml/min.

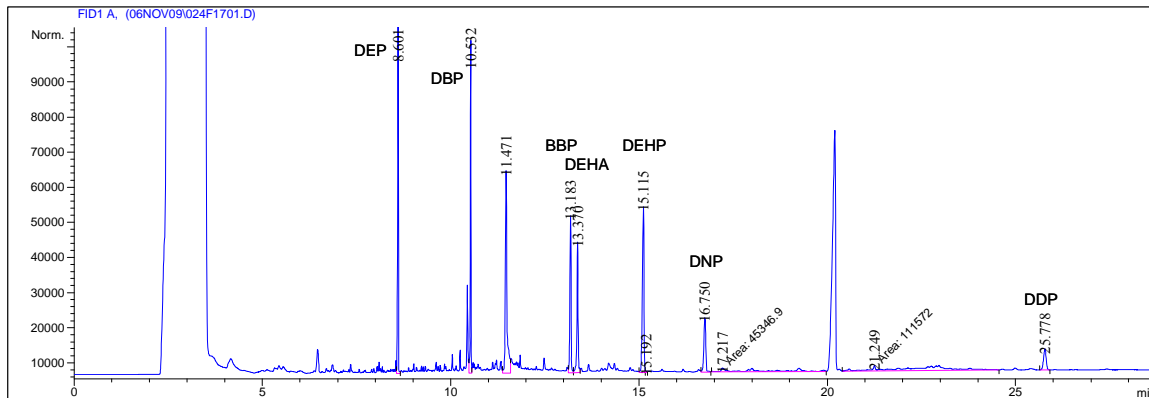
B) Αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας - GC-FID με στήλη τριχοειδή 25 cm x 0.53 mm i.d., επικαλυμμένη με 0.2 μm υμένιο Μεθυλοσιλοξάνιου PS-255.

Γ) Αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας - GC-MSD με τριχοειδή στήλη 25 cm x 0.53 mm i.d. επικαλυμμένη με 0.2 μm υμένιο μεθυλοσιλοξάνιου PS-255, και φασματογράφο μάζας σε SIM 149.1.

Οι δύο τεχνικές απομόνωσης των φθαλικών εστέρων συνδυάστηκαν με τις τεχνικές προσδιορισμού.

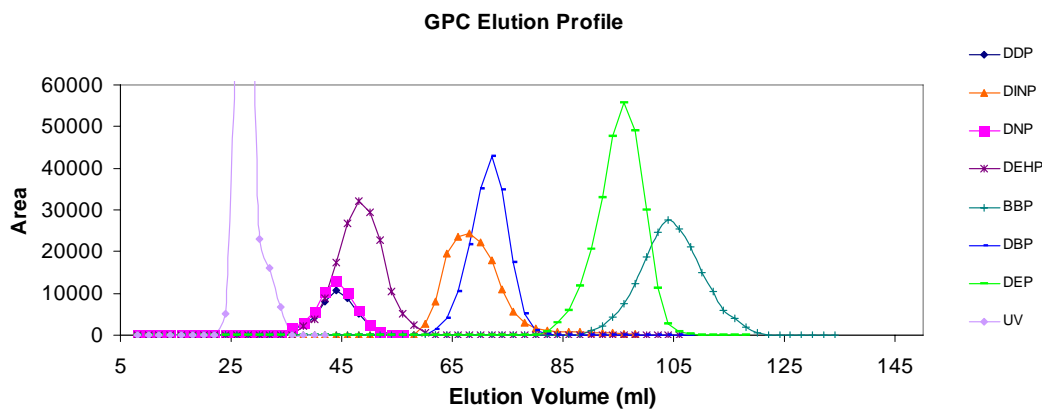
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην εικόνα 1 δίνεται το χρωματογράφημα των φθαλικών εστέρων όπως λαμβάνεται από αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας.



**Εικόνα 1.** Αέρια Χρωματογραφία GC-FID. Εμβολιασμός ελαιολάδου με μίγμα πλαστικοποιητών (20 ppm)

Στην εικόνα 2 δίνεται το προφίλ των φθαλικών εστέρων όπως χρονικά εκλύονται από τη στήλη πηκτής.



**Εικόνα 2.** Προφίλ των φθαλικών εστέρων όπως χρονικά εκλύονται από τη στήλη πηκτής.

Τα χαρακτηριστικά επίδοσης των ανωτέρω τεχνικών υπολογίσθηκαν και αφορούν για μεν τα ποσοτικά στην εκτίμηση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, της ανάκτησης, των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και την αβεβαιότητα, όσον δε τα ποιοτικά τις επιδράσεις από την παρουσία φθαλικών εστέρων στο περιβάλλον και τους διαλύτες και τη διάρκεια της ανάλυσης. Στον πίνακα 1 δίνονται οι ανακτήσεις που αντιστοιχούν στις τεχνικές απομόνωσης των φθαλικών εστέρων από τη λιπαρή φάση με χρωματογραφία πηκτής (GPC) και εκχύλιση στερεάς υγρής φάσης (SPE) με προσδιορισμό των φθαλικών εστέρων με HPLC-UV. Όσον αφορά στη δεύτερη τεχνική δίνονται τα αποτελέσματα για την καλύτερη ποσότητα στερεάς φάσης που αντιστοιχεί σε μάζα 1g.

**Πίνακας 1.** Ανάκτηση των τεχνικών απομόνωσης των φθαλικών εστέρων από λιπαρές φάσεις

| Τεχνική            | Αναλύτες<br>Συγκ.=5 mg/kg | Ανάκτηση<br>% |
|--------------------|---------------------------|---------------|
| GPC – HPLC -<br>UV | DBP                       | 40            |
|                    | BBP                       | 62            |
|                    | DEHP                      | 128           |
|                    | DINP                      | 68            |
| SPE – HPLC -<br>UV | DBP                       | 85            |
|                    | BBP                       | 96            |
|                    | DEHP                      | 102           |
|                    | DINP                      | 94            |

Στους πίνακες 2 και 3 δίνονται τα αποτελέσματα για τη συνολική διαδικασία προσδιορισμού φθαλικών εστέρων σε λιπαρές φάσεις στην επιλεγμένη τεχνική διαχωρισμού SPE.

**Πίνακας 2.** Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα, όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού και ανάκτηση των τεχνικών προσδιορισμού των φθαλικών εστέρων σε λιπαρές φάσεις με τεχνική SPE-GC-MSD.

| Τεχνική<br>SPE-GC-MSD | Ενδοεργαστηριακή<br>αναπαραγωγικότητα<br>%<br>Συγκ.=50 µg/Kg | LOD<br>µg/Kg | LOQ<br>µg/Kg | Ανάκτηση |
|-----------------------|--|--------------|--------------|----------|
| DBP                   | 22   | 17           | 50           | 74       |
| BBP                   | 28   | 17           | 50           | 72       |
| DEHP                  | 16   | 13           | 40           | 110      |
| DINP                  | *  | 17           | 50           | *        |

\*Η συνέκλιση με το σκουαλένιο δν επιτρέπει αξιόπιστη εκτίμηση για αυτό το επίπεδο συγκέντρωσης.

**Πίνακας 3.** Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα, όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού και ανάκτηση των τεχνικών προσδιορισμού των φθαλικών εστέρων σε λιπαρές φάσεις με τεχνική SPE-HPLC-UV.

| Τεχνική<br>SPE-HPLC-UV | Ενδοεργαστηριακή<br>αναπαραγωγικότητα<br>%<br>Συγκ.=200 µg/Kg | LOD<br>µg/Kg | LOQ<br>µg/Kg | Ανάκτηση<br>% |
|------------------------|---|--------------|--------------|---------------|
| DBP                    | 5   | 30           | 60           | 130           |
| BBP                    | 5   | 30           | 60           | 100           |
| DEHP                   | 15  | 15           | 45           | 95            |
| DINP                   | 25  | 100          | 300          | 140           |

Στη συνέχεια συγκρίνονται συνδυασμοί τεχνικών απομόνωσης και ποσοτικού προσδιορισμού, όπως χρωματογραφία πηκτής με προσδιορισμό με HPLC-UV (GPC-HPLC-UV), με αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GPC-GC-FID) και ανιχνευτή

φασματογραφίας μάζας (GPC-GC-MSD) και εκχύλισης στερεάς φάσης με HPLC-UV και GC-MSD (SPE-HPLC-UV) και (SPE-GC-MSD).

Ένα από τα προβλήματα που παρουσιάζονται στην τεχνική απομόνωσης GPC, που την αποκλείει από την εφαρμογή δεδομένου ότι δεν ικανοποιεί τις απαιτήσεις για αξιόπιστα αποτελέσματα, είναι η απαίτηση για πολύ μεγάλες ποσότητες διαλύτη για την έκλυση των φθαλικών εστέρων και ακόλουθη συμπίκνωση με συσκευή περιστροφικής συμπίκνωσης υπό κενό, και επομένως υπάρχει εξαιρετικά σημαντική επίδραση από την επιβάρυνση του ίδιου του διαλύτη σε φθαλικούς εστέρες. Επιπλέον, ο μεγάλος χρόνος για την έκλυση αυξάνει την απορρόφηση φθαλικών εστέρων από το περιβάλλον αλλά και η χρήση εξοπλισμού αυξάνει τις επιμολύνσεις.

Με την τεχνική απομόνωσης SPE απαιτείται εξαιρετικά μικρότερη ποσότητα διαλύτη και μικρότερος χρόνος για την έκλυση με αποτέλεσμα τη μικρότερη επιμόλυνση από φθαλικούς προερχόμενους από τους διαλύτες και το περιβάλλον. Σε κάθε περίπτωση, ακόμη και με την τεχνική SPE δεν μπορεί να αποφευχθεί επιμόλυνση σε φθαλικούς, για τα επίπεδα του εργαστηρίου, η οποία αγγίζει τα 10-15  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  ανάλογα με τον εστέρα. Η ανάκτηση με την τεχνική SPE αντιστοιχεί σε καλύτερα επίπεδα σε σχέση με τη GPC.

Όσον αφορά στον προσδιορισμό για αναλύσεις δειγμάτων με υπολογίσιμη ποσότητα φθαλικών εστέρων, εικόνα που παρουσιάζουν αυτή τη στιγμή τα ελληνικά ελαιόλαδα, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού της HPLC-UV θεωρούνται ικανοποιητικά και προτιμητέα για αναλύσεις ρουτίνας, δεδομένου ότι πλήρης διαχωρισμός των φθαλικών εστέρων από τη λιπαρή φάση δεν μπορεί να επιτευχθεί, με αποτέλεσμα την επιμόλυνση με λιπαρά και άλλα συστατικά των ελαίων τόσο των στηλών όσο και των ανιχνευτών, με επίπτωση στην ακρίβεια και τα όρια ανίχνευσης του ανιχνευτή MSD.

Η τεχνική προσδιορισμού με GC-FID παρουσιάζει επαναληψιμότητες και όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού υψηλότερα από τις άλλες δύο τεχνικές, οπότε και δεν προτείνεται ως μέθοδος προσδιορισμού.

Η τεχνική προσδιορισμού GC-MSD θεωρείται η καλύτερη για χαμηλές συγκεντρώσεις φθαλικών εστέρων σε λιπαρές φάσεις μικρότερες ή ίσες των 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  ελαίου ή λιπαρής φάσης, δεδομένων των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού που αντιστοιχούν σε όλους τους φθαλικούς εστέρες. Το σημείο το οποίο χρήζει προσοχής είναι η συνέκλυση της ομάδας των εστέρων του DINP με το σκουαλένιο που προέρχεται από το λάδι, οπότε απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή σε χαμηλές συγκεντρώσεις DINP.

#### **4. ΕΠΙΛΟΓΟΣ**

Για τον προσδιορισμό φθαλικών εστέρων σε λιπαρά υποστρώματα, κυρίως έλαια, εξετάστηκαν δύο τεχνικές απομόνωσης αυτών από τη λιπαρή φάση σε συνδυασμό με τεχνικές προσδιορισμού. Από τη μελέτη προκύπτει ότι η τεχνική SPE-HPLC-UV θεωρείται ικανοποιητική για τον προσδιορισμό φθαλικών εστέρων σε έλαια σε επίπεδα συγκέντρωσης μεγαλύτερα από 200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Ενώ για χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης ως καλύτερη τεχνική προτείνεται η SPE-HPLC-MSD. Θέματα που χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής είναι η

επιμόλυνση των διαλυτών και οι περιβαλλοντικές επιμολύνσεις, τόσο από την ατμόσφαιρα του εργαστηρίου, όσο και από τον χρησιμοποιούμενο εξοπλισμό. Επίσης, ζητήματα συνέκλουσης πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Η απαίτηση για εργαστήριο υψηλών προδιαγραφών όσον αφορά στην καθαρότητα και πιθανές λύσεις με χρήση τεχνικών ιστοτοπικής αραίωσης, φαίνεται ότι θα επιλύσουν τις δυσκολίες σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης.

## **5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.**

1. L. Castle, A. Mayo and J. Gilbert, Food Additives and Contaminants, 1989, 6, No 4, 437-773.
2. Biederman-Brem S. Biedermann M. Fiselier K. and Grob K., Food Additives and Contaminants, 2005, 22, No 12, 1274-1284.
3. Fankhauser-Noti A. and Grob K., European Food Research & Technology, 2005, 221, 416-422.
4. J. Startin. I. Parker. M. Gilbert, Journal of Chromatography, 1987, 367, 509-514.
5. Anderson W.A.C., Castle L., Scotter M.J., Massey R.C., Springall C., Food Additives and Contaminants, 2001, 18, No 12, 1068-1074
6. H.Koch, L.M.Gonzalez-Reche, Jurgen Angerer, Journal of Chromatography, 2003, 784, 169-182.
7. A. Fankhauser-Noti, Grob K., Analytical Chimica Acta, 2007, 582, 353-360
8. Lentza-Rizos, Avramides E.J. Cherasco F., Journal of Chromatography, 2001, 912, 135-142.
9. H.Koch, B.Rossbach, Drexler H., Angerer J., Environmental Research, 2003, 93, 177-185.
10. The EFSA Journal (2005) 243, 1-20
11. The EFSA Journal (2005) 242, 1-17