

JERZY FALANDYSZ

POZOSTAŁOŚCI *TRIS*(4-CHLOROFENYLO)METANU
I *TRIS*(4-CHLOROFENYLO)METANOLU W RYBACH Z ZATOKI
GDAŃSKIEJ*

RESIDUES OF *TRIS*(4-CHLOROPHENYL)METHANE AND
TRIS(4-CHLOROPHENYL)METHANOL IN FISH FROM THE GULF OF GDAŃSK

Zakład Chemii Środowiska i Ekotoksykologii,
Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
80-952 Gdańsk, ul. J. Sobieskiego 18
E-mail: jfalandy@chemik.chem.univ.gda.pl
Kierownik: prof. dr hab. J. Falandysz

Stosując niedestrukcyjną metodę ekstrakcji i oczyszczania próbki z dializą ekstraktu przez półprzepuszczalną membranę polietylenową, rozdział na 60 m kolumnie kapilarnej (HRGC) oraz detekcję i identyfikację techniką niskorozdzielczej spektrometrii mas (LRMS) oznaczono pozostałości TCTM-H i TCPM-OH w dziesięciu jadalnych gatunkach ryb z Zatoki Gdańskiej. Pozostałości TCPM-H zidentyfikowano we wszystkich zbadanych rybach, a TCPM-OH nie wykryto tylko w śledziach. U siedmiu gatunków ryb, poza tobiaszem, dobijakiem i węgorzycą, TCPM-H występował w większym stężeniu niż jego przypuszczalny metabolit – TCPM-OH.

WSTĘP

Tris(4-chlorofenylo)metanol (TCPM-OH lub 4,4',4''-TCPM-OH) jest ksenobiotykiem, który zidentyfikowano w przyrodzie w 1989 r. [10]. *Tris*(4-chlorofenylo)metan (TCPM-H lub 4,4',4''-TCPM-H) budową strukturalną przypomina znany insektycyd DDT czyli 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(4-chlorofenylo)etan, a TCPM-OH insektycyd dicofol (Kelthane) czyli 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(4-chlorofenylo)etanol. Walker i wsp. [10] badając skład archiwalnych próbek preparatów technicznych DDT i dicofolu nie wykazali aby zawierały one domieszkę TCPM-OH w stężeniu większym niż 0,2% (TCPM-H nie zidentyfikowano). Zatem, w pierwszych publikacjach o występowaniu TCPM-H/OH w matrycach środowiskowych zasugerowano, że źródłem zanieczyszczenia przyrody tymi substancjami mogą być sztuczne włókna – polimer *tris*(4-chlorofenylo)metakrylowy lub barwniki do włókien akrylowych [4, 10]. Buser [1], krytycznie oceniając możliwości

* badania w części finansowane przez Statens Naturvardsverk (Sztokholm), Uniwersytet w Umeå i Komitet Badań Naukowych.

o rozmiar stosowania TCPM-H i TCPM-OH w praktyce, zasugerował, że jest mało prawdopodobne aby znane od niedawna optycznie aktywne włókna syntetyczne czy barwniki do włókien akrylowych miały związek z wieloletnią już obecnością TCPM-OH w środowisku.

W skład DDT technicznego wchodzi głównie 4,4'-DDT (około 79%) i 2,4'-DDT (16–18%), a w małej części także substancje o niezidentyfikowanej budowie [1]. Cytowany autor [1] wykazał, że dwie próbki preparatu technicznego DDT wyprodukowanego w latach 1950-tych zawierały TCPM-H. TCPM-H powstaje w małej ilości jako produkt reakcji chloralu, chlorobenzenu i oleum – syntezy prowadzonej w takich samych warunkach w jakich odbywa się przemysłowa produkcja DDT (kondensacja Bayera). Z kolei produktem reakcji DDT z bezwodnym AlCl_3 w chlorobenzenu jest 10 izomerów TCPM-H, a mianowicie: 2,2',2''-, 2,2',3''-, 2,2',4''-, 2,3',3''-, 2,3',4''-, 3,3',3''-, 2,4',4''-, 3,3',4''-, 3,4',4''-i 4,4',4''-TCPM-H [1].

TCPM-OH jest przypuszczalnie metabolitem TCPM-H, a reakcję hydroksylacji miały by katalizować oksygenazy. Jakkolwiek nie jest wykluczone, że TCPM-H jest także i na innej drodze przekształcany w środowisku w TCPM-OH [1, 4, 11].

W latach 1970-tych wykazano, że TCPM-OH uniemożliwia linienie owadów zaburzając ich rozwój [5]. Z kolei w przypadku gryzoni TCPM-OH spożywany (100 mg/kg paszy) w ciągu 28 dni przez szczury wywołuje przerost masy wątroby i śledziony u obu płci tych zwierząt [6].

TCPM-H i TCPM-OH to substancje lipofilowe i względnie odporne na wpływy degradacyjne czynników środowiskowych, a ich zachowanie się i los w przyrodzie przypomina historię pestycydów chloroorganicznych czy polichlorowanych bifenyli (PCB) [2, 3].

Obecność TCPM-OH stwierdzono w zarchiwizowanej próbce podskórnej tkanki tłuszczowej belugi (*Delphinapterus leucas*) z rzeki Św. Wawrzyńca z 1952 r. [4], a ostatnio także w mleku kobiecym we Włoszech (1992 r.; 2,2–3,4 ng/g masy lipidów) i w Szwecji (1992 r.; 1,9–2,7 ng/g m.l.) [7]. TCPM-H również zidentyfikowano w mleku kobiecym w Szwecji (1992 r.; 1,6 ng/g m.l.) [7]. Spośród produktów żywnościowych TCPM-H i TCPM-OH wykryto w oleju z makreli i tranie leczniczym otrzymanym z wątrób dorszowych – oba gatunki ryb pochodziły z Morza Północnego, a nie wykryto pozostałości obu tych substancji w rybach (bonito – tuńczyk, włócznik, okoń, węgorz, żabnica – nawę i barwena) oraz ośmiornicy pochodzących z Morza Śródziemnego, a dostępnych na rynku we Włoszech [7].

Celem badań było określenie stopnia zanieczyszczenia TCPM-H i TCPM-OH jadalnych gatunków ryb z Zatoki Gdańskiej.

MATERIAŁ I METODYKA

Ryby do badań złowiono w sieci stawne lub żaki w Zatoce Gdańskiej w pobliżu Gdańska i Gdyni w 1992 r. Tok postępowania analitycznego obejmujący homogenizację i ekstrakcję próbek oraz oczyszczanie ekstraktu na drodze dializy przez półprzepuszczalną membranę polietylenową dokładnie opisano w innej pracy [9]. Przed ekstrakcją (otwarta kolumna szklana długości 1,0–1,5 m i o średnicy wewnętrznej 4 cm), na szczyt upakowanej w kolumnie próbki – mieszaniny odwodnionej i zhomogenizowanej z bezwodnym siarczanem sodowym, dozowano wzorzec wewnętrzny nr 1, zawierający 500 ng znakowanego izotopowo ($^{13}\text{C}_{12}$) p,p'-DDT. Wstępnie oczyszczony dializat (zawierający jeszcze od 0,9 do 8,1 % lipidów oryginalnie obecnych

w próbce), doczyszczano i frakcjonowano na złożu wypełnionym żelom Florisil (Merck, Darmstadt, Niemcy) przemytym dwukrotnie, kolejno metanolem i chlorkiem metylenu. U wylotu kolumny, zaopatrzonej w kurek teflonowy, pakowano zwitek waty szklanej, następnie żel Florisil, a na szczycie bezwodny siarczan sodowy, kolejno wysuszony w 530°C przez 2 godz., i prażony w 550°C przez 50 godz. Tak przygotowany bezwodny siarczan sodowy do czasu analizy przechowywano zamknięty w słoju szklanym w suszarce elektrycznej w temperaturze 120°C. Kurek teflonowy, przed zamontowaniem w kolumnie, moczono w zlewce z chlorkiem metylenu przez 5–10 godz. Kolumna szklana miała długość całkowitą 35 cm – dolna część kolumny miała długość 25 cm i średnicę 1 cm, a górna 10 cm i średnicę 3 cm. Przed wprowadzeniem ekstraktu do kolumny, w celu zmoczenia żelu, złożo zalewano *n*-heksanem do poziomu powyżej warstwy bezwodnego siarczanu sodowego. Ewentualny nadmiar rozpuszczalnika odprowadzano kurkiem, pozostawiając cienką warstwę nad siarczanem. Ekstrakt dozowano do kolumny pipetą *Pasteura* (jednorazowego użytku), zużywając czterokrotnie po 1 ml *n*-heksanu. Analit wymywano z kolumny w czterech frakcjach stosując szereg rozpuszczalników o wzrastającej polarności. Frakcję pierwszą wymywano 28 ml *n*-heksanu (łącznie 4 + 28 ml), frakcję drugą 38 ml mieszaniny chlorku metylenu z *n*-heksanem (15:85; v/v), frakcję trzecią 56 ml mieszaniny chlorku metylenu z *n*-heksanem (50:50; v/v), a frakcję czwartą 66 ml metanolu. Frakcję pierwszą i drugą łączyło. TCPM-H jest wymywany ze złoża z żelom Florisil we frakcji drugiej, a TCPM-OH w trzeciej [11]. Wyciek z kolumny zbierano do fiolek szklanych (poj. 100 ml), do których wcześniej dodano tetradekan (30 μl). Tetradekan spełnia rolę tzw. trzymacza – substancja ta uniemożliwia ucieczkę do atmosfery oznaczanych związków chloroorganicznych, które są mniej lub bardziej lotne, w tych etapach toku postępowania analitycznego, które są związane z odparowywaniem rozpuszczalnika do sucha, nawet kiedy jest to proces prowadzony w temperaturze pokojowej. Wszystkie frakcje wycieku z kolumny z żelom Florisil pozostawiano w temperaturze pokojowej w celu swobodnego odparowania rozpuszczalników do objętości kilku ml. Kolejno, ekstrakty przenoszono ilościowo do fiolek o poj. 10,5 ml i tak pozostawiano do swobodnego, całkowitego odparowania rozpuszczalników. Następnie ekstrakty przenoszono do specjalnych fiolek (autofiolki), które umieszczano w karuzeli zautomatyzowanego dozownika (autosampler) układu GC/MS. Bezpośrednio przed przeniesieniem podwielokrotności ekstraktu do autofiolki dozowano do niej wzorzec wewnętrzny nr 2, zawierający 100 ng znakowanego izotopowo (¹³C₁₂) 2,2',4,5,5'-pentachlorobifenylu (PCB nr 101).

Analizę TCPM-H i TCPM-OH prowadzono techniką kapilarną chromatografię gazową (chromatograf Hewlett-Packard 5890; kolumna Supleco PTE-5 – o długości 60 m i o średnicy wewnętrznej 0,32 mm; Bellefonte, PA, USA; zautomatyzowany dozownik próbek model Hewlett-Packard 7676A), w połączeniu z niskorozdzielczą spektrometrią mas z jonizacją wiązką elektronów i selektywną rejestracją jonów (SIR) (spektrometr masowy VG Analytical 11–250; Altricham, Anglia). Kolumnę chromatografu utrzymywano w temperaturze osiągnięcia 205°C, i kolejno dalej podwyższano z prędkością 2 C/min. – aż do osiągnięcia 300°C. Separator pomiędzy chromatografem i spektrometrem mas utrzymywano w temperaturze 270°C, a źródło jonów w 250°C. Wzorcem obliczeniowym była mieszanina zawierająca te same ilości znakowanych izotopowo (¹³C₁₂) p,p'-DDT i PCB nr 101 (w autofiolce ale bez ekstraktu) jak dodano do próbki, a także naturalne (¹²C₁₂) wzorce TCPM-H i TCPM-OH [8]. Dodatek znakowanych izotopowo (¹³C₁₂) wzorców p,p'-DDT i PCB nr 101 (tzw. Wzorzec wielkości odzysku) do próbki na początku (p,p'-DDT) i końcu (PCB nr 101) toku postępowania analitycznego raz użycie tych samych substancji w tzw. Wzorcze obliczeniowym (autofiolka bez ekstraktu – p,p'-DDT i PCB nr 101 obecne w takim samym stosunku mas jak dodano do próbki), pozwala na dokładną kontrolę wielkości odzysku oznaczanych związków w każdej badanej próbce, a zatem na skorygowanie wyników oznaczeń TCPM-H/OH do wielkości 100% odzysku. Wzorców izotopowych (¹³C₁₂) TCPM-H i TCPM-OH jak dotąd jeszcze nie zsyntetyzowano i nie są one dostępne komercyjnie.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Autorzy cytowanej już wcześniej pracy [7] wykazali obecność TCPM-H/OH w oleju z makreli (odpowiednio 0,6 i 35 ng/g) i tranie leczniczym (2,9 i 51 ng/g), a przede wszystkim w tkankach i płynach ustrojowych organizmów stanowiących końcowe ogniwa w łańcuchach zależności troficznych – człowiek, ssaki morskie, ptaki morskie i drapieżne – dane tylko dla TCPM-OH [4, 7, 10, 11].

Tabela 1. Zawartość *tris*(4-chlorogenylo)metanu (TCPM-H) i *tris*(4-chlorofenylo)metanolu (TCPM-OH) w rybach z Zatoki Gdańskiej (ng/g masy mokrej i ng/g masy lipidów)
Tris(4-chlorophenyl)methane (TCPM-H) and *tris*(4-chlorophenyl)methanol (TCPM-OH) in fish from the Gulf of Gdańsk (ng/g wet weight and ng/g lipid weight)

Gatunek	n	TCPM-H	TCPM-OH	TCPM-H	TCPM-OH
		ng/g m.m.		ng/g m.l.	
Tobiasz	1 (20)*	0,1	0,2	2,3	3,6
Dobijak	1 (20)	0,08	0,16	1,4	2,7
Śledź	1 (3)	0,3	NS	3,7	NS
Minog	2 (6)	0,9 (0,25–1,5)	0,2 (0,07–0,4)	5,4 (4,0–6,8)	1,4 (1,2–1,7)
Sandacz	1 (3)	0,8	0,4	19	8,2
Węgorzyca	1 (3)	0,2	0,3	5,5	8,4
Babka obła	1 (3)	0,7	0,1	14	2,2
Dorsz	1 (3)	0,4	0,1	13	3,2
Stornia (flądra)	3 (15)	0,8 (0,5–1,2)	0,2 (0,1–0,4)	17 (11–24)	4,5 (2,8–7,3)
Okoń	2 (8)	1,1 (0,4–1,6)	0,3 (0,2–0,4)	0,3 (9,2–30)	4,9 (2,7–7,1)

* Liczba próbek zbiorczych i liczba ryb w próbce (w nawiasie)

NS = nie stwierdzono (< 0,02 ng/g m.m.)

W badaniach własnych po raz pierwszy wykazano obecność TCPM-H i TCPM-OH w rybach bałtyckich (tabela 1). TCPM-H/OH łącznie wykryto w rybach z Zatoki Gdańskiej w stężeniu do 40 ng/g masy mokrej. Zbadane ryby zawierały TCPM-H/OH w stężeniu o trzy rzędy wielkości mniejszym aniżeli pozostałości DDT (p,p'-DDT, o,p'-DDT, p,p'-DDD, o,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDE i p,p'-DDMU) (dane własne nieopublikowane). TCPM-H na ogół wykrywano w rybach z Zatoki Gdańskiej w większym stężeniu niż TCPM-OH, a wyjątkiem były jedynie tobiasz, dobijak i węgorzyca, które zawierały niemal dwukrotnie więcej TCPM-OH niż TCPM-H. Planktonożerne gatunki ryb, takie jak tobiasz, dobijak (strefa szelfu przybrzeżnego) i śledź (strefa pelagiczna), a także minog (gatunek pasożytniczy), pozostawały mniej zanieczyszczone TCPM-H/OH w porównaniu z rybami prowadzącymi przydenny tryb życia (węgorzyca, babka obła, dorsz i stornia) czy drapieżnymi (sandacz i okoń). Fakt obecności TCPM-H i TCPM-OH w rybach z Zatoki Gdańskiej potwierdza przynależność tych związków do grupy trwałych zanieczyszczeń halogenoorganicznych w środowisku naturalnym.

W Polsce przez wiele lat i w dużych ilościach stosowano insektycyd DDT – przypuszczalnie główne źródło TCPM-H/OH w Zatoce Gdańskiej (ryby z tego akwenu pozostają obecnie silniej zanieczyszczone pozostałościami DDT w porównaniu do tych samych gatunków ryb z innych miejsc w Morzu Bałtyckim). Brak jest bardzo wielu danych o toksyczności TCPM-H i TCPM-OH, a ryzyko występowania pozostałości tych substancji w żywności pozostaje nieznanne.

J. Falandysz

RESIDUES OF *TRIS*(4-CHLOROPHENYL)METHANE AND *TRIS*(4-CHLOROPHENYL)METHANOL IN FISH FROM THE GULF OF GDAŃSK

Summary

Tris(4-chlorophenyl)methane (TCPM-H) and *tris*(4-chlorophenyl)methanol (TCPM-Oh) were identified and quantified in fish caught in the Gulf of Gdańsk, Baltic Sea. The method of measurement was capillary gas chromatography and low resolution mass spectrometry (HRGC/LRMS) after a nondestructive extraction and clean-up of the samples using a wide-bore glass tubes and dialysis with a semipermeable polyethylene membrane and further fractionations of the extract on Florisil column. TCPM-H and TCPM-OH were detected in fish in concentration from 0.08 to 1.6 and from < 0.02 to 0.4 ng/g wet weight, respectively.

PIŚMIENNICTWO

1. Buser H-R.: DDT, a potential source of environmental *tris*(4-chlorophenyl)methane and *tris*(4-chlorophenyl)methanol. Environ. Sci. Technol. 1995, 29, 2133.
2. Falandysz J.: *Tris*(chlorofenylo) metan i *tris*(4-chlorofenylo)metanol – zanieczyszczenia środowiska i żywności. Bromat. Chem. Toksykol. 1994, 27, 311.
3. Falandysz J.: Polichlorowane bifenyle (PCBs) w środowisku: chemia, analiza, toksyczność, stężenia i ocena ryzyka. Państwowa Inspekcja Ochrony Środowiska, Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa, 1998, w druku.
4. Jarman W.M., Simon M., Norstrom R.J., Burns S.A., Bacon C.A., Simonet B.R.T., Risebrough R.W.: Global distribution of *tris*(4-chlorophenyl)methanol in high trophic level birds and mammals. Environ. Sci. Technol. 1992, 26, 1770.
5. Lukovits I., Tóth B., Varjas L., Matolcsy G.: Quantitative relationship between structure and anti-ecdysone activity of triarimol analogues. Acta Phytopath. Acad. Scien. Hung. 1978, 13, 227.
6. Poon R., Lecavalier P., Bergman A., Yagminas A., Chu I., Valli V.E.: Effects of *tris*(4-chlorophenyl)-methanol and -methane in human milk. Chemosphere, 1993, 27, 1487.
7. Rahman M.S., Montanarella L., Johansson B., Larsen B.R.: Trace levels of *tris*(4-chlorophenyl)-methanol and -methane in human milk. Chemosphere, 1993, 27, 1487.
8. Strandberg L.: Stężenia, skład, rozmieszczenie przestrzenne i zachowanie się cyklodienów w łańcuchu zależności troficznych w części południowej morza Bałtyckiego. Rozprawa doktorska. Uniwersytet Gdański, 1996.
9. Strandberg B., Bergqvist P-A., Rappe C.: Dialysis with semipermeable membranes as an efficient lipid removal method in the analysis of bioaccumulative chemicals. Anal. Chem. 1998, w druku.
10. Walker W., Risebrough R.W., Jarman W.M., de Lappe B.W., Tefft J.A., De Long R.L.: Identification of *tris*(chlorophenyl)methanol in blubber of harbor seals from Puget Sound. Chemosphere 1989, 18, 1799.

11. Zook D.R., Buser H-R., Bergqvist P-A., Rappe C., Olsson M.: Detection of tris(chlorophenyl) methane and tris(4-chlorophenyl) methanol in ringed seal (*Phoca hispida*) from the Baltic Sea. *Ambio*, 1992, 21, 557.

Otrzymano: 1998.02.10