

*Dorota Skrajnowska, Ewelina Strzelczyk,  
Anna Kotlińska, Andrzej Tokarz*

## POZOSTAŁOŚCI DDT I METABOLITÓW W MLEKU KOBIECYM

Katedra i Zakład Bromatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.  
Kierownik: prof. nadzw. dr hab. *A. Tokarz*

*Celem pracy było oznaczenie pozostałości DDT i jego metabolitów (op' DDT, pp' DDT, op' DDE, pp' DDE, pp' DDD) w 56 próbkach mleka kobiecego. Pesticydy oznaczano jakościowo i ilościowo po ekstrakcji ciecz-ciecz metodą chromatografii gazowej z detektorem wychwyty elektronów (GC ECD). Tożsamość próbek potwierdzono metodą chromatografii gazowej z detektorem masowym (GC MS). W 52 próbkach stwierdzono pozostałość pp' DDE i w 4 próbkach pp' DDT. Oznaczone zawartości wahały się w granicach 0,0007–0,0242 mg/l (średnio – 0,004878 mg/l). W pięciu próbkach przekroczony został najwyższy dopuszczalny poziom pozostałości chemicznych środków ochrony roślin, jaki ustalono dla środków spożywczych przeznaczonych dla niemowląt – 0,01 mg/kg produktu.*

Hasła kluczowe: mleko kobiece, pestycydy chloroorganiczne – DDT.  
Keywords: human milk, organochlorine pesticides – DDT.

Polichlorowane węglowodory aromatyczne ze względu na dużą trwałość w środowisku określane są jako POPs (persistent organic pollutants) a ze względu na rodzaj działania jako „ksenohormony” (1). Wśród nich poważny udział mają pestycydy chloroorganiczne, które w latach 1950–1960 były stosowane w rolnictwie, weterynarii i medycynie. Najczęściej używanym i najtrwałszym był DDT (1,1,1-tri-chloro-2,2-bis[4chlorofenylo]-etan). Pierwsze dane o występowaniu DDT w mleku kobiecym znane są od 1951 roku (2, 3). W okresie laktacji gruczoły mlekowe wykazują zdolność wydzielania krążących we krwi węglowodórów chlorowanych i ich metabolitów do mleka (4, 5). W ten sposób związki te mogą trafić do organizmu człowieka z żywnością już od chwili przyjęcia pierwszego pokarmu po urodzeniu. Biorąc pod uwagę, że podstawowym pożywieniem noworodka jest mleko matki, a ilość pożywienia na jednostkę masy ciała jest w tym przypadku znacznie większa niż u dorosłego, okazuje się, że noworodek jest narażony na wchłonięcie znacznych ilości węglowodórów chlorowanych. Znając powinowactwo tej grupy związków do tłuszczów należy przypuszczać, że duża część może ulec odłożeniu w tkance mózgowej, która w tym okresie życia jest bardzo wrażliwa na działanie substancji toksycznych (3). W niniejszej pracy oznaczono pozostałości DDT i metabolitów w mleku kobiet zamieszkujących województwo mazowieckie.

## MATERIAŁY I METODY

Materiał do badań stanowiło 56 próbek mleka kobiecego pochodzącego z okresu do 8 miesiąca laktacji. Analizowane próbki w 52% pochodziły z okresu do 7 dnia od porodu, 30% do 1 miesiąca, 18% od 3 do 8 miesięcy po porodzie. Do czasu wykonania analizy pozostałości DDT i metabolitów w mleku, próbki przechowywano w polipropylenowych pojemnikach w temperaturze głębokiego zamrożenia ( $-80^{\circ}\text{C}$ ). Poziom DDT i metabolitów oznaczono w oparciu o Polską Normę (6) oraz metodę opracowaną przez PZH w Warszawie (7).

### Aparatura

– Chromatograf gazowy HP6890 z detektorem ECD, oprogramowanie Chem Station. Warunki rozdziału chromatograficznego: gaz nośny: hel; przepływ przez kolumnę: 2 ml/min. Detektor ECD: Temperatura –  $300^{\circ}\text{C}$ , makeup gaz – azot, przepływ 60 ml/min. Dozownik: Temperatura –  $250^{\circ}\text{C}$ , splitless – 0,75 min, podział strumienia – 1:30. Kolumna chromatograficzna: DB 5 MS. Program temperaturowy pieca chromatograficznego: temp. początkowa  $70^{\circ}\text{C}$  (1 min), wzrost do  $150^{\circ}\text{C}$  ( $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ),  $150^{\circ}\text{C}$  (0 min), wzrost do  $270^{\circ}\text{C}$  ( $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ),  $270^{\circ}\text{C}$  (10 min).

– Chromatograf gazowy Varian 3800 z detektorem masowym Saturn 2000, oprogramowanie komputerowe Saturn GC MS Workstation. Dozownik 1079, autosampler, analizator: pułapka jonowa. Kolumna chromatograficzna: DB 5 MS. Transfer line:  $280^{\circ}\text{C}$ . Temperatury stref grzania detektora masowego: TRAP –  $210^{\circ}\text{C}$ , Manifold –  $-50^{\circ}\text{C}$ . Typ jonizacji: elektronowa EI AGC, prąd żarzenia filamentów, prąd emisji elektronów: 20 uA. Zakres analizowanych mas: 50–480 m/z; maksymalny czas jonizacji: 25000 us; tło: 45 m/z; Całkowity prąd jonowy: 20000 counts. Program temperaturowy pieca chromatograficznego: temp. początkowa  $50^{\circ}\text{C}$  (2 min), wzrost do  $150^{\circ}\text{C}$  ( $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ),  $150^{\circ}\text{C}$  (0 min), wzrost do  $270^{\circ}\text{C}$  ( $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ),  $270^{\circ}\text{C}$  (15 min).

### Ekstrakcja pestycydów chloroorganicznych

10 ml badanej próbki umieszczano w zlewce z watą szklaną wraz z 20 ml acetonu i przesączano do rozdzielacza. Zlewkę i watę płukano dwa razy acetonem po 5 ml i dwa razy heksanem po 10 ml. W rozdzielaczu umieszczano następnie 60 ml wody destylowanej i 3 ml nasyconego roztworu chlorku sodu. Wytrząsano 5 min, po czym warstwę organiczną przeniesiono do suchego rozdzielacza, dodano 5 ml stężonego kwasu siarkowego, delikatnie wymieszano i pozostawiono na 5 min. Następnie warstwa kwasu została spuszczone do zlewki z wodą. Dalsze oczyszczanie kwasem siarkowym było prowadzone do momentu uzyskania bezbarwnej warstwy kwasu. Warstwę organiczną przesączono przez lejek z watą szklaną i bezwodnym siarczanem sodu do kolby wyparkowej. Próbkę odparowywano do objętości ok. 2 ml używając rotacyjnej wyparki próżniowej, następnie badany ekstrakt odparowywano do sucha za pomocą strumienia azotu. Suchą pozostałość rozpuszczano w 2 ml heksanu i ponownie odparowywano do sucha używając strumienia azotu. Do pozostałości dodawano 1,5 ml mireksu (wzorzec wewnętrzny) i próbkę przenoszono do naczynka do izolowania techniką „headspace”. Tak przygotowany ekstrakt heksanowy był używany do analizy metodą GC ECD i GC MS.

Analiza jakościowa pestycydów przeprowadzana była na podstawie porównania czasów retencji metabolitów DDT w mieszaninach wzorcowych i próbkach badanych. Mieszaniny wzorcowe stanowiły: metabolity DDT o stężeniu 0,1 ppm (op' DDT, pp' DDT, op' DDE, pp' DDE, pp' DDD) i mireks o stężeniu 0,25 ppm. Analiza ilościowa była prowadzona metodą dodatku wzorca wewnętrznego, w oparciu o stosunek pola powierzchni wzorca badanego pestycydu do pola powierzchni wzorca wewnętrznego w mieszaninie wzorcowej i badanej próbce.

#### Określenie odzysku dla pestycydów chloroorganicznych

Odzysk badano wzbogacając pięć próbek mleka kobiecego 0,1 ppm roztworem zawierającym pp' DDE, pp' DDD, pp' DDT. Średni odzysk dla próbek mleka wynosił dla pp' DDE 75% dla pp' DDT 79%.

### WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Pomimo, że stosowanie insektycydów chloroorganicznych zostało zabronione bądź ograniczone w większości krajów świata przeszło 30 lat temu, ich pozostałości są wciąż wykrywane w mleku kobiecym we wszystkich rejonach globu (8, 9).

W wyniku analizy 56 próbek mleka kobiecego, stwierdzono w 52 próbkach pozostałość pp' DDE i w 4 próbkach pp' DDT (tab. 1). Oznaczone zawartości DDT wahały się w granicach 0,0007 – 0,0242 mg/kg (średnio pp' DDE + pp' DDT – 0,004878 mg/kg). W pięciu próbkach przekroczony został najwyższy dopuszczalny poziom pozostałości chemicznych środków ochrony roślin, jaki ustalono dla środków spożywczych przeznaczonych dla niemowląt czyli 0,01 mg/kg produktu (10) i wartości te wynosiły: 0,0242; 0,011; 0,011; 0,011; 0,0207 mg/kg mleka.

Tab e l a 1. Pozostałość DDT i metabolitów w próbkach mleka kobiecego (n = 56)

Tab l e 1. Contamination with DDT and metabolites in breast milk (n = 56)

Związek chloroorganiczny	średnia (mg/kg)	SD	minimum (mg/kg)	maksimum (mg/kg)	liczba próbek dodatnich
pp' DDE	0,004615	0,004	0,0008	0,0242	52
pp' DDT	0,003025	0,003	0,0007	0,008	4
pp' DDD op' DDE op' DDT	nie wykryto				
suma pp'DDE+pp'DDT	0,004878	0,004	0,0007	0,0242	52

SD – odchylenie standardowe

Liczne badania nad toksykodynamiką DDT i metabolitów u zwierząt wykazały, że nie są one obojętne dla ustroju nawet w niskich stężeniach, określanymi obecnie jako pozostałości. Niekorzystne skutki zdrowotne związane są z zaburzeniem równowagi hormonalnej. Następstwem czego może być zwiększenie prawdopodobieństwa występowania niektórych nowotworów, w tym sutka u kobiet, zaburzenia

zdrowia reprodukcyjnego, wzrost liczby przypadków wrodzonych wad rozwojowych narządów płciowych u chłopców. Wynika to przede wszystkim z ich zdolności do wywoływania odpowiedzi biologicznej zbliżonej do mechanizmu działania żeńskich hormonów płciowych (np. 17  $\beta$ -estradiolu) i w konsekwencji np. estrogennego efektu działania (11,12). W badaniach z lat sześćdziesiątych zawartość DDT wahała się w granicach 0,1–0,74 mg/kg mleka kobiecego (13). W Polsce preparaty zawierające DDT były sukcesywnie wycofywane z użycia od 1972 r. Proces ten został zakończony w 1975 r. Kolejne analizy mleka przeprowadzone w latach 1970–1990 potwierdziły proces obniżania się sumarycznej zawartości DDT i jego metabolitów w tłuszczu mleka kobiecego nawet kilkanaście razy (3, 13–15). W 1996 roku przeprowadzono badania zawartości DDT i jego metabolitów w mleku 72 kobiet z Wielkopolski (16). Średni poziom wynosił 1,664 mg/kg tłuszczu i był 7,7 razy niższy w porównaniu z wynikami podobnych badań prowadzonych w tym rejonie w 1971 roku. Zaobserwowano niższą zawartość badanych pestycydów w najmłodszej grupie wiekowej kobiet (16–22 lata), wynosiła ona 1,474 mg/kg tłuszczu. Dodatnią korelację między wiekiem kobiet a stężeniem DDT w tkance tłuszczowej gruczołu sutkowego, będącą bezpośrednim efektem bioakumulacji podczas trwającego całe życie narażenia na te związki potwierdzono w innych pracach (17). W 2001 roku wykonano badania mleka kobiecego w trzech miejscowościach, w pobliżu których zlokalizowane są duże zakłady chemiczne wykorzystujące do produkcji pochodne węglowodorów chlorowanych. Średnia zawartość sumy pp' DDE i pp' DDT w badanych próbkach mleka wynosiła odpowiednio 0,052 mg/kg; 0,027 mg/kg i 0,029 mg/kg mleka. Uzyskane zawartości przekraczały najwyższy dopuszczalny poziom pozostałości chemicznych środków ochrony roślin jaki ustalono dla środków spożywczych przeznaczonych dla niemowląt, który wynosi 0,01 mg/kg produktu (10). W latach 2000/2001 oznaczono sumę DDT i metabolitów w 27 próbkach mleka pochodzącego od kobiet z Wielkopolski (5). Średnia zawartość wynosiła 1160 ng/g tłuszczu, przy dość dużym przedziale wyników od 352 do 3309 ng/g tłuszczu. Otrzymana w naszej pracy średnia sumaryczna zawartość pp' DDE i pp' DDT wynosząca 0,004878 mg/kg mleka, odpowiada wartości 201,5 ng/g tłuszczu (przy średniej zawartości tłuszczu w badanych próbkach – 2,42%). Maksymalny oznaczony poziom DDT i metabolitów wynosił więc 1000 ng/g tłuszczu. Przedstawione w naszej pracy dane dotyczą mleka zbieranego w latach 2005/2006 i świadczą o dalszym spadku poziomów DDT i metabolitów w mleku kobiecym.

## WNIOSKI

1. We wszystkich badanych próbkach mleka największy 92% udział w  $\Sigma$  DDT miał izomer pp' DDE, a tylko 7% pp' DDT.
2. Średnia zawartość  $\Sigma$  DDT wynosiła 0,004878 mg/l, co stanowi 201,5 ng/g tłuszczu.
3. W pięciu próbkach przekroczony został NDP pozostałości chemicznych środków ochrony roślin, jaki ustalono dla środków spożywczych przeznaczonych dla niemowląt.

D. Skrajnowska, E. Strzelczyk, A. Kotlińska, A. Tokarz  
CONTAMINATION WITH DDT AND METABOLITES IN BREAST MILK

Summary

The main objective of this work: to analyse the presence of the selected organochlorine pesticides such as DDT (1,1,1-trichloro-bis-2,2'-[4chlorophenyl] ethane) and its metabolites: op' DDT, pp' DDT, pp' DDE, pp' DDE, pp' DDD in 56 human milk samples from Poland.

The selected of pesticides were determined qualitatively and quantitatively following liquid gas chromatography extraction with an electron capture detector (GC ECD). The sample identity was confirmed on mass-detector gas chromatography (GC MS).

Nearly all the samples (52) showed contamination with p'p' DDE and only 4 samples with pp' DDT. The milk samples showed contaminations with DDT (total DDT= pp' DDE + pp' DDT) ranging from 0,0007 to 0,0242 mg/l (mean = 0,004878mg/kg). In five samples, the maximum limits authorized for residual pesticides in infant dietary products were exceeded at 0,01 mg/kg.

PIŚMIENNICTWO

1. *LaKind J.S., Wilkins A., Berlin H.M.*: Enviromental chemicals in human milk: a review of levels, infant exposures and health and guidance for future research. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004; 198: 184 – 208. – 2. *Laben R.C.*: DDT contamination of feed and residues in milk. *J. Anim. Sci.*, 1986; 17: 43. – 3. *Lembrych S., Lorenz K., Kelm R.*: Zawartość insektycydów polichlorowanych w mleku położnic z rejonu Opola. *Gin. Pol.*, 1986; 57: 6. – 4. *Yu Z., Palkovicova L., Drobna B., Petrik J., Kocan A., Trnovec T., Hertz-Picciotto I.*: Comparison of organochlorine compound concentrations In colostrum and mature milk. *Chemosphere*, 2007; 66: 1012-1018. – 5. *Szyrwińska K., Lulek J.*: Exposure to specyfic polychlorinated biphenyls and some chlorinated pesticides via breast milk in Poland. *Chemosphere*, 2007; 66: 1895-1903. – 6. Polska Norma – PN-EN ISO 14181:2002. Oznaczanie pozostałości pestycydów chloroorganicznych. Metoda chromatografii gazowej. – 7. *Ludwicki J.K., Góralczyk K., Czaja K., Struciński P.*: Oznaczanie pozostałości insektycydów chloroorganicznych i polichlorowanych bifenyli w środkach spożywczych metodą chromatografii gazowej. *Wyd. Metod. PZH, Warszawa 1996.* – 8. *Smith D.*: Worldwide trends in DDT levels in human breast milk. *International Journal of Epidemiology*, 1999; 28: 179-188. – 9. *Azeredo A., Torres J.P.M., Fretas Fonesca M., Britto J.L., Bastos W.R., Silva C.,E., Cavalcanti G., Meire R.O., Sarcinelli P.N., Claudio L., Markowitz S., Malm O.*: DDT and its metabolites in breast milk from Madeira Rivre basin in the Amazon, Brazil. 2008; 73, S246-S251. – 10. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 17 października 2007r w sprawie środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego (Dz. U. Nr 209, poz. 1518, z 2008r Nr 208, poz. 1313).

11. *Wolff M.S., Collman G.W., Barret J.C., Huff J.*: Breast cancer and environmental risk factors: epidemiological and experimental findings. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 1996; 36: 573-596. – 12. *Salomon G.M., Schettler T.*: Environment and health: 6. Endocrine disruption and potential human health implications, *Can. Med. Assoc. J.*, 2000; 163, 1471-1476. – 13. *Juszkiewicz T., Stec J., Radomski T., Trębacka-Kwiatkowska B.*: Pozostałości insektycydów polichlorowych w sianie i mleku kobiet po porodzie. *Pol. Tyg. Lek.*, 1972; 27: 616 – 619. – 14. *Pawlicki L., Jaworski J., Smoczyński S.*: Chlorowane węglowodory w tłuszczu mleka kobiecego z rejonu Olsztyna w latach 1975-1976. *Prob. Lek.*, 1985; 24: 1-4. – 15. *Pawlicki L., Jaworski J., Smoczyński S.*: Pozostałości chlorowanych węglowodorów w tłuszczu mleka kobiecego w okresie laktacji. *Prob. Lek.*, 1985; 24: 1-4. – 16. *Rydzewska A., Wachowiak R., Wawrzyńczak D., Król J.*: Analysis of organochlorine pesticide residues in human milk in Wielkopolska – Western region of Poland. *Acta Pol. Toxicol.*, 1997; 5, 1: 79-84. – 17. *Struciński P., Ludwicki J. K., Góralczyk K., Czaja K., Olszewski W., Jethon J., Barańska J., Hernik A.*: Stężenia insektycydów chloroorganicznych w tkance tłuszczowej gruczołu piersiowego kobiet w Polsce w latach 1997–2001, *Roczn. PZH*, 2002; 3, 53: 221-230.