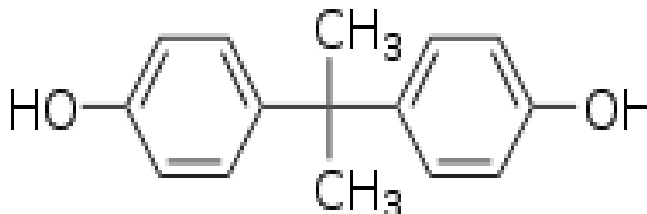




МИНИСТЕРСТВО НА ЗДРАВЕОПАЗВАНЕТО
НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ОБЩЕСТВЕНО ЗДРАВЕ И АНАЛИЗИ

Бул. "Акад. Иван Гешов"15
1431 София
България

Тел.: 02 80 56 444
02 951 53 02
Факс: 02 954 12 11



**БИСФЕНОЛ А –
ДАННИ ЗА РАЗПРОСТРАНЕНИЕ И ТОКСИЧНОСТ**

СТАНОВИЩЕ
/ПО ЛИТЕРАТУРНИ ДАННИ И СОБСТВЕНИ ПРОУЧВАНИЯ/

Доц. д-р Тери Врабчева, дм

София, 2013 г.

ВЪВЕДЕНИЕ.

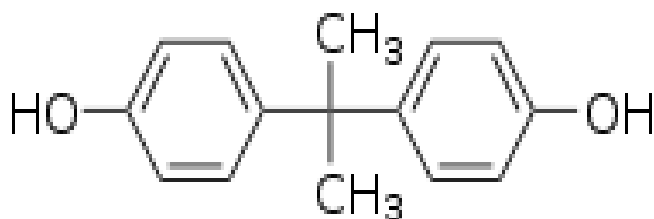
Бисфенол А /ВРА/ е химическо вещество, използвано основно в производството на поликарбонатни пластмаси, епоксидни смоли и като не-полимерна добавка към други пластмаси. Намира приложение в направата на много продукти за потребителите и оттук следва, че експозицията към него е много висока.

Няколко проучвания с цел оценка на риска от ВРА са направени през последните 15 години от различни регулаторни органи в Европа, САЩ, Япония и Канада. Тези оценки на риска са базирани основно на изследвания, извършени в съответствие с регулаторните насоки и добрата лабораторна практика (GLP), използвайки оралния път на въвеждане, големи групи от експериментални животни и няколко различни дози от веществото. В тези проучвания ефекти са наблюдавани при нива на експозиция 50 mg/kg телесно тегло/ден. Тези нива са доста над нивата на експозиция, изчислени за хората (0.07-12 µg/kg телесно тегло/ден), поради което повечето мениджъри по риска разглеждат границата за безопасност като задоволителна. От друга страна, голям брой научни изследвания описват ефекти при нива под тези, описвани в повечето оценки на риска като безопасни. Надеждността на тези изследвания за целите на оценката на риска се поставя от много критици под въпрос поради някои методологични недостатъци /малък брой на използваните животни, прилагане на единични дози, не-орален път на въвеждане на ВРА/ и това порооди много сериозен дебат относно безопасността на ВРА. Дания още през март 2010 г., следвайки принципа на предпазното действие, забрани използването на всички ВРА-съдържащи съдове за храна, предназначени за деца под 3 годишна възраст. Това решение на Дания бе последвано от подобни в Канада, САЩ и Франция.

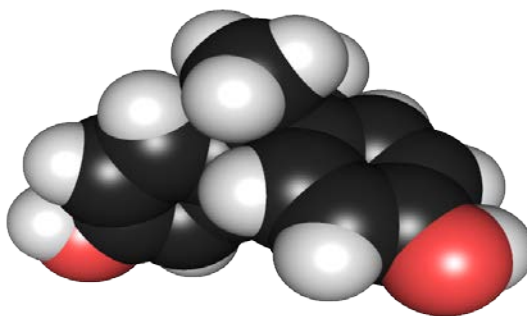
Най-голямото предизвикателство в оценката на риска от ВРА е свързано с неговата токсичност, основно репродуктивна и невро-еволюционна, както и канцерогенността. Доказано е, че ВРА има макар и слаба способност да се свързва с естрогенните рецептори, поради което се счита, че е „ендокринен нарушител”, с механизъм на действие като ксеноестроген. Някои епидемиологични изследвания свързват експозицията към ВРА с възможни здравни проблеми, като диабет, напълняване, промени в чернодробните ензими и сърдечно-съдови заболявания. В тези случаи, обаче, интерпретацията на резултатите е трудна, поради факта, че не са взети под внимание някои съпътстващи фактори. Всичко това прави ВРА сериозен обект на дискусии, както в научната общност, така и сред мениджърите по риска, които трябва да вземат решения относно неговото използване за различни цели.

ХИМИЧЕСКА СТРУКТУРА И МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ.

Бисфенол А като химическо вещество е 4,4-Dihydroxy-2,2- diphenylpropane /Фиг.1/ и е под формата на бели твърди кристали или люспи, с точка на топене 150-158°C. Молекулата на бисфенол А /Фиг.2/ може да бъде открита чрез нейната флуоресценция, чувствителността на UV-детекцията е значително по-слаба от флуоресцентната детекция. Аеробната биodeградация е основният процес на разграждане на бисфенол А в речните води и почвата, с полу-живот на разпад около 4.5 дни (Cousins et al., 2002).



Фиг.1. Химическа формула на бисфенол А.



Фиг. 2. Изображение на молекулата на бисфенол А.

Чувствителни и надеждни аналитични методи съществуват за определяне на бисфенол А в хранителни и биологични проби. Екстракцията с разтворител и твърдо-фазната екстракция са най-широко използваните и най-ефективни методи за извличане на бисфенол А от матрицата. За количественото определяне най-надеждни са MS- или MS/MS-базираните изотопни методи, които винаги трябва да се използват за потвърждаване на резултати, получени от не- MS-

базирани методи. ELISA методите могат да се прилагат при скринингови проучвания, но не и за количествени определяния. По възможност да се избягва крос-контаминирането по време на подготовката на пробата и анализа, особено при измерване на концентрациите на неконюгиран бисфенол А.

ИЗПОЛЗВАНЕ НА БИСФЕНОЛ А И ВЪЗМОЖНИ ПЪТИЩА НА ЕКСПОЗИЦИЯ.



Изчислено е, че повече от 1 милион тона бисфенол А се използват на годишна база в ЕС (ЕСВ, 2008). Приблизително 90% от бисфенол А се използва като мономер в производството на поликарбонатни пластмаси (70%) и епоксидни смоли (20%), а останалите 10% се използват в производството на други полимери или като добавка в производството на гуми, термална хартия, спирачни течности. Поликарбонатите, произведени от бисфенол А обикновено имат добра оптична чистота, устойчиви са на удар и са еластични при стайна и по-ниска температура. Това ги прави идеални в направата на различни продукти за употреба: бебешки шишета за хранене, съдове за микровълнови печки, съдове за съхраняване на храни, бутилки за минерална и обикновена вода. Епоксидните смоли се прилагат като предпазно покритие за съдове, използвани при консервирани храни и напитки, както и покриващи металните капачки за стъклени буркани и бутилки, включително съдове, използвани за храна на кърмачета.

Около 3% от общото производство на поликарбонати отива за направата на медицински инструменти, някои от които влизат в директен или индиректен контакт с пациентите /апарати за трансфузия, филтри, бай-пас, помпи, хирургични инструменти, оборудване за диализа,

преливане на кръв, уплътнители и покрития за зъби в стоматологията и др./ и възможност за трансфер на бисфенол А от поликарбоната в биологичните човешки матрици.

Научната общност смята, че експозицията на консуматорите към бисфенол А става главно чрез храната, влизаща в контакт с бисфенол А съдържащи материали. Най-високият изчислен дневен прием на бисфенол А в общата популация, съотнесен към телесното тегло, се наблюдава при кърмачетата и малките деца, поради използването на поликарбонатни бебешки шишета за хранене и бебешки канчета, покрити с епоксидни смоли.



До 2011 г. бе разрешено производството на бебешки шишета за хранене от поликарбонатни пластмаси. Във връзка с нови данни за евентуална токсичност на ВРА Европейската комисия с Директива № 8 от 28 януари 2011 г. постанови производството и пускането на пазара на поликарбонатни шишета за хранене на кърмачета да бъдат временно забранени до получаването на допълнителни научни данни, които ще изяснят токсикологичната значимост на някои наблюдавани ефекти на ВРА, с особено внимание по отношение на биохимичните промени в мозъка, имуномодулаторните ефекти и повишената предразположеност към развитие на тумори на гърдата. Няколко месеца по-късно Европейската комисия с Регламент за изпълнение (ЕС) № 321/2011 от 1 април 2011 година, който внася изменение в Регламент (ЕС) № 10/2011 във връзка с ограничението по отношение на употребата на бисфенол А в пластмасови шишета за хранене на кърмачета, забрани използването на поликарбонатни смоли при производството на бебешки шишета, считано от 1 май 2011 г., както и разпространението и вноса на поликарбонатни шишета за хранене на кърмачета в търговската мрежа на територията на ЕС, считано от 1 юни 2011 г.

ОТДЕЛЯНЕ НА БИСФЕНОЛ А ОТ ПОЛИКАРБОНАТИТЕ.

Бисфенол А може да се освободи от поликарбоната в течни храни чрез два различни процеса:

- Дифузия на остатъчен бисфенол А, присъстващ в поликарбоната след производствения процес;
- Хидролиза на полимера, катализирана от хидроксид (OH^-) при контакт с храна, съдържаща вода и симуланти (Ehlert *et al.*, 2008; Mercea, 2009).

За сухите храни е възможен единствено процеса на дифузия. Отделянето на бисфенол А от поликарбонатни съдове в храната зависи от времето на контакт, температурата и вида на храната. Хранителни симуланти често се използват в проучванията, за да представят различните видове храни, например 50% етанол във вода е хранителен симулант за мляко или 3% оцетна киселина във вода е симулант за плодов сок. По литературни данни е известно, че бисфенол А не е открит в плодов сок (ECB, 2003), адаптирано мляко (EU Member State data, 2009; Mountfort *et al.*, 1997) или супа (Japan, 1998), които са били в контакт с поликарбонатни продукти. Трябва да се отбележи, че резултатите при ниски нива на отделяне зависят от границата на откриване (LOD) на бисфенол А в хранителните матрици (0.01-0.03 mg/kg). Доказателства за освобождаване на бисфенол А идват от по-голям брой изследвания, извършени при използване на хранителни симуланти и течаща вода. Резултатите могат да бъдат обобщени в следните изводи:

- Основните параметри, влияещи на отделянето на бисфенол А са времето на контакт, температурата и рН на хранителния симулант, всичките с положителна корелация;
- При варене на вода в поликарбонатна бутилка концентрацията на бисфенол А може да се покачи поради покачване на рН;
- Миенето на поликарбонатна бутилка с четка изглежда, че не води до засилено отделяне на бисфенол А;
- Ефекта на остаряването на бутилката е трудно да се изчисли, тъй като изследвания, предполагащи такъв ефект, не се основават на експерименти с нови и използвани бутилки от една и съща производствена партида;
- Остатъчни алкални детергенти, които остават по повърхността на бебешката бутилка след измиване могат да увеличат отделянето на бисфенол А;

- Някои процеси на приготвяне на храната предизвикват увеличаване на рН над нормалното рН на храната;
- Възможно влияние на минералния състав на водни хранителни симуланти върху отделянето на бисфенол А досега не е ясно;
- Необходими са данни за отделяне на бисфенол А от изследвания, използващи хармонизирани аналитични протоколи и извършвани при реални условия.

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЕКСПОЗИЦИЯТА.

През 2002 г. Научният комитет по храните към ЕК изчислиха при най-лошия възможен сценарий експозиция към ВРА 0.0016 mg/kg телесно тегло/ден за новородени и кърмачета от 0 до 4 месеца и 0.0008 mg/kg телесно тегло/ден за деца от 6 до 12 месеца. Тези изчисления са базирани при концентрация на ВРА в храната 0.01 mg/kg, консумация на храна 0.7 l/ден и телесно тегло на децата 4.5 и 8.8 кг, съответно. Заключение на Комитета е, че кърмачетата и малките деца могат да бъдат по-експонирани на ВРА в сравнение с възрастните.

EFSA (2006) по искане на ЕК направи нова оценка на експозицията към ВРА в светлината на нови изследвания, които се появяват след 2002 г. Експозицията при кърмачетата на възраст от 0 до 6 месеца е разделена на 3 групи:

- Кърмени деца – експозиция 0.0002 mg/kg телесно тегло/ден;
- Кърмачета, хранени с неполикарбонат-съдържащо шише – експозиция до 0.0023 mg/kg телесно тегло/ден и
- Кърмачета, хранени с поликарбонатни шишета – експозиция до 0.011 mg/kg телесно тегло/ден.

В последните 2 случая, експозицията включва миграция на ВРА от епоксид покриващата смола на опаковките в адаптираното мляко. Експозицията при деца на възраст от 6 до 12 месеца е изчислена на 0.013 mg/kg телесно тегло/ден. В това становище на EFSA е изчислен допустим дневен прием (TDI) за ВРА от 0.05 mg/kg телесно тегло, базиран на NOAEL (no adverse effect level) от 5 mg/kg телесно тегло/ден в две поколения репродуктивна токсичност при мишки /чернодробни ефекти/ и прилагайки фактор за неопределеност 100.

През 2008 г. излиза нов доклад на ЕК по оценката на риска от ВРА (ЕСВ, 2008), в който се казва, че експозицията на кърмачета на възраст от 0 до 6 месеца идва само от поликарбонатни бебешки шишета, тъй като адаптираните млека не се пакетират вече в епоксид-покриващи

опаковки в ЕС. Експозицията при бебета на възраст от 1 до 2 месеца е изчислена на 0.008 mg/kg телесно тегло/ден, а при бебета на възраст от 4 до 6 месеца - 0.007 mg/kg телесно тегло/ден. Деца на възраст от 6 до 12 месеца се смята, че са експонирани само на BPA, отделян от епоксид-покриващи опаковки за храни и е изчислена на 0.004 mg/kg телесно тегло/ден.

Същата 2008 г. отново по искане на ЕК, EFSA публикува ново становище, което обръща специално внимание на различията в способността на кърмачетата и възрастните да изчистват BPA от тялото. В него се потвърждава, че експозицията към BPA е доста по-ниска от TDI 0.05 mg/kg телесно тегло/ден, както при възрастните, така и при новородените. След експозицията човешкото тяло бързо метаболизира BPA до хормонално неактивни конюгати и елиминира веществото. Това важи и за новородените, които могат да изчистват BPA от тялото си при нива, далеч по-високи от TDI. В това становище EFSA взема под внимание цялата налична световна литература по въпроса. EFSA се ангажира и с отговор относно изследване на Lang et al. (Journal of the American Medical Association, 16 September 2008), което предполага връзка между нивата на BPA в урината и увеличено разпространение на сърдечни заболявания и диабет. Според EFSA споменатото проучване не включва никаква информация върху дългосрочна експозиция към BPA, което е необходимо, за да се установи корелация между BPA и развитието на посочените хронични състояния.

Ново научно становище върху BPA е публикувано от EFSA през септември 2010 г., в което се заключава, че няма налични никакви нови доказателства, които да налагат ревизия на TDI за BPA от 0.05 mg/kg телесно тегло/ден, предложен от EFSA в становището от 2006 г. В становището се казва също, че някои ефекти при животни, свързани с BPA, вероятно изискват допълнително внимание независимо от методологичните слабости на научните публикации, където те се споменават. Става въпрос за биохимични промени в мозъка, имуно-модулаторни ефекти и по-висока възприемчивост към развитие на тумори на млечната жлеза. Няма данни за такива ефекти при хората. Експозицията чрез храната при възрастни /1.5 µg/kg телесно тегло/ден/ и при кърмачета на възраст от 3 до 6 месеца /13 µg/kg телесно тегло/ден/ не предполага надхвърляне на метаболитния капацитет за BPA при възрастни и кърмачета. EFSA ще преразгледа това становище при нови налични данни.

През 2011 г. Френската агенция ANSES публикува доклад, в който се подчертава, че ефекти върху здравето при експозиция на BPA са доказани при животни и предполагаеми при хората, дори при ниски нива на експозиция /под приетите регулаторни граници/. На основата на тези

проучвания се препоръчва никаква експозиция към BPA при кърмачета, малки деца, бременни и кърмещи жени, които са идентифицирани като най-възприемчивата популация. Докладът на ANSES влиза в известни противоречия с научното становище на EFSA от 2010 г., което наложи EFSA да вземе отношение по доклада на френската агенция. Главното различие между ANSES и EFSA е, че френската агенция използва при опитите с животни всички пътища на въздействие на BPA /не само чрез храната/, и също така изследвания с еднократна доза. Според ANSES BPA може да има отношение към женската фертилност, сърдечно-съдовите заболявания, диабета, неврогенезата, липогенезата, заболявания на млечните жлези и имунната система. Тези предположения на ANSES са базирани на опити с животни. EFSA намира слабости в тези проучвания и смята, че те не могат да инициират промяна в TDI за BPA.

В отговор на много запитвания от различни страни и организации EFSA си възлага сама мандат за изготвяне на нова пълна оценка на риска от BPA, използван в материали за контакт с храни, с фокус върху най-уязвимите групи. EFSA трябва да прегледа цялата световна научна литература и научни изследвания, публикувани след 2006 г. и също да вземе под внимание и нехранителните източници на BPA в общата експозиция /дермална и инхалаторна експозиция/. В резултат през септември 2013 г. EFSA публикува първи вариант на новото научно становище върху BPA, което бе предложено за обществено обсъждане. Краен срок за публикуване на окончателен вариант на становището е 31 май 2014 г.

ТОКСИЧНОСТ И ОЦЕНКА НА РИСКА.

Бисфенол А е с ниска остра токсичност при всички пътища на експозиция, важни за човешкото здраве. Той се определя като дразнещ респираторната система и в състояние да предизвика сериозно увреждане на очите. Също така BPA провокира кожно-сензитивен отговор при хората и възможност за намаляване на фертилността. Твърде противоречиви са изследванията, при които се изисква повтаряща се и системна експозиция, като репродуктивна токсичност, токсичност при развиващи се организми, канцерогенност, които сериозно привличат вниманието на научната общност с оглед рисковете за човешкото здраве.

При хората и гризачите, приетият чрез храната BPA бързо и ефикасно (>95% от дозата) се абсорбира от гастро-интестиналния тракт и претърпява първи етап на метаболизъм в стените на червата и в черния дроб. Този етап включва конюгиране на BPA до BPA-глюкуронид. Друг по-слабо изразен път на метаболизъм е сулфатиране на BPA. Получените два метаболита /BPA-

глюкуронид и ВРА-сулфат/ са лишени от естрогенна активност, поради което конюгирането на ВРА се разглежда като дезактивираща реакция. В резултат на тази бърза биотрансформация и екскреция, концентрацията на свободния ВРА, способен да се свързва с естрогенните рецептори, е много ниска при хората. ВРА изцяло се открива в урината като ВРА-глюкуронид в рамките на 42 часа и повече от 90% от приетата доза се отделя с урината в първите 6 часа след приема. Няма налични данни за биоаккумуляция на ВРА в човешкото тяло. Няколко проучвания установяват незначителна екскреция на ВРА в човешкото мляко. При гризачите основният път на елиминиране на ВРА е чрез фецеса /50-83%/. Американски учени доказват, че нивата на ВРА от храната, които могат да преминат от бременни жени във фетуса са толкова малки, че не могат да се измерят. При бременни гризачи, приели от 100 до 1000 пъти повече ВРА в сравнение с хората чрез храната – не се открива активна форма на ВРА във фетуса 8 часа след експозицията на майката.

В изследвания на австралийски учени не са открити никакви количества на ВРА в бебешки млека, включително и в млека, съхранявани в ВРА – съдържащи шишета. Много ниски нива са открити в малък брой проби, главно консервирани храни. Учените установяват, че австралийците от всички възрасти са експонирани на изключително ниски нива на ВРА, а също така, че чернодробните ензими са доста ефикасни в борбата с ВРА, превръщайки 99.9% от ВРА в не-токсичен. Подобни резултати са получени и в Япония, където населението е изложено на незначителен риск от ВРА.

ВРА се разглежда като слаб ксеноестроген, поради неговата способност да се свързва с естрогенните рецептори с афинитет от 10.000 до 100.000 пъти по-слаб от този на 17 β -естрадиол (естественият хормон). Проучвания върху молекулярните механизми на действие на ВРА разкриват множество пътища, по които ВРА може да предизвика клетъчен отговор в много ниски концентрации, в допълнение към ефектите, предизвикани от свързването му с класическите нуклеарни и геномни естрогенни рецептори.

Данни от над 150 изследвания показват ефекти на ниски дози ВРА при животни: хиперплазия и рак на простатата, рак на млечната жлеза, ефекти върху хипоталамуса, ранен пубертет, напълняване, генитални малформации и др. Съществуват хипотези, според които експозицията на ксеноестрогени като ВРА, особено по време на ранното развитие /пре- и постнатално/, може да се окаже причината за нарастващите случаи на безплодие, малформации на гениталиите, отклонения в половото развитие и рак на млечната жлеза, наблюдавани сред човешките

популации в Европа и САЩ през последните 50 години (Tyl et al., 2002, 2008). В същото време не е установено ВРА да е канцероген в стандартни канцерогенни изследвания. Има само опасения за нарастваща възприемчивост за преканцерозни промени вследствие на *in-utero* или неонатална експозиция към ВРА при плъхове. Необходима е повече информация, за да се разбере експозицията към ВРА в ранното развитие и процеса на канцерогенеза.

Здравните рискове от експозицията към ВРА при хората са оценявани през последните 10-15 години от компетентни органи, научни институти, експертни групи в Европа, САЩ, Канада и Япония. При всички оценки са идентифицирани потенциални вредни ефекти за здравето от ВРА и нивата на експозиция при хората са били изчислени с оглед да се направят изводи за здравните рискове при тези нива на експозиция (Beronius et al., 2009). Независимо от това, досега няма съгласие относно риска за здравето на хората от експонирането им към ВРА. Повечето несигурности относно здравните ефекти за хората от ВРА идват от различните мнения за надеждността на научните изследвания, извършвани по различни методологии, което води до противоречиви интерпретации на получените резултати. Следването на определени ръководни критерии и добрата лабораторна практика нормално се разглежда като силна изходна точка при оценката на риска. Някои учени обаче, смятат, че тези критерии не трябва да се използват за омаловажаване на констатациите в други изследвания, които не отговарят на тези строги критерии. Много научни колективи настояват при оценката на риска да се разглеждат всички налични данни, включително получените от изследвания, непроведени съгласно добрите лабораторни практики. През последното десетилетие, голям брой изследвания съобщават за ефекти на ВРА при експозиции на дози от порядъка на $\mu\text{g/kg}$ телесно тегло. Това поставя под въпрос изчисления за регулаторни цели NOAEL, който е по-висок с 3 порядъка от изчисления при експерименталните изследвания. По принцип, този спор може да бъде разрешен чрез нова серия от глобално съгласувани токсикологични проучвания, базирани на хармонизирани тест програми, които предварително да бъдат дискутирани на международно ниво, с участието на тези, които са настроени критично към съществуващите практики в оценката на риска. Провеждането на такива тестове под ръководството на международен панел от независими експерти, е добра възможност да се улесни приемането на резултатите и съгласуването на изводите.

Друг източник на противоречия е реалната вътрешна експозиция на хората. За биологично активен се счита единствено свободният ВРА и това не важи за неговите метаболити. EFSA в

своята оценка на риска допуска, че в кръвта на хората не се откриват никакви концентрации на свободен ВРА, които биха могли да имат практическо значение. В същото време много периферни органи, включително плацентата, имат висока активност на глюкуронидази и сулфатази, които са способни да деконюгира неактивните метаболити до свободната и метаболитно активна форма. Присъствието в кръвта единствено на конюгиран ВРА не гарантира, че субстанцията е биологично неактивна и в тъканите. Повечето от публикуваните научни биомониторингови проучвания откриват значителни нива на свободен ВРА в човешката кръв. Следователно основната популация е експонирана на ВРА и хората са в риск от вътрешно експониране с неконюгиран ВРА.

ДАННИ ЗА БЪЛГАРИЯ.

В отдел „Материали за контакт с храни” в Националния център по обществено здраве и анализи бе направено първо за България проучване с цел да се разработи и верифицира чувствителен и специфичен метод за определяне на ВРА и да се извърши предварително изследване за миграция на ВРА в пазарни вносни проби бебешки шишета и чаши, произведени от поликарбонатни пластмаси.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОД.

Проби. Проучването включваше анализ на 64 проби шишета от 21 асортимента и 9 проби чаши от 3 асортимента за многократна употреба, предназначени за използване при приготвянето на храна за кърмачета и закупени от търговската мрежа в началото на 2011 г. преди влизане в сила на Регламент 321/2011 г.

Апаратура и хроматографски условия. Анализите са направени чрез използване на високо ефективна течна хроматографска система /BETX/, с помпа Varian 9010 и флуоресцентен детектор Varian 9070, с обратно фазова хроматографска колона Purospher 100 RP18 (250x4 mm, 5 μ m), изократно елуиране с метанол:вода (70:30) и скорост на потока 1.2 cm³/min при стайна температура. Инжекционният обем е 50 μ l. Детекцията е флуоресцентна с $E_x = 276$ nm и $E_m = 306$ nm. За количественото определяне се построява калибрационна крива, чрез инжектиране на стандартни сравнителни разтвори с концентрации: 0.01; 0.03; 0.06; 0.12; 0.3; 0.6; 0.9 и 1.2 μ g/cm³.

Принцип на метода. Термична обработка с модален разтвор етанол:вода (50:50) в продължение на 2 (два) часа при $70 \pm 2^\circ\text{C}$ и последваща високо ефективна течна хроматография с флуоресцентна детекция.

Валидиране на аналитичния метод. Методът е валидиран в отдел „Материали за контакт с храни”. Определени са следните параметри: линейност, граница на откриване (LOD), граница на количествено определяне (LOQ), прецизност и аналитичен добив. Линейността на метода е оценена чрез построяване на калибрационна крива от стандартни сравнителни разтвори с концентрации в интервала $0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^3 - 1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. За проверка на линейността е използван критерия R2 (коефициент на корелация). Границата на откриване (LOD) и на количествено определяне (LOQ) са изчислени на база съотношение на сигнал/шум на базовата линия, съответно 3:1 и 6:1. Прецизността е оценена чрез определяне на повторяемост (r) и относително стандартно отклонение в условия на повторяемост (RSDr). За съжаление лабораторията по контактни материали в НЦОЗА не разполага с HPLC-MS, за да потвърди получените резултати.

РЕЗУЛТАТИ.

При разработването на метода е постигната добра линейност в концентрационния интервал $0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^3 - 1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, с коефициент на корелация $R2 > 0.9993$, покриващ изискването за линейност $R2 > 0.99$ /Фиг.3/. Постигнатата граница на откриване на метода (LOD) е $0.005 \mu\text{l}/\text{ml}$, а границата на количествено определяне (LOQ) е $0.01 \mu\text{l}/\text{ml}$. При оценка на прецизността са постигнати:

$$X_{cp} = 0.2625 \mu\text{l}/\text{ml} \quad Sr = 0.00477 \mu\text{l}/\text{ml} \quad r = 0.0133 \mu\text{l}/\text{ml} \quad RSDr = 1.816\% \quad n = 10$$

$$X_{cp} = 0.5009 \mu\text{l}/\text{ml} \quad Sr = 0.03554 \mu\text{l}/\text{ml} \quad r = 0.0995 \mu\text{l}/\text{ml} \quad RSDr = 7.094\% \quad n = 10$$

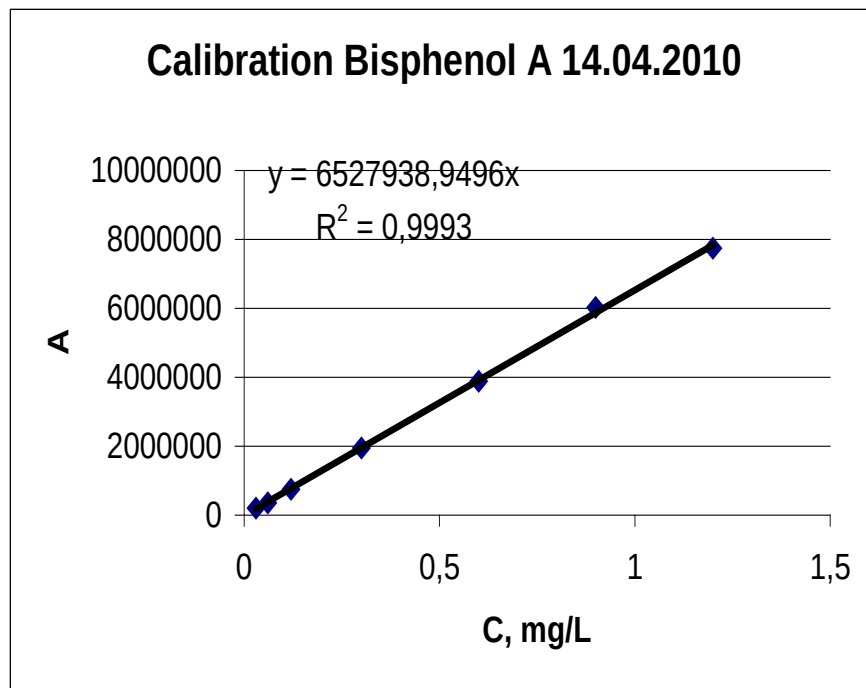
$$X_{cp} = 1.0022 \mu\text{l}/\text{ml} \quad Sr = 0.07902 \mu\text{l}/\text{ml} \quad r = 0.221 \mu\text{l}/\text{ml} \quad RSDr = 7.88\% \quad n = 10$$

Средният аналитичен добив е 87 - 90%. Представеният метод покрива изискванията относно специфичност, точност, чувствителност и възпроизводимост.

С така разработения метод бяха анализирани 64 проби шишета от 21 асортимента и 9 проби чаши от 3 асортимента, закупени на българския пазар в началото на 2011 г. преди влизане в сила на Регламент (ЕС) № 321/2011 от 1 април 2011 година. При една част от асортиментите няма обозначение за вида на използваната пластмаса, при други не е ясно коя е страната-вносител. На българския пазар се предлагат бебешки шишета, внесени от Италия, Полша, САЩ, Китай, Тайланд, Тайван и др., произведени от поликарбонатна или друга пластмаса.

ФИГУРА 3. КАЛИБРАЦИОННИ КРИВИ НА БИСФЕНОЛ А.

C, mg/L	A
0,01	69359
0,03	208077
0,06	359874
0,12	757353
0,3	1955266
0,6	3882066
0,9	6029227
1,2	7739977



C, mg/L	A
0,01	69084
0,03	207252
0,06	431271
0,12	815503
0,3	2030099
0,6	3966524
0,9	5978197
1,2	7916964

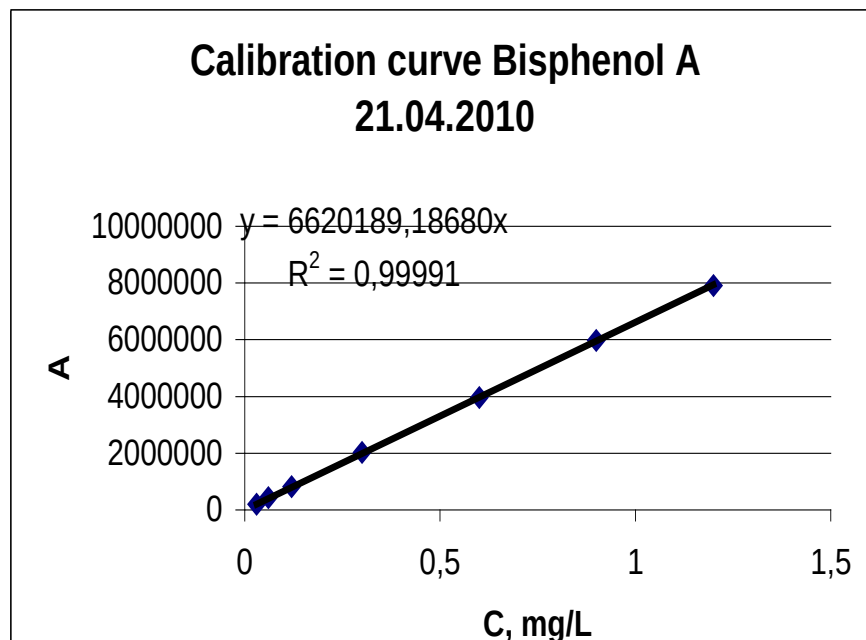


ТАБЛИЦА 1. ПРОУЧВАНЕ НА ПАЗАРНИ ВНОСНИ ПРОБИ БЕБЕШКИ ШИШЕТА И ЧАШИ ОТ НАЧАЛОТО НА 2011 Г. ПРЕДИ ВЛИЗАНЕ В СИЛА НА РЕГЛАМЕНТ № 321/2011 Г.

№	Асортимент	Бр. анализ. проби/ Бр. положит.	Mean mg/L	Min mg/L	Max mg/L
1.	Chicco 4m + Mangiafasile, 350ml, Италия, PC	3/0	ND	ND	ND
2.	Going Berry, 275 ml, Тайланд, PC	3/0	ND	ND	ND
3.	Шише за хранене, 250ml, Китай, без обозначение за вида на пластмасата	6/0	ND	< LOQ	ND
4.	Snail, 250ml, Тайланд, PC	3/0	ND	ND	ND
5.	Lovely boy, 120ml, Тайланд, PC	3/0	ND	ND	ND
6.	Bright Beginnings, 300ml, Тайланд, PC	3/0	ND	ND	ND
7.	Canpol babies, 120ml, Полша, без обозначение в/у шишето, в листовка е посочено PC	3/0	ND	ND	ND
8.	Nuby, САЩ, 120ml, без обозначение в/у шишето за вида на пластмасата	3/0	ND	ND	ND
9.	Baby care, Bertoni, 125 ml, Тайланд, PC	3/0	ND	ND	ND
10.	Baby care, Bertoni, Китай, PC, чаша	3/0	ND	< LOD	ND
11.	NUK, 125 ml, Германия, PC	1/0	ND	ND	ND
12.	NUK, 150 ml, Германия, PC	1/0	ND	ND	ND
13.	JANE, 240 ml, PC	1/0	ND	ND	ND
14.	Avent, 125 ml, Великобритания, PC	1/0	ND	ND	ND
15.	Avent, 260 ml, Великобритания, PC	1/0	ND	ND	ND
16.	Avent, 330 ml, Великобритания, PC	1/0	ND	ND	ND

17.	Avent, чаша, Великобритания, PC	1/0	ND	ND	ND
18.	“Camera New Safe”, 240 ml, Тайван, PC	5/0	< LOQ	< LOD	< LOQ
19.	“Camera New Safe”, 250 ml, Тайван, PC	5/0	ND	ND	<LOD
20.	“Camera New Safe”, 140 ml, Тайван, PC	3/3	0.03	0.03	0.03
21.	“Camera New Safe”, 250 ml, Тайван, PC	5/5	0.04	0.02	0.06
22.	“Camera New Safe”, 250 ml, Тайван, PC	5/5	0.03	0.02	0.04
23.	“Camera New Safe”, 120 ml, Тайван, PC	5/0	ND	ND	<LOD
24.	“Camera New Safe”, 180 ml, чаша, Тайван, PC	5/0	ND	ND	<LOD

Забележка: ND - концентрация 1/2 LOD

От 21 асортимента бебешки шишета 19 /90%/ са произведени от поликарбонатна пластмаса /PC/, от 3 асортимента чаши 3 са PC, което показва, че на българския пазар в началото на 2011 г. масово се предлагат бебешки шишета и чаши за хранене, произведени от поликарбонатна пластмаса /Табл.1/. При 3 асортимента бебешки шишета бе установена миграция на BPA, като и трите асортимента са с марка “Camera New Safe”, производство от Тайван. Откритите стойности на BPA варират между 0.02 и 0.06 mg/L, при граница на откриване на метода (LOD) - 0.005 mg/L и граница на количествено определяне (LOQ) - 0.01 mg/L. Асортименти с марка “Camera New Safe”, производство от Тайван, са евтини и широко се предлагат на българския пазар. До 2011 г. няма никакъв контрол върху тези изделия и не може да се каже каква част от предлаганите на българския пазар асортименти са рискови по отношение миграцията на BPA. След влизането в сила на Регламент (ЕС) № 321/2011 от 1 април 2011 година всички бебешки шишета, произведени от поликарбонатна пластмаса трябваше да бъдат иззети от пазара до 1 юни 2011 г.

НЦОЗА проведе повторно проучване през 2013 г., 2 години след влизане в сила на Регламент 321/2011 г. с цел да провери дали е спазен Регламента и какво е състоянието на българския пазар по отношение на бебешките шишета за хранене. Бяха анализирани и шишета, на които имаше обозначение PP /полипропилен/, за да проверим за евентуални фалшификации /Табл. 2/.

ТАБЛИЦА 2. ПРОУЧВАНЕ НА ПАЗАРНИ ВНОСНИ ПРОБИ БЕБЕШКИ ШИШЕТА ОТ ВТОРАТА ПОЛОВИНА НА 2013 Г., СЛЕД 2 ГОДИНИ В СИЛА НА РЕГЛАМЕНТ № 321/2011 Г.

№	Асортимент	Бр.анализ. проби/ Бр.положит.	Mean mg/l	Min mg/l	Max mg/l
1	Babylove, Dm,125 ml, Германия, РР	3/0	ND	ND	ND
2	Babycare, Bertoni, 250 ml, Тайланд, РР	3/0	ND	ND	ND
3	Babycare, Bertoni, 250 ml, Тайланд, РР	3/0	ND	ND	ND
4	Canpol babies, 250 ml, Полша, РР	3/0	ND	ND	ND
5	Babylove, Dm, 250 ml, Австрия, РР	3/0	ND	ND	ND
6	Camera new safe, 140 ml, model 10035, Тайван, РС	3/1	0.03	0.03	0.03
7	Camera new safe, 140 ml, model 10035, Тайван, РС	1/0	ND	ND	ND
8	Camera new safe, Decorated, 250 ml, Тайван, РС	1/0	ND	ND	ND
9	Camera new safe, 140 ml, model 10035, Тайван, РС	3/0	ND	ND	ND
10	Disney, 250 ml, Тайланд, РР	3/0	ND	ND	ND
11	Camera new safe, 250 ml, model 11149, Тайван, РС	3/0	ND	ND	ND
12	Canpol babies, 250 ml, Полша, РР	3/0	ND	ND	ND
13	Camera new safe, 140 ml, model 10035, Тайван, РС	3/0	ND	ND	ND
14	Babycare, Bertoni, 125 ml, Тайланд, РР	3/0	ND	ND	ND
15	Camera new safe, 140 ml, model 10035, Тайван, РС	3/0	ND	ND	ND
16	Camera new safe, 250 ml, model 10039, Тайван, РС	3/0	ND	ND	ND
17	Babycare, Bertoni, 250 ml, Тайланд, РР	3/0	ND	ND	ND
18	NUK, 150 ml, Германия, РР	3/0	ND	ND	ND

Забележка: ND - концентрация 1/2 LOD

За целта бяха взети от пазара /от инспекторите на Областните дирекции по безопасност на храните/ 50 проби бебешки шишета от 18 асортимента /по 3 проби от асортимент/. Използвайки същия метод от 2011 г., пробите бяха изследвани за миграция на бисфенол А. Оказва се, че 2 години след влизане в сила на Регламент 321/2011 г., на българския пазар все още се предлагат

бебешки шишета, произведени от поликарбонатна пластмаса, въпреки забраната на ЕК. От 18 асортимента бебешки шишета /Табл.2/, 8 /44%/ са произведени от поликарбонатна пластмаса, всички внос от Тайван. При една от изследваните проби бе установена миграция на бисфенол А в концентрация 0.03 mg/l – при граница на откриване на метода (LOD) - 0.005 mg/L и граница на количествено определяне (LOQ) - 0.01 mg/L. Пробата е с марка “Camera New Safe”, производство от Тайван. Проби от същата марка показаха миграция на ВРА и в предишното проучване от 2011 г. Наши наблюдения показват, че българският пазар все още е зает с евтини асортименти бебешки шишета, произведени от поликарбонатна пластмаса, въпреки влизането в сила на Регламент 321/2011 от 1 юни 2011 г., забраняващ изрично вноса на бебешки шишета, произведени от поликарбонатна пластмаса на територията на ЕС.

Заклучение. Получените резултати в НЦОЗА показват сериозни слабости в контрола от страна на БАБХ по отношение вноса на бебешки шишета на територията на страната и съответно на територията на ЕС. Всички представени на пазара бебешки шишета следва да бъдат проверявани за вида пластмаса, от който са произведени и придружени със съответен сертификат за отсъствие на ВРА.



ЛИТЕРАТУРА:

1. Beronius A, Rude C, Hakansson H, Hanberg A, 2009. Risk to all or none?. A comparative analysis of controversies in the health risk assessment of Bisphenol A. *Reprod Toxicol*, doi:10.1016/j.reprotox.2009.11.007.
2. Cousins IT, Staples CA, Klecka GM and Mackay D, 2002. A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment*, 8, 1107-1135.
3. D'Antuono A, Campo Dall'Orto V, Lo Balbo A, Sobral S, Rezzano I, 2001. Determination of Bisphenol A in Food-Simulating Liquids Using LCED with a Chemically Modified Electrode, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1098-1101.
4. ECB 2003. European Union Risk Assessment Report. 4,4'-isopropylidenediphenol (bisphenol-A), CAS No: 80-05-7. Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau, European Commission Joint Research Centre, 3rd Priority List, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, EUR 20843 EN. Available from: <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/index.php?PGM=ora>
5. ECB 2008. European Union Risk Assessment Report Draft: Updated risk assessment of 4,4'-isopropylidenediphenol (Bisphenol A) (CAS No. 80-05-7; EINECS No. 201-245-8). European Commission, European Chemicals Bureau, Existing Substances. Available from: <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/index.php?PGM=ora>
6. EFSA 2006. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the Commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) Question number EFSA-Q-2005-1 00. *The European Food Safety Authority Journal*, 428:1-75. Available from: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620772817.htm
7. EFSA 2008. Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC) on toxicokinetics of bisphenol A. *The European Food Safety Authority Journal*, 759:1–10. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/759.htm>.

8. EFSA 2010. Scientific Opinion on bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A, The European Food Safety Authority Journal, 1829, 116 pp.
9. Ehlert K.A., Beumer C.W.E., Groot M.C.E., 2008. Migration of bisphenol A into water from polycarbonate baby bottles during microwave heating. Food Additives and Contaminants, 25, (7), 904–910.
10. Howe SR, Borodinsky L, 1998. Potential exposure to bisphenol A from food-contact use of polycarbonate resins. Food Additives and Contaminants 15, (3), 370-375.
11. Japan 1998. An Interim Report of the Japanese Study Group on Health Effects of Endocrine Disrupting Chemicals.
www.ffcr.or.jp/_492565a0001a8909.nsf/0/5e69e178bbad89414925681d001fa22d
12. Mercea P, 2009. Physicochemical processes involved in migration of bisphenol A from polycarbonate. Journal of Applied Polymer Science, 112, 579–593.
13. Mountfort KA, Kelly J, Jickells SM, Castel L, 1997. Investigations into the potential degradation of polycarbonate baby bottles during sterilization with consequent release of bisphenol A. Food Additives and Contaminants, 14, 737-740.
14. SCF 2002. European Commission—Health & Consumer Protection Directorate-General. Opinion of the Scientific Committee on Food on Bisphenol A. European Commission—Health & Consumer Protection Directorate-General, SCF/CS/PM/3936 Final2002. Available online at: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out128_en.pdf.
15. Tyl RW et al. 2002. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. Toxicol Sci, 68, 121–146.
16. Tyl RW et al. 2008. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. Toxicol Sci, 104, 362–384.

РЕЗЮМЕ: Бисфенол А (ВРА) е органично съединение, използвано главно като мономер за производство на поликарбонатни пластмаси, епоксидни смоли и като не-полимерна добавка към други пластмаси. Поради широкото приложение на ВРА в направата на различни продукти за потребителите, като поликарбонатни бебешки шишета, съдове и контейнери за храни, покритие на вътрешната повърхност на консервни кутии с епоксидна смола, стоматологични уплътнители, водопроводни тръби и др., съществува широко разпространена експозиция към ВРА. Установено е, че ВРА има слаб афинитет към свързване с естрогенните рецептори. Относно резултатите от оценките на здравните ефекти при хората, има общ консенсус за данните за остри и локални ефекти и за генотоксичност на ВРА, но все още няма съгласие относно репродуктивната токсичност и токсичността при развиващите се организми /специално мозъчното развитие/ и канцерогенността. Също така, има дебат и върху токсикокинетиката на ВРА, която още не е напълно изяснена. Някои нови проучвания съобщават за откриване на свободен ВРА в кръвта и урината на животни и хора, водещи до предположения за акумулиране на ВРА в тялото, а също така и за участие на други нехранителни източници в експозицията при хората. Има индикации, че е възможен трансфер на ВРА от майката към зародиша. Надеждността на всички тези резултати трябва да бъде потвърдена както от сериозни аналитични данни за количествата на свободния ВРА в човешката плазма и урина, така и от по-доброто разбиране на токсикокинетиката при животните и хората.

Взимайки под внимание всички научни данни за възможни токсикологични действия на ВРА при ниски дози, Европейската Комисия забрани неговото използване в производството на бебешки поликарбонатни шишета за хранене.

В Националния център по общественото здраве и анализи бе извършено проучване на българския пазар относно наличието на поликарбонатни бебешки шишета и възможна миграция на ВРА за 2011 и 2013 г. Бе разработен метод за определяне на ВРА при използване техниката на високо ефективна течна хроматография и флуоресцентна детекция. на пазарни проби вносни бебешки шишета, с използване на модален разтвор – етанол:вода = 50:50 v/v. Анализираните проби са статистически представителни бройки от всеки един изследван асортимент.

При някои видове асортименти се установи миграция на ВРА, което подчертава значимостта на проблема и налага неговото по-продължително проучване.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: Бисфенол А, токсикология, оценка на риска, бебешки шишета за хранене, данни за българския пазар

ABSTRACT: Bisphenol A (BPA) is an organic compound used primarily as a monomer in production of polycarbonate plastics, epoxy resins and as a non-polymer additive to other plastics. Because of the extensive use of BPA in the manufacture of consumer products, such as polycarbonate baby bottles, epoxy-resin can liners, food containers and utensils, dental sealants, protective coatings, flame-retardants, and water supply pipes, there is a widespread human exposure to BPA. BPA has been shown to have weak binding affinity to oestrogen receptors. Concerning the results from human health effect assessments, while there is general consensus concerning data on acute and local effects and genotoxicity of BPA, there is not yet agreement as regards reproductive and developmental toxicity (specifically neurodevelopment) and carcinogenicity. There is also some debate on the toxicokinetics of BPA which is still not fully resolved. Some recent studies reported the detection of free BPA in blood and urine in animals and humans, leading to speculation on whether BPA might accumulate in the body and/or whether other, non-food sources may contribute to human exposure. There are also indications that transfer of BPA may take place from the mother to the foetus, which in turn may imply an exposure in pre-natal life following the mother's intake of BPA. However, the reliability of these findings should be confirmed by both sound analytical data on the amount of free BPA in human plasma and urine, and a better understanding of toxicokinetics in animals and humans.

Taking into account that the present scientific data have suggested BPA-related effects of possible toxicological relevance, in particular neurodevelopmental, endocrine and reproductive effects, the European Commission banned the use of BPA for the manufacture of polycarbonate infant feeding bottles.

At the National Center for Public Health and Analyses it was carried out a study to evaluate the infant feeding bottle market in Bulgaria for 2011 and 2013. Using HPLC with fluorescence detection of BPA some samples of imported infant feeding bottles were analysed. The extraction method used was with ethanol/water (50/50) as a food simulant. The samples analysed were statistically representative.

It was found a migration of BPA in some analysed samples in both years, that emphasizes the importance of the problem and the need of further research.

KEY WORDS: Bisphenol A, toxicology, risk assessment, infant feeding bottles, data for Bulgarian market