

## ANALIZA POLIKLORBIFENILA I ORGANOKLOROVIH PESTICIDA U BOROVIM IGLICAMA

Darija KOŽUL i Snježana HERCEG ROMANIĆ  
*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb*

Primljeno u lipnju 2007.

Prihvaćeno u srpnju 2007.

U ovom je radu prikazan pregled postupaka analize poliklorbifenila (PCB) i organoklorovih pesticida (OCP) u borovim iglicama. Navedeni spojevi su lipofilni, postojani u okolišnim uvjetima i akumuliraju se u živom i neživom dijelu okoliša, a zbog štetnih učinaka na zdravlje ljudi i životinja njihova je upotreba zabranjena ili ograničena te su postali predmetom intenzivnog istraživanja. Borove iglice su pogodno sredstvo za praćenje razina organoklorovih spojeva u zraku jer imaju sposobnost njihova akumuliranja preko voska kojim su prekrivene, no zbog mnogih drugih spojeva koje sadržavaju složen su medij za analizu. Analitički postupci određivanja organoklorovih spojeva u borovim iglicama uključuju skupljanje uzorka, ekstrakciju spojeva pogodnim otapalom, pročišćavanje ekstrakta od neželjenih spojeva te kvalitativnu i kvantitativnu analizu. PCB i OCP se u borovim iglicama nalaze u tragovima, stoga svaki dio analitičkog postupka mora biti što djelotvorniji i selektivniji.

**KLJUČNE RIJEČI:** *analitički postupci, crnogorično drveće, okoliš, onečišćenje, organoklorovi spojevi*

Poliklorbifenili (PCB) i organoklorovi pesticidi (OCP) sintetski su aromatski klorirani spojevi koji su zbog svojih povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava rabljeni u raznim granama industrije te u poljoprivredi i javnom zdravstvu. Zbog svoje postojanosti i lipofilnosti ti se spojevi dugo zadržavaju u živom i neživom dijelu okoliša. Zbog toksičnih učinaka na zdravlje ljudi i životinja njihova je proizvodnja i primjena u svim razvijenijim zemljama zabranjena ili ograničena sedamdesetih godina 20. stoljeća. Danas su izvor PCB-a odlagališta otpadnih materijala koji sadržavaju te spojeve, spaljivanje tih materijala ili nesreće kod kojih dolazi do emisije PCB-a (1). Od organoklorovih pesticida, heksaklorbenzen u okoliš dospijeva kao sporedni produkt pri proizvodnji ili spaljivanju nekih kloriranih kemikalija i pesticida (2), 1,1,1-triklor-2,2-di(4-klorfenil)etan (DDT) se još rabi za suzbijanje malarije u tropskim područjima (3), dok

je  $\gamma$ -heksaklorcikloheksan (poznat kao lindan) u nekim zemljama još u uporabi kao insekticid (4).

Da bi se procijenila izloženost okoliša i ljudi organoklorovim spojevima, oni se analiziraju u raznim uzorcima iz živog i neživog dijela okoliša. Kao pasivni pokazatelj prosječnog profila onečišćenja zraka određenog mjesta mogu se rabiti iglice crnogoričnog drveća koje su prekrivene voskom na koji se sorbiraju lipofilni spojevi iz zraka oko iglica. Bor se smatra jednim od pogodnih pasivnih skupljača tih spojeva zbog svoje široke rasprostranjenosti što omogućuje usporedbu onečišćenja na lokalnoj, regionalnoj i globalnoj razini te postojanja više generacija iglica na istoj grani zbog čega je moguća usporedba onečišćenja tijekom višegodišnjeg razdoblja (5). Sam postupak analize PCB-a i OCP-a u borovim iglicama vrlo je zahtjevan zbog njihovih niskih masenih udjela i velikog broja drugih spojeva koji mogu smetati

njihovu određivanju. Ovaj rad sadržava pregled različitih postupaka analize PCB-a i OCP-a u borovim iglicama kojima su istraživači više ili manje uspješno nastojali riješiti problem analize spojeva u tragovima u kompleksnom uzorku.

## STRUKTURA, SVOJSTVA I TOKSIČNOST PCB-a I OCP-a

PCB su skupina aromatskih spojeva opće kemijske formule  $C_{12}H_{10-n}Cl_n$  ( $n$  - broj klorovih atoma), a s obzirom na broj i položaj klorovih atoma na dvama benzenskim prstenima postoji 209 izomera i homologa PCB-a koji se nazivaju kongenerima i prema Međunarodnoj uniji za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union for Pure and Applied Chemistry*; IUPAC) označavaju se brojevima od 1 do 209 (kao npr. PCB-28, PCB-101...). PCB su nepolarni, lipofilni spojevi, vrlo slabo topljivi u vodi, a uvijek su rabljeni kao smjese kongenera, i to u zatvorenim sustavima kao dodaci uljima u transformatorima, kondenzatorima i vakuumskim pumpama te u otvorenim sustavima kao dodaci bojama, lakovima, voskovima, adhezivima, pesticidima itd. (6, 7). Najčešće analizirani organoklorovi pesticidi, njihovi izomeri ili metaboliti su heksaklorbenzen (HCB) kemijske bruto-formule  $C_6Cl_6$ , tri stereoizomera heksaklorcikloheksana ( $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH i  $\gamma$ -HCH) kemijske bruto-formule  $C_6H_6Cl_6$ , 1,1,1-triklor-2,2-di(4-klorfenil)etan (DDT) kemijske bruto-formule  $C_{14}H_9Cl_5$ , njegovi metaboliti 1,1-diklor-2,2-di(4-klorfenil)etan (DDD) kemijske bruto-formule  $C_{14}H_{10}Cl_4$  i 1,1-diklor-2,2-di(4-klorfenil)eten (DDE) kemijske bruto-formule  $C_{14}H_8Cl_4$ . DDD je u okoliš dospijevao kao razgradni metabolit DDT-a, ali i primjenom, jer ima insekticidna svojstva zbog čega je sintetiziran. DDE nema insekticidnih svojstava, ali je u okolišnim uvjetima vrlo postojan metabolit DDT-a. Organoklorovi pesticidi, posebice DDT, HCH i HCB, zbog svojih su izuzetnih insekticidnih i fungicidnih svojstava diljem svijeta primjenjivani dugi niz godina (8).

Zbog već navedenih svojstava, PCB i OCP ispušteni u okoliš raspodjeljuju se u svim dijelovima okoliša i među njima kruže ovisno o svojstvima spoja, sadržaju organske tvari u pojedinom dijelu okoliša i temperaturi okoliša. Zrak je dio okoliša koji ima najvažniju ulogu u raspodjeli PCB-a i OCP-a jer je atmosfera najčešće izložena unosu tih spojeva koji iz nje prelaze u tlo, sediment, bilje i vodu. Također, ti se spojevi mogu

zračnim masama prenijeti na velike udaljenosti (9). PCB i OCP se zbog svoje lipofilnosti i otpornosti na metaboličku razgradnju akumuliraju u hranidbenom lancu, a u organizam sisavaca unose se udisanjem, ingestijom ili apsorpcijom preko kože. Akumuliraju se u tkivima koja sadržavaju masti (masno tkivo, jetra), mlijeku i serumu ili se sporo metaboliziraju, da bi se na kraju samo neki od njih izlučili urinom (10, 11). Istraživanja su pokazala da organoklorovi spojevi utječu i na ljudsko zdravlje (promjene u neurološkom razvoju i neuroendokrinoj funkciji, narušena imunosna i reproduktivna funkcija), ali prema rezultatima tih studija nije sigurno da su ti poremećaji uzrokovani isključivo izloženošću određenom organoklorovu spoju jer se smjese tih spojeva nalaze u svim uzorcima iz živog i neživog dijela okoliša. Osim organoklorovih spojeva u uzorcima iz okoliša nalaze se i mnogi drugi spojevi, i zbog toga je teško dokazati specifičnu vezu između izloženosti određenom spoju i učinka. Toksični potencijal pojedinih organoklorovih spojeva je različit, ali je ukupni toksični učinak uvijek aditivan. Izloženost visokim koncentracijama u slučaju nesreća uzrokuje ozljede kože i oštećenje jetre i živčanog sustava (12).

## ANALIZA PCB-a I OCP-a U BOROVIM IGLICAMA

Postojani organski onečišćivači intenzivnije se analiziraju od 60-ih godina 20. stoljeća najprije u uzorcima humanog mlijeka, a kasnije i u ostalim uzorcima iz živog i neživog dijela okoliša. U novije se vrijeme kao pokazatelj onečišćenja nekog mjesta određuje maseni udjel organoklorovih spojeva u biljkama kako bi se procijenila izloženost okoliša i ljudi tim toksičnim spojevima. Gaggi i suradnici su 80-ih godina 20. stoljeća među prvima rabili lišće raznih biljnih vrsta, mahovinu, lišajeve i borove iglice za detekciju organoklorovih spojeva (13, 14).

Zbog kompleksnog sastava voska i velikog broja interferirajućih spojeva, analitički postupak određivanja PCB-a i OCP-a u borovim iglicama vrlo je složen. Sljedeći problem su niski maseni udjeli (red veličine  $ng\ g^{-1}$  uzorka i niže) analiziranih spojeva u borovim iglicama. Zbog navedenih problema analitički je postupak vrlo zahtjevan.

Analitički postupci određivanja poliklorbifenila i organoklorovih pesticida u borovim iglicama sastoje se od skupljanja uzorka, mljevenja svježih ili suhih iglica, ekstrakcije spojeva pogodnim otapalom,

pročišćavanja ekstrakta od interferencija te kvalitativne i kvantitativne analize.

#### Skupljanje i priprava uzoraka

Organoklorovi spojevi se zbog svojih lipofilnih svojstava akumuliraju u vosku borovih iglica koji se dijeli na intrakutikularni (u unutrašnjosti iglice) i epikutikularni vosak (na površini iglice). Epikutikularni vosak, koji se sastoji uglavnom od dugolančanih estera, poliestera i parafina, nalazi se na površini iglice i iz zraka apsorbira lipofilne tvari koje zatim polagano difundiraju u unutrašnjost iglice (15). Uzorci borovih iglica skupljaju se sa svih strana stabla na visini od otprilike 1,5 m. Iglice se ovisno o potrebama i mogućnostima mogu razdvojiti po starosti. Daljnja analiza može se provoditi na svježim ili suhim borovim iglicama, a iglice se mogu ekstrahirati pogodnim otapalom čitave (5) ili mljevene (13, 14).

#### Ekstrakcija

PCB i OCP se mogu analizirati u vanjskom ili unutrašnjem dijelu voska ili odjednom u oba dijela voska. Ako se ekstrahiraju zasebno iz dva dijela voska, tada se cijele iglice najprije ekstrahiraju s pogodnim otapalom, najčešće u aparaturi po Soxhletu ili ultrazvučnoj kupelji. Otopina se filtrira pri čemu je vanjski dio voska otopljen u filtratu, a iglice zaostale na filternom papiru nasjeckaju se i dalje ekstrahiraju (16, 17). Ako se PCB i OCP ekstrahiraju odjednom iz oba dijela voska, tada se iglice prije ekstrakcije samelju.

Diklormetan, *n*-heksan, aceton, dietil-eter, petrol-eter, *n*-pentan ili smjese tih otapala su najčešće rabljena otapala za ekstrakciju PCB-a i OCP-a iz borovih iglica, a metode ekstrakcije su:

- 1) stajanje i/ili mućkanje s pogodnim organskim otapalom (5, 18)
- 2) ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu (engl. *Soxhlet Extraction*; SOX) (19)
- 3) ultrazvučna ekstrakcija (engl. *Ultrasonic Extraction*; USE) (17)
- 4) ekstrakcija uz povišeni tlak i temperaturu (engl. *Accelerated Solvent Extraction*; ASE) (20)
- 5) ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima (engl. *Supercritical Fluid Extraction*; SFE) (21).

Ekstrakcije PCB-a i OCP-a iz borovih iglica stajanjem i/ili mućkanjem u tikvici s pogodnim organskim otapalom traju od 24 do 48 sati, no uočeno je da nakon 24 sata nema značajne promjene u količini ekstrahiranih spojeva (18).

Ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu vrlo je učestali postupak ekstrakcije organoklorovih spojeva iz

različitih matrica, pa tako i iz borovih iglica. Nedostaci tog postupka su velik volumen otapala potreban za ekstrakciju, potreba za vrlo čistim polarnim i nepolarnim organskim otapalima, dugo vrijeme ekstrakcije i nemogućnost automatizacije postupka (22).

Ultrazvučna ekstrakcija je jednostavan postupak ekstrakcije kod kojeg je posuda s uzorkom i organskim otapalom smještena u ultrazvučnu kupelj. Učinkovitost ekstrakcije ovisi o polarnosti otapala, homogenosti matrice i vremenu ekstrakcije. Ekstrahirane iglice se od organskog otapala odvajaju filtracijom uz dodatno ispiranje otapalom. Ultrazvučna ekstrakcija je relativno brza metoda, jednostavna za rad i ne zahtijeva skupe instrumente. Nedostaci tog postupka su veliki volumen otapala, moguća potreba višestruke ekstrakcije, potreba filtracije ekstrakata i nemogućnost automatizacije metode (22).

Ekstrakcija uz povišeni tlak i temperaturu je postupak kojim se skraćuje vrijeme ekstrakcije spojeva iz bioloških matrica zbog povećane topljivosti, bolje desorpcije i povećane difuzije (22). Ekstrakcije organoklorovih spojeva mogu se provoditi na temperaturama od sobne do 200 °C kako bi se ekstrakcija ubrzala te pri tlakovima od 0,3 MPa do 20 MPa kako bi se otapalo zadržalo u tekućem stanju (20).

Ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima privlači veliki interes od 1980-ih godina, uglavnom za ekstrakciju krutih uzoraka, zato što omogućuje kratka vremena ekstrakcije i minimalnu upotrebu organskih otapala. Fluid pri superkritičnim uvjetima bolje prodire u uzorak i ima veću moć otapanja analita. Najviše se rabi CO<sub>2</sub> zbog svoje niske cijene, dostupnosti, sigurnosti te pogodne kritične temperature od 31,2 °C i kritičnog tlaka od 7,4 MPa (21). Ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima primjenjivana je za ekstrakciju alkana, aromatskih ugljikovodika i fenola u zraku, pesticida, nikotina, dicikloheksilamina u tekućim matricama te herbicida, pesticida, fenola itd. u tlu i sedimentu, a prvi put je primjenjena za ekstrakciju PCB-a iz borovih iglica 2002. godine (21).

#### Pročišćavanje ekstrakta

Analitički postupak određivanja organoklorovih spojeva u borovim iglicama zahtijeva i učinkovit postupak pročišćavanja ekstrakta zbog velikog broja nepoželjnih spojeva u ekstrahiranim uzorcima. Pročišćavanje se najčešće provodi adsorpcijskom kromatografijom na polarnim sorbensima kao što su florisil, silikagel i aluminijev oksid s kojih se nepolarni analiti eluiraju s pomoću eluenta niske polarnosti.

Florisil može biti aktiviran (osušen na 100 °C do 120 °C i aktiviran 4 sata pod strujom dušika na 180 °C) ili deaktiviran (sadržava 4 % vode), a često se za pročišćavanje rabe i dvije kolone s florisilom u nizu (23). Silikagel za adsorpcijsku kromatografiju se prije upotrebe pere u diklormetanu, a zatim suši 24 sata na 180 °C. Može se rabiti i silikagel pomiješan s koncentriranom sumpornom kiselinom i/ili natrijevom lužinom. Pri uporabi aluminijskoga oksida važno ga je aktivirati dodatkom vode da bi što bolje vezao nepoželjne lipide dok analit prolazi kroz stupac.

Pročišćavanje se može provesti i s pomoću izmućkavanja koncentriranom sumpornom kiselinom ili kalijevim hidroksidom koji razgrade većinu nepoželjnih spojeva pri čemu organoklorovi spojevi zaostaju u organskoj fazi. Kako bi se iz ekstrakta još efikasnije uklonio vosak, Franich i suradnici su uz alkalnu i kiselu hidrolizu uveli i višekratno naglo hlađenje ekstrakta pri čemu se istaloži većina voska (24).

Gel-propusna kromatografija (engl. *Gel Permeation Chromatography*; GPC) koja odvaja spojeve na temelju molekulske mase još je jedan način odvajanja organoklorovih spojeva od lipida i ostalih nečistoća (20).

Daljnje odvajanje pojedinih skupina organoklorovih spojeva može se provesti na raznim kolonama punjenim silikagelom, florisilom ili aktivnim ugljenom, a u tu se svrhu rabi i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*; HPLC) (15).

#### *Kvalitativna i kvantitativna analiza*

Najviše rabljena tehnika za kvalitativnu i kvantitativnu analizu poliklorbifenila i organoklorovih pesticida u borovim iglicama je plinska kromatografija uz upotrebu detektora zahvata elektrona (engl. *Electron Capture Detector*; ECD). Detektor zahvata elektrona, najupotrebljavaniji detektor u analizi organoklorovih spojeva u borovim iglicama, osjetljiv je i selektivan za organohalogene spojeve, ne razara uzorak, a osjetljivost odziva za organoklorove spojeve raste s brojem klorovih atoma u molekuli. Odabir kolone i temperaturnog programa plinskokromatografske analize ovisi o spojevima i matrici koja se analizira, a čimbenici koji utječu na razdvajanje spojeva su: dužina i promjer kolone, vrsta i količina nepokretne faze, temperatura i tlak u koloni te linearna brzina plina nosioca. Organoklorovi pesticidi i "ukupni PCB" (ukupni sadržaj PCB-a u nekom uzorku određen prema komercijalnim smjesama, npr. Arocloru) mogu se određivati na punjenim kolonama, ali analiza

pojedinačnih kongenera PCB-a moguća je samo plinskom kromatografijom visokog razlučivanja (engl. *High Resolution Gas Chromatography*; HRGC) na kapilarnim kolonama s optimiranim temperaturnim programom. Kapilarne kolone su djelotvornije od punjenih jer zbog manjeg otpora protoku plina nosioca mogu biti znatno dulje, što omogućuje veći broj uravnoteženja između pokretne i nepokretne faze i dobivanje užih kromatografskih pikova koji se ne preklapaju. Za analizu PCB-a i OCP-a najpogodnije su nepolarne ili umjereno polarne kolone, najčešće duljine od 25 m do 60 m, a analizu je najbolje provoditi paralelno na dvije kapilarne kolone različitih polarnosti kako bi određivanje spojeva bilo što bolje i pouzdanije. Analiza pojedinačnih kongenera PCB-a uvijek se radi s pomoću kapilarnih kolona, a najčešća nepokretna faza je polifenilmetilsiloksan s 5 % fenila koja je na tržištu dostupna pod različitim komercijalnim imenima kao što su HP-5 (24), DB-5 (15), SPB-5, Rtx-5 itd. Kylin i suradnici najprije su rabili program tako da je početna temperatura kolone održavana na 50 °C dvije minute, zatim je povećavana 5 °C min<sup>-1</sup> do 300 °C te je održavana 15 minuta na 300 °C (24). Kasnije ista grupa istraživača rabi drugačiji temperaturni program: početna temperatura od 80 °C održavana je 2 minute, zatim je povećavana 10 °C min<sup>-1</sup> do 280 °C, a zatim je održavana na toj temperaturi 15 minuta (25). Temperatura injektora i detektora također se može mijenjati, pa je tako na primjer temperatura injektora 280 °C, a detektora 360 °C (25). Za kvalitativnu analizu spojeva uspoređuju se vremena zadržavanja spojeva u uzorku s vremenima zadržavanja spojeva u standardu. Moguća su dva načina uspoređivanja: jedan je određivanjem relativnog vremena zadržavanja analiziranih spojeva prema unutarnjem standardu (dodan u uzorak prije kromatografske analize), a drugi je način usporedba vremena zadržavanja spojeva u uzorku i vanjskom standardu. Kvantitativna analiza spojeva u uzorku provodi se s pomoću unutarnjeg ili vanjskog standarda usporedbom visina ili površina kromatografskih pikova analiziranih spojeva u uzorku i standardu poznate masene koncentracije.

U analizi PCB-a veliku primjenu ima i vezani sustav plinskog kromatografa i spektrometra masa (GC-MS) zbog sigurne identifikacije spojeva i selektivnosti, osjetljivosti i preciznosti analize. Različito vrijeme zadržavanja pojedinih spojeva u plinskokromatografskoj koloni omogućuje spektrometru masa da svaki spoj posebno identificira njegovim cijepanjem u karakteristične ionizirane fragmente, a zatim te fragmente detektira prema njihovu omjeru mase i

naboja ( $m/z$ ). Svaki spoj ima specifični spektar što omogućuje njegovu pouzdanu identifikaciju. U GC-MS analizi organoklorovih spojeva u borovim iglicama od tehnika ionizacije najčešće se rabe ionizacija elektronima (engl. *Electron Ionization*; EI) i negativna kemijska ionizacija (engl. *Negative Chemical Ionisation*; NCI) s metanom kao reagensom, a signal se bilježi češće tehnikom praćenja odabranih iona (engl. *Selected Ion Monitoring*; SIM) nego tehnikom potpunog bilježenja svih iona (engl. *Full-scan mode*) (18, 21, 26, 27). Granica detekcije izravno ovisi o uvjetima i vrsti instrumenta GC-MS. Spektrometrijom masa niskog razlučivanja (engl. *Low Resolution Mass Spectrometry*; LRMS) uz primjenu NCI i tehnike SIM i spektrometrijom masa visokog razlučivanja (engl. *High Resolution Mass Spectrometry*; HRMS) uz primjenu EI i tehnike SIM postižu se granice detekcije od 0,01 pg do 0,1 pg što je za jedan do dva reda veličine niže od vrijednosti koje se mogu postići tehnikom LRMS uz EI i za dva reda veličine niže od vrijednosti koje se postižu s GC/ECD (28).

Sustavi koji se također rabe u analizi organoklorovih spojeva, ali u nama dostupnoj literaturi nema podataka o njihovoj primjeni za analizu u borovim iglicama, vezani su sustav plinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (GC-MS/MS) i višedimenzionalna plinska kromatografija (engl. *Multi-dimensional Gas Chromatography*; MDGC). Odlična selektivnost postiže se tehnikom GC-MS/MS postupkom praćenja odabranih reakcija (engl. *Selected Reaction Monitoring*; SRM) gdje se prati specifična reakcija disocijacije iona određenog  $m/z$  inducirana kolizijom s atomima inertnog plina. SRM omogućava visoku selektivnost i niske granice detekcije analiziranih spojeva (27, 29). Obično se ovakvi instrumenti rabe za analizu spojeva u tragovima u kompleksnim matricama.

Problem eventualnog preklapanja pikova spojeva može se riješiti tehnikom MDGC koja mijenjanjem smjera toka pokretne faze omogućuje prevođenje koeluirajućih spojeva s prve u drugu kolonu drugačije selektivnosti ili čišćenje kolone od sastojaka koji kasno eluiraju i nisu od interesa. Uobičajeno je da je u prvoj koloni nepokretna faza nepolarna, u drugoj polarnija, a u novije se vrijeme za odvajanje kiralnih spojeva rabe kolone od kojih je prva akiralna, a druga kiralna (22, 28).

#### *Primjeri razrade analitičkog postupka*

Samo se dvije grupe istraživača, Wenzelova (17, 20, 30) i Kylinova (15, 18), kontinuirano dugi niz godina

bave razvojem metodologije analize PCB-a i OCP-a u borovim iglicama nastojeći razviti što jednostavnije i efikasnije postupke ekstrakcije i pročišćavanja ekstrakta. Wenzel i suradnici (17) su 1997. analizirali PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-138, PCB-153, HCB, DDT, DDE, DDD,  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -HCH u borovim iglicama čiji su vosak ekstrahirali kao unutarnji i vanjski vosak. Vanjski dio voska ekstrahiran je diklormetanom u ultrazvučnoj kupelji ekstrakcijom cijelih iglica, a zatim su iglice nasjeckane te je iz njih heksanom ultrazvučno ekstrahiran unutarnji dio voska. Oba su ekstrakta pročišćena adsorpcijskom kromatografijom na dvije kolone florisila s heksanom kao eluensom, a analiza je provedena sustavom GC-MS uz primjenu tehnike SIM. Ekstrakcijom spojeva iz unutrašnjeg dijela voska dobiveni su analitički povrati u rasponu od 87 % za  $\gamma$ -HCH do 96 % za PCB-153, a srednja vrijednost relativne standardne devijacije bila je 5 % do 30 %. Unutarnji standardi za računanje povrata dodani su u otapalo prije ekstrakcije spojeva iz unutrašnjeg dijela voska. Povrati spojeva ekstrahiranih iz vanjskog voska nisu računani (17). Međutim, Wenzel i suradnici zaključuju da u metodologiji treba poboljšati usporedivost postupaka odvajanja unutarnjeg i vanjskog dijela voska čime bi se i spojevi mogli točnije odrediti. Sljedeće godine, Wenzel i suradnici optimirali su uvjete ekstrakcije organoklorovih spojeva iz borovih iglica uz povišeni tlak i temperaturu (20). Vanjski dio voska s površine cijele iglice ekstrahirali su diklormetanom u ultrazvučnoj kupelji, a unutarnji dio voska heksanom iz nasjeckanih iglica uz povišeni tlak i temperaturu. U radu se ne navode povrati analitičkog postupka, a autori zaključuju da je za uzorke s onečišćenijih lokacija ekstrakcija organoklorovih spojeva uz povišeni tlak i temperaturu djelotvornija u usporedbi s ekstrakcijom u ultrazvučnoj kupelji (20). Ista grupa istraživača razradila je postupak pročišćavanja ekstrakta u jednom koraku gel-propusnom kromatografijom s ciljem da se smanje gubici analiziranih spojeva (30). Postupak ekstrakcije bio je isti kao u prethodnom radu (20), a ekstrakt je pročišćen gel-propusnom kromatografijom na koloni s nepokretnom fazom veličine pora 50 Å i tetrahidrofuranom kao pokretnom fazom. Skupljane su četiri frakcije eluata, od kojih je prva sadržavala organske komponente matrice, druga DDT, DDD, DDE i PCB, treća policikličke aromatske ugljikovodike i klorbenzene, a četvrta je bila završna frakcija. Zaključeno je da je jedan korak pročišćavanja gel-propusnom kromatografijom dovoljan i djelotvoran za određivanje policikličkih aromatskih ugljikovodika

u složenim biljnim matricama kao što su borove iglice, međutim, za poliklorbifenile i organoklorove pesticide potrebna su daljnja poboljšanja, prije svega izborom prikladnije kolone, tj. nepokretne faze (30).

Kylin i suradnici (15) ekstrahirali su spojeve iz svježih borovih iglica mućkanjem s diklormetanom, a ekstrakt pročišćavali adsorpcijskom kromatografijom na koloni punjenoj silikagelom i silikagelom sa sumpornom kiselinom te frakcioniranjem HPLC-om na koloni s aminopropilsilicijevim dioksidom kao nepokretnom fazom i heksanom kao pokretnom fazom. Analiza je provedena tehnikama GC/ECD i GC-MS, a za osam odabranih PCB-a iz smjese Aroclor 1254 analitički povrat računat prema unutarnjem standardu (PCB-189) dodanom u uzorak prije ekstrakcije bio je od 91 % do 108 % s relativnim standardnim devijacijama između 4 % i 8 % (15). Radi poboljšanja preciznosti metode, Kylin i suradnici su u nastavku istraživanja razradili postupak u kojem su epikutikularni vosak ekstrahirali diklormetanom iz cijelih svježih iglica, a potom intrakutikularni dio voska iz nasjeckanih iglica (18). Prije analize plinskom kromatografijom oba su ekstrakta pročišćena propuštanjem kroz kolonu punjenu silikagelom i silikagelom sa sumpornom kiselinom. Spojevi su s kolone eluirani diklormetanom, a zatim je eluat frakcioniran na koloni punjenoj nitrofenilsilicijevim dioksidom s heksanom kao eluensom. Skupljane su tri frakcije: prva je sadržavala heksaklorbenzen, druga poliklorbifenile i DDE, a treća ostale polarnije organoklorove pesticide. Analitički povrati spojeva bili su od 65 % do 90 % s relativnom standardnom devijacijom od 4 % do 12 %.

Posljednjih godina razvijaju se jednostavnije tehnike pripreme uzorka. Jedna od takvih je ekstrakcija fluidom pri superkričnim uvjetima koju su za praćenje PCB-a u borovim iglicama primijenili Zhu i suradnici (21). Postigli su vrlo visoke povrate spojeva od 90 % do 95 % s time da su unutarnje standarde dodali u gotovi ekstrakt čime zapravo nisu dobili pravi uvid u djelotvornost postupka ekstrakcije. Analizu su proveli sustavom GC-MS uz primjenu tehnike SIM.

Analitički postupak podliježe validaciji koja uključuje određivanje analitičkog povrata analiziranih spojeva, točnosti, preciznosti, linearnosti, granica detekcije i određivanja, selektivnosti i specifičnosti. Jednom validirani analitički postupci i dalje se provjeravaju u intralaboratorijskoj provjeri kvalitete analitičkog postupka koja se sastoji od rutinske provjere povrata ili točnosti tijekom primjene postupka te u interlaboratorijskoj provjeri kvalitete analitičkog postupka koja se sastoji od međulaboratorijske

usporedbe kriterija koje metoda mora zadovoljiti. U literaturi su dostupni podaci o validaciji postupka analize organoklorovih spojeva u uzorcima kao što su humano mlijeko i serum, dok je o validaciji postupka za analizu organoklorovih spojeva u borovim iglicama vrlo malo podataka. Podataka o intralaboratorijskoj ili interlaboratorijskoj provjeri postupaka određivanja organoklorovih spojeva u borovim iglicama u nama dostupnoj literaturi nema.

## ZAKLJUČAK

Veliki napredak analitičke kemije i razvoj instrumentnih tehnika analize omogućili su selektivniju i precizniju analizu tragova poliklorbifenila i organoklorovih pesticida u borovim iglicama koje su složen medij s puno različitih spojeva. Kapilarna plinska kromatografija omogućuje učinkovito kvalitativno i kvantitativno određivanje pojedinih kongenera PCB-a, a vezani sustavi kao što je GC-MS dobivanje velikog broja pouzdanih podataka u relativno kratkom vremenu. Problem je ekstrakcija PCB-a i OCP-a koji se u tragovima nalaze u tako složenom uzorku kao što su borove iglice i daljnje pročišćavanje ekstrakata nužno da bi se uklonile nepoželjne tvari koje interferiraju pri instrumentnoj analizi. U literaturi su opisani različiti postupci ekstrakcije i pročišćavanja, od jednostavnih do složenih, i svima se postižu relativno visoki analitički povrati spojeva. Mi na temelju svojih istraživanja ne možemo predložiti postupak koji bi istodobno bio jednostavan, brz, s malim utroškom kemikalija i visokim povratima organoklorovih spojeva iz jednostavnog razloga što uzorak složenog sastava kao što su borove iglice zahtijeva i složene postupke ekstrakcije i pročišćavanja pri čemu svaki korak bez sumnje nosi i određene gubitke.

Unatoč velikom napretku u postupcima ekstrakcije, pročišćavanja i same analize PCB-a i OCP-a u borovim iglicama tijekom dvadesetak godina koliko se takve analize provode, još uvijek postoji potreba da se razvijene metode dalje unapređuju i pojednostavniju. Također je nužno provoditi interlaboratorijske usporedbe rezultata analize kako bismo uz minimalan utrošak vremena i sredstava dobili realne i pouzdane podatke.

## Zahvala

Zahvaljujemo dr. sc. Blanki Krauthacker na nesebičnoj pažnji i sugestijama tijekom izrade ovog

rada. Rad je napisan za projekt "Organska onečišćenja u okolišu - raspodjela, interakcije, izloženost ljudi" (br. 022-0222882-2896) koji podupire Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.

## LITERATURA

1. Borlakoglu JT, Haegele KD. Comparative aspects on the bioaccumulation, metabolism and toxicity with PCBs. *Comp Biochem Physiol* 1991;3:327-38.
2. Weiss B. Pesticides as a source of developmental disabilities. *MRDD Res Rev* 1997;3:246-56.
3. Li YF, Zhulidov AV, Robarts RD, Korotova LG, Zhulidov DA, Gurtovaya TYu, Ge LP. Dichlorodiphenyltrichloroethane usage in the former Soviet Union. *Sci Total Environ* 2006;357:138-45.
4. Li YF. Global technical hexachlorocyclohexane usage and its contamination consequences in the environment: from 1948 to 1997. *Sci Total Environ* 1999;232:121-58.
5. Jensen S, Eriksson G, Kylin H. Atmospheric pollution by persistent organic compounds: monitoring with pine needles. *Chemosphere* 1992;24:229-45.
6. De Voogt P, Brinkman (I)Th. Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. (I: Kimbrough RD, Jensen AA, urednici. Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Naphtalenes, Dibenzodioxins and Related Products. Amsterdam: Elsevier; 1989. str. 3-45.
7. Danse IR, Jaeger RJ, Kava R, Kroger M, London WM, Lu FC, Maickel RP, McKetta JJ, Newell GW, Shindell S, Stare FJ, Whelan EM. Position paper of the American council on science and health: Public health concerns about environmental polychlorinated biphenyls (PCBs). *Ecotoxicol Environ Safety* 1997;38:71-84.
8. Voldner EC, Li YL. Global usage of selected persistent organochlorines. *Sci Total Environ* 1995;160/161:201-10.
9. Herceg Romanić S. Određivanje polikloriranih bifenila u lišću drveća i zraku [magistarski rad]. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 1999.
10. Tolosa I, Readman JW, Fowler SW, Villeneuve JP, Dachs J, Bayona JM, Albaiges J. PCBs in the western Mediterranean. Temporal trends and mass balance assessment. *Deep - Sea Res* 1997;44:907-28.
11. Gubala CP, Landers DH, Monetti M, Heit M, Wade T, Lasorsa B, Allen-Gil S. The rates of accumulation and chronologies of atmospherically derived pollutants in Arctic Alaska, USA. *Sci Total Environ* 1995;160/161:347-61.
12. Stark AD, Costas K, Gan Chang H, Vallet HL. Health effects of low-level exposure to polychlorinated biphenyls. *Environ Res* 1986;41:174-83.
13. Gaggi C, Bacci E, Calamari D, Fanelli R. Chlorinated hydrocarbons in plant foliage: an indication of the tropospheric contamination level. *Chemosphere* 1985;14:1673-86.
14. Bacci E, Calamari D, Gaggi C, Fanelli R, Focardi S, Morosini M. Chlorinated hydrocarbons in lichen and moss samples from the Antarctic Peninsula. *Chemosphere* 1986;15:747-54.
15. Kylin H, Grimvall E, Östman C. Environmental monitoring of polychlorinated biphenyls using pine needles as passive samplers. *Environ Sci Technol* 1994;28:1320-4.
16. Wenzel KD, Mothes B, Weißflog L, Schüürmann G. Bioavailability of airborne organochlorine xenobiotics to conifers. *Fresenius Envir Bull* 1994;3:734-9.
17. Wenzel KD, Weißflog L, Paladini E, Gantuz M, Guerreiro P, Puliafito C, Schüürmann G. Immission patterns of airborne pollutants in Argentina and Germany II. Biomonitoring of organochlorine compounds and polycyclic aromatics. *Chemosphere* 1997;34:2505-18.
18. Kylin H, Nordstrand E, Sjödin A, Jensen S. Determination of chlorinated pesticides and PCB in pine needles - improved method for the monitoring of airborne organochlorine pollutants. *Fresenius J Anal Chem* 1996;356:62-9.
19. Ockenden WA, Steinnes E, Parker C, Jones KC. Observation on persistent organic pollutants in plants: Implications for their use as passive air samplers and for POP cycling. *Environ Sci Technol* 1998;32:2721-6.
20. Wenzel KD, Hubert A, Manz M, Weißflog L, Engewald W, Schüürmann G. Accelerated solvent extraction of semivolatile organic compounds from biomonitoring samples of pine needles and mosses. *Anal Chem* 1998;70:4827-35.
21. Zhu XR, Lee HK. Monitoring polychlorinated biphenyls in pine needles using supercritical fluid extraction as a pretreatment method. *J Chromatogr A* 2002;976:393-8.
22. Ahmed FE. Analysis of polychlorinated biphenyls in food products. *Trends Anal Chem* 2003;22:170-85.
23. Wenzel KD, Weißflog L, Manz M, Hubert A, Schüürmann G. Differences in Time- Dependent Accumulation of Hydrophobic Xenobiotics in Pine Needles. *Fresenius Envir Bull* 2000;9:47-55.
24. Franich RA, Jakobsson E, Jensen S, Kroese HW, Kylin H. Development of non destructive methods for the determination of airborne pollutants in pine needles: identification of trace constituents in radiata pine epicuticular wax. *Fresenius J Anal Chem* 1993;347:337-43.
25. Hellström A, Kylin H, Strachan WMJ, Jensen S. Distribution of some organochlorine compounds in pine needles from Central and Northern Europe. *Environmental Pollution* 2004;128:29-48.
26. Niessen WMA. Analytical mass spectrometry. (I: Kellner

- R, Mermet JM, Otto M, Widmer HM, urednici. Analytical Chemistry: the authentic text to the FECS curriculum analytical chemistry. Weinheim, Berlin, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH; 1998. str. 603-39.
27. Rosenberg E. Hyphenated gas chromatographic systems. U: Kellner R, Mermet JM, Otto M, Widmer HM, urednici. Analytical Chemistry: the authentic text to the FECS curriculum analytical chemistry. Weinheim, Berlin, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH; 1998. str. 828-43.
28. Liem AKD, Theelen RMC. Dioxins: Chemical Analysis, Exposure and Risk Assessment [dissertation]. Bilthoven, The Netherlands: National Institute of Public Health and the Environment; 1997.
29. L. Zupančič-Kralj, J. Marsel, B. Kralj, D. Žigon. Application of tandem mass spectrometry to the analysis of chlorinated compounds. Analyst 1994;119:1129-34.
30. Hubert A, Popp P, Wenzel KD, Engewald W, Schüürmann G. One-step cleanup for PAH residue analysis in plant matrices using size-exclusion chromatography. Anal Bioanal Chem 2003;376:53-60.



### **Summary**

#### ANALYSIS OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS AND ORGANOCHLORINE PESTICIDES IN PINE NEEDLES

This paper presents a review of methods for the analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) in pine needles. These compounds are lipophilic, they accumulate in the biotic and abiotic part of the environment in which they are persistent, and their use is forbidden or restricted due to harmful effects on human and animal health. Pine needles are convenient for monitoring the levels of organochlorine compounds in the air because they accumulate them in wax with which they are covered. However, the presence of many other compounds makes them complex for analysis. Analytical methods for determining organochlorine compounds in pine needles include sample collection, extraction of compounds with a suitable solvent, extract clean-up from unwanted compounds and qualitative and quantitative analysis. PCBs and OCPs are present in pine needles in traces, and every part of the analytical procedure has to be as efficient and selective as possible.

**KEY WORDS:** *analytical procedure, conifers, environment, organochlorine compounds, pollution*

#### CORRESPONDING AUTHOR:

Darija Kožul, dipl. ing. kemije  
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada  
Ksaverska cesta 2, HR-10001 Zagreb  
E-mail: [dkozul@imi.hr](mailto:dkozul@imi.hr)