

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA ZUPANC

**VSEBNOST POLIKLORIRANIH BIFENILOV V RIBAH IZ REKE
IDRIJCE**

**POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN FISH FROM THE IDRIJCA
RIVER**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo sem opravljala na Odseku za znanosti o okolju Instituta Jožef Stefan. Mentorici, izr. prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, se zahvaljujem za napotke in pomoč v času diplomskega dela. Prav tako se iskreno zahvaljujem somentorici doc. dr. Ester Heath za vso strokovno pomoč, potrpežljivost, zaupanje in dragocene nasvete tekom celotnega nastajanja diplomskega dela. Za pomoč pri delu v laboratoriju in pomoč pri oblikovanju diplomske naloge se iskreno zahvaljujem Silvi Perko. Svojo zahvalo dolgujem tudi prof. dr. Mileni Horvat ter izr. prof. dr. Vekoslavi Stibilj. Za vso podporo in pomoč najlepša hvala tudi vsem domačim ter vsem zaposlenim na Odseku za znanosti o okolju na Institutu Jožef Stefan, še posebej Janiju in Tadeji.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom doc. dr. Ester Heath.

Ljubljana, december 2008

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Jana Lukač Bajalo

Član diplomske komisije: izr. prof. dr. Borut Božič

VSEBINA

1	POVZETEK	III
2	SEZNAM OKRAJŠAV	III
3	UVOD.....	1
3.1	Poliklorirani bifenili	1
3.2	Kemijska struktura polikloriranih bifenilov, dioksinov in furanov	2
3.3	Kemijske in fizikalne lastnosti PCB-jev	6
3.4	Obstojnost in mobilnost PCB-jev	7
3.5	Toksičnost in biotransformacija PCB-jev	8
3.5.1	Toksičnost PCB-jev	11
3.5.2	Biotransformacija PCB-jev	12
3.6	Bioakumulacija PCB-jev v vodnih organizmih	13
3.7	PCB-ji v Sloveniji	13
3.8	Določanje PCB-jev v bioloških vzorcih	15
3.8.1	Ekstrakcija	16
3.8.2	Čiščenje ekstrakta	19
3.8.3	Separacija in identifikacija analiziranih spojin.....	19
3.8.4	Kvantitativna analiza	21
3.8.5	Kvalitativna analiza	22
4	NAMEN DELA	23
5	MATERIALI IN METODE	24
5.1	Materiali	24
5.2	Metode dela	25
5.2.1	Vzorčenje, transport, shranjevanje	25
5.2.2	Homogenizacija in liofilizacija.....	27
5.2.3	Priprava standardnih raztopin.....	27
5.2.4	Uporaba referenčnega materiala (RM).....	28
5.2.5	Ekstrakcija vzorcev	29
5.2.6	Odstranjevanje lipidov in koncentriranje vzorcev.....	30
5.2.7	Čiščenje vzorcev na koloni.....	30
5.2.8	Instrumentalna analiza GC-ECD.....	30
6	REZULTATI IN RAZPRAVA	33
6.1	Kromatografska analiza	33
6.2	Validacija analiznega postopka	35
6.2.1	Potrditev identitete PCB kongenersov z drugo kolono	35
6.2.2	Meja zaznavnosti in meja določljivosti instrumenta ter analiznega postopka.....	37
6.2.3	Lineranost analiznega postopka.....	38
6.2.4	Izkoristek analiznega postopka za posamezne PCB kongenerse, določen na podlagi uporabe referenčnega materiala	41
6.3	Vsebnost PCB-jev v vzorcih rib iz reke Idrijce	42
7	SKLEP	45
8	LITERATURA	46
9	PRILOGA.....	50

1 POVZETEK

Buren socialni in ekonomski razvoj severne poloble v 20. stoletju sta bila posledica razvoja in širjenja različnih industrijskih dejavnosti. Uporaba vedno večjih količin različnih kemikalij je povzročila tudi vse večjo obremenjenost okolja z njimi. Pomembnosti in obsega onesnaženja okolja smo se zavedli šele v drugi polovici 20. stoletja, ko smo začeli proizvodnjo in širjenje različnih nevarnih snovi v okolje omejevati in nadzorovati.

Najbolj odmeven okoljski problem v Sloveniji je bilo onesnaženje reke Krupe s polikloriranimi bifenili, ki so jih uporabljali v tovarni kondenzatorjev Iskra Kondenzatorji v Semiču med leti 1962 in 1985. Zaradi odlaganja odpadnih olj in opreme v kraške vrtače je prišlo do hudega onesnaženja kraškega podzemlja s temi spojinami. Po neuradnih virih so poliklorirane bifenile odlagali tudi drugod po Sloveniji, med drugim tudi v okolici reke Idrijce.

V predloženem diplomskem delu smo želeli te neuradne vire preveriti, zato smo z optimiziranim analiznim postopkom za določanje vsebnosti polikloriranih bifenilov v bioloških matrikah, analizirali 14 vzorcev rib iz reke Idrijce. Za oceno vsebnosti polikloriranih bifenilov smo izbrali sedem t.i. »indikatorskih polikloriranih bifenilov« (28, 52, 101, 118, 138, 153 in 180), ki so značilni pokazatelji onesnaženja okolja z različnimi industrijskimi tehničnimi mešanici polikloriranih bifenilov in se v okoljskih vzorcih nahajajo v merljivih koncentracijah. Optimizirani postopek je zajemal ekstrakcijo po Soxhletu, odstranitev lipidov z žveplovo kislino, čiščenje na koloni polnjeni s florisilom ter kvalitativno in kvantitativno analizo na plinskem kromatografu z detektorjem na zajetje elektronov. Določili smo tudi mejo zaznavnosti/določljivosti analiznega postopka (od 0,01 do 0,04 ng g⁻¹; od 0,16 do 0,21 ng g⁻¹) za posamezne kongenerse, preračunano na suho težo vzorca. Z uporabo referenčnega materiala smo izračunali izkoristke analiznega postopka za posamezne poliklorirane bifenile, ki so bili višji od 86% za večino izbranih analitov. Iz umeritvenih krivulj smo kvantitativno določili koncentracijo izbranih polikloriranih bifenilov. Najvišja vsota koncentracij sedmih »indikatorskih polikloriranih bifenilov« v vzorcih znaša 58,4 ng g⁻¹ suhe teže, oziroma 11,9 ng g⁻¹ mokre teže vzorca. Po literaturnih podatkih sodeč, te koncentracije niso dovolj visoke, da bi lahko sklepali na večje lokalno onesnaženje idrijskega področja in v primerjavi z mejo tolerance (2 µg vseh polikloriranih bifenilov na gram jedilnega dela ribe) ameriške Administracije za hrano in zdravila, uživanje teh rib ne ogroža človeškega zdravja.

ABSTRACT

The increased rate of social and economical development in the Northern Hemisphere during the 20th century is a result of the development and spreading of different industrial activities. Increased use of different chemicals has provoked large-scale pollution of the environment. The importance and extent of environmental pollution only became known in the 2nd half of the 20th century when monitoring and limiting of both the production and dispersion of hazardous substances began.

The pollution of the River Krupa with polychlorinated biphenyls, which were used in high quantities between 1962 and 1985 by the Iskra condenser factory at Semič in Bela krajina, remains one of the most serious environmental problems in Slovenia. Heavy pollution of the Karstic underground was a consequence of the improper disposal of used oils and equipment in the Karstic region. The disposal of polychlorinated biphenyls, according to unofficial sources, has also taken place in other parts of Slovenia, one of them being the Idrijca River. The aim of this project is to examine samples from the Idrijca for possible elevated PCB contamination. The study analyzes 14 fish samples using an optimised analytical procedure to assess the amount of polychlorinated biphenyls present in biological matrices. Seven so-called “indicator polychlorinated biphenyls” (28, 52, 101, 118, 138, 153 in 180), which represent the different technical mixtures in use, were used to determine the amount of polychlorinated biphenyls in the samples. The analytical procedure was based on Soxhlet extraction, treatment of extracts with concentrated sulphuric acid followed by clean-up on florisil column. Analyte detection was carried out using gas chromatography with electron capture detector. The determined limit of detection/quantification of the procedure for selected congeners, based on dry weight, ranged from 0,01 to 0,04 ng g⁻¹ and from 0,16 to 0,21 ng g⁻¹ respectively. Extraction efficiency of the procedure was well above 86% for most of the congeners. The highest concentration of total seven “indicator polychlorinated biphenyls” was 58,4 ng g⁻¹ based on dry weight and 11,9 ng g⁻¹ based on wet weight. According to data available in the literature these concentrations are not high enough to indicate any serious pollution of the Idrijca River region. And considering the tolerance limit (2 µg for all polychlorinated biphenyls per g of edible part of the fish) recommended by the American Food and Drug Administration, we conclude that the consumption of this fish taken from the Idrijca river does not represent a danger to human health.

2 SEZNAM OKRAJŠAV

OKRAJŠAVA	POMEN OKRAJŠAVE
AhR	aril-ogljikovodikov receptor (<u>A</u> ryl <u>H</u> ydrocarbon <u>R</u> eceptor)
DDT	dikloro-dietil-trikloroetan (<u>D</u> ichloro- <u>D</u> iphenyl- <u>T</u> richloroethane)
ECD	detektor na zajetje elektronov (<u>E</u> lectron <u>C</u> apture <u>D</u> etector)
EPA	Agencija za zaščito okolja (<u>E</u> nvironmental <u>P</u> rotection <u>A</u> gency)
FDA	Agencija za hrano in zdravila (<u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dmistration)
GC	plinska kromatografija (<u>G</u> as <u>C</u> hromatography)
GC-ECD	plinska kromatografija z detektorjem na zajetje elektronov (Gas Chromatography - <u>E</u> lectron <u>C</u> apture <u>D</u> etector)
GC-MS/MS	plinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo (<u>G</u> as <u>C</u> hromatography- <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry/ <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry)
IAEA	Mednarodna agencija za atomsko energijo (<u>I</u> nternational <u>A</u> tom ⁱ c <u>E</u> nergy <u>A</u> gency)
IARC	Mednarodna agencija za raziskave raka (<u>I</u> nternational <u>A</u> gency for <u>R</u> esearch on <u>C</u> ancer)
IDL/IQL	meja zaznavnosti/določljivosti instrumenta (<u>I</u> nstrument <u>D</u> etection/ <u>Q</u> uantification <u>L</u> imit)
LOD	meja zaznavnosti (<u>L</u> imit <u>o</u> f <u>D</u> etection)
LOQ	meja določljivosti (<u>L</u> imit <u>o</u> f <u>Q</u> uantification)
MDL/MQL	meja zaznavnosti/določljivosti analiznega postopka (<u>M</u> ethod <u>D</u> etection/ <u>Q</u> uantification <u>L</u> imit)
PCBs	poliklorirani bifenili (<u>P</u> olychlorinated <u>B</u> iphenyls)
PCDDs	poliklorirani dibenzo-p-dioksini (<u>P</u> olychlorinated <u>D</u> ibenzo- <u>p</u> - <u>d</u> ioxins)
PCDFs	poliklorirani dibenzofurani (<u>P</u> olychlorinated <u>D</u> ibenzofurans)
POPs	obstojna organska onesnažila (<u>P</u> ersistent <u>O</u> rganic <u>P</u> ollutants)
RM/CRM	referenčni material (<u>r</u> eference <u>m</u> aterial)/ certificirani referenčni material (<u>c</u> ertified <u>r</u> eference <u>m</u> aterial)
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenzo -p- dioksin (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p- dioxin)
UN FAO	Organizacija Združenih narodov za hrano in kmetijstvo (<u>F</u> ood and <u>A</u> griculture <u>O</u> rganization of the <u>U</u> nited <u>N</u> ations)
TEF	toksični ekvivalentni faktor (<u>T</u> oxic <u>E</u> quivalent <u>F</u> actor)
TEQ	toksični ekvivalent (<u>T</u> oxic <u>E</u> quivalent)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization)

3 UVOD

3.1 Poliklorirani bifenili

Poliklorirani bifenili (PCB-ji) poleg insekticidov (npr. toksafen, aldrin, dikloro-difenil-trikloroetan (DDT)), dioksinov, furanov, poliaromatskih ogljikovodikov in drugih, spadajo v skupino spojin, ki jih imenujemo obstojna organska onesnažila (POPs: Persistent organic pollutants) (1). To so organske spojine z visoko strupenostjo, obstojnostjo, lipofilnostjo ter hlapnostjo in s tem povezanim prenosom na dolge razdalje (»long-range transport«). Zaradi teh lastnosti se v okolju akumulirajo in jih lahko najdemo vsepovsod, tudi na oddaljenih področjih, kot sta Arktika in Antarktika, kjer jih niso nikoli uporabljali (1).

Preden so znanstveniki ugotovili in dokazali prisotnost PCB-jev v okolju ter njihove strupene učinke, so ti veljali za čudežne spojine z izjemnimi termičnimi in drugimi ugodnimi fizikalnimi ter kemijskimi lastnostmi. Njihova proizvodnja in uporaba sta zaradi teh lastnosti hitro naraščali, predvsem v industriji transformatorskih olj in kondenzatorjev, v proizvodnji hladilnih olj in maziv, plastičnih izdelkov, protipožarnih premazov, barv, lakov, lepil, pesticidov in drugod (2, 3). Leta 1930 je ameriško podjetje Monsanto začelo proizvajati tehnično mešanico PCB-jev, Aroclor. Kmalu so se na tržišču pojavile tudi druge tehnične mešanice, kot sta Clophen in Pyralen, ki se med seboj razlikujejo po vsebnosti posameznih PCB-jev, oziroma vsebnosti klorovih atomov v zmesi (2). Šele leta 1966 je švedski znanstvenik Sören Jensen pri analizi akumulacije dikloro-difenil-trikloroetana v naravi odkril velike količine neznanih substanc, ki so jih identificirali kot PCB-je (4). Kasneje so ugotovili njihove škodljive učinke in njihovo uporabo ter proizvodnjo leta 1977 v Severni Ameriki ukinili (5).

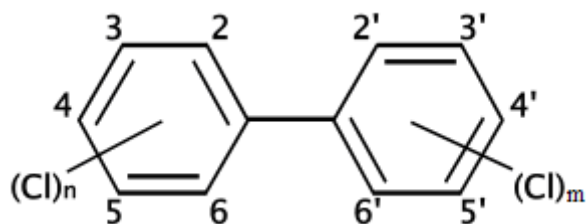
Na mnogih področjih sveta veljajo PCB-ji, predvsem zaradi neprevidnega odlaganja izrabljene električne opreme in neuporabljenih, oziroma izrabljenih PCB industrijskih mešanic, za glavno onesnažilo okolja (5). Njihovo obstojnost v okolju in akumulacijo v sedimentih, zemlji in bioloških matrikah lahko primerjamo z drugimi organokloriranimi spojinami. Zaradi hlapnosti, oz. tvorbe aerosolov z delci v zraku in posledičnega potovanja

z zračnimi tokovi, so se razširili po celem svetu (5, 6) in bodo, zaradi kroženja med zrakom, zemljo in vodo, v okolju prisotni še v prihodnjih desetletjih (5).

Da bi se izognili zapletenemu označevanju s strukturnimi ali kemijskimi formulami, sta Ballschmitter in Zell leta 1980 poimenovala posamezne PCB-je s številkami od 1 – 209 (7). V Preglednici I so navede možne PCB položajne izomere ali kongenersi (molekule, ki se med seboj razlikujejo glede na število klorovih atomov in vezavno mesto Cl v molekuli PCB). Posebej so označeni »mono- orto« PCB-ji (■), »ne-orto« PCB-ji (▨), ki so med najbolj strupenimi med vsemi 209 kongenersi ter »indikatorski PCB-ji« (▩), ki jih običajno uporabljamo kot pokazatelje onesnaženosti s PCB-ji.

3.2 Kemijska struktura polikloriranih bifeniлов, dioksinov in furanov

PCB-je sintetiziramo s segrevanjem benzena pri visoki temperaturi (do 750 °C) ob prisotnosti klora in katalizatorja. Segrevanje benzena pri visokih temperaturah povzroči prekinitev vezi med ogljikom in vodikom in tvorbo bifeniłne strukture. Ko bifenił reagira s Cl₂ (katalizator FeCl₃), se nekateri vodikovi atomi zamenjajo s klorovimi, kar vodi do nastanka polikloriranih bifeniлов. Stopnja kloriranja je odvisna od števila klorovih atomov, ki vstopajo v reakcijo in časa trajanja reakcije (5). Slika 1 prikazuje splošno formulo bifeniłne strukture. Na oštevilčena mesta se lahko veže po en klorov atom.



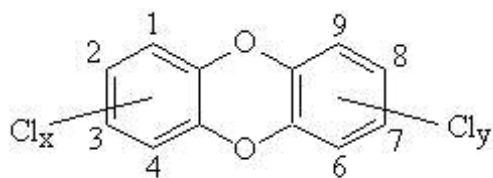
Slika 1: Splošna formula PCB-jev, kjer m in n pomenita število klorovih atomov

Preglednica I: Sistematično oštevilčenje PCB-jev (številka: oznaka posameznega PCB-ja, struktura: številke označujejo mesta na bifenilnem obroču, na katera je vezan klor)

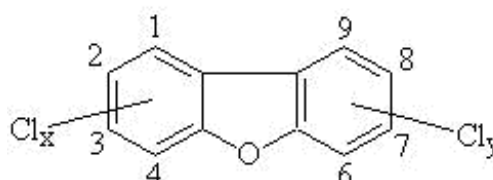
št.	struktura	št.	struktura	št.	struktura	št.	struktura
	monoklorobifenili		tetraklorobifenili		pentaklorobifenili		heksaklorobifenili
1	2	53	2,2',5,6'	107	2,3,3',4',5	161	2,3,3',4,5',6
2	3	54	2,2',6,6'	108	2,3,3',4,5'	162	2,3,3',4',5,5'
3	4	55	2,3,3',4	109	2,3,3',4,6	163	2,3,3',4',5,6
	diklorobifenili	56	2,3,3',4'	110	2,3,3',4',6	164	2,3,3',4',5',6
4	2,2'	57	2,3,3',5	111	2,3,3',5,5'	165	2,3,3',5,5',6
5	2,3	58	2,3,3',5'	112	2,3,3',5,6	166	2,3,4,4',5,6
6	2,3'	59	2,3,3',6	113	2,3,3',5',6	167	2,3',4,4',5,5'
7	2,4	60	2,3,4,4'	114	2,3,4,4',5	168	2,3',4,4',5',6
8	2,4'	61	2,3,4,5	115	2,3,4,4',6	169	3,3',4,4',5,5'
9	2,5	62	2,3,4,6	116	2,3,4,5,6		
10	2,6	63	2,3,4',5	117	2,3,4',5,6	170	heptaklorobifenili
11	3,3'	64	2,3,4',6	118	2,3',4,4',5	171	2,2',3,3',4,4',5
12	3,4	65	2,3,4,5	119	2,3',4,4',6	172	2,2',3,3',4,5,5'
13	3,4'	66	2,3',4,4'	120	2,3',4,5,5'	173	2,2',3,3',4,5,6
14	3,5	67	2,3',4,5	121	2,3',4,5',6	174	2,2',3,3',4,5,6'
15	4,4'	68	2,3',4,5'	122	2',3,3',4,5	175	2,2',3,3',4,5',6
	triklorobifenili	69	2,3',4,6	123	2',3,4,4',5	176	2,2',3,3',4,6,6'
16	2,2',3	70	2,3',4',5	124	2',3,4,5,5'	177	2,2',3,3',4',5,6
17	2,2',4	71	2,3',4',6	125	2',3,4,5,6'	178	2,2',3,3',5,5',6
18	2,2',5	72	2,3',5,5'	126	3,3',4,4',5	179	2,2',3,3',5,5',6'
19	2,2',6	73	2,3',5,6	127	3,3',4,5,5'	180	2,2',3,4,4',5,5'
20	2,3,3'	74	2,4,4',5		heksaklorobifenili	181	2,2',3,4,4',5,6
21	2,3,4	75	2,4,4',6	128	2,2',3,3',4,4'	182	2,2',3,4,4',5,6'
22	2,3,4'	76	2',3,4,5	129	2,2',3,3',4,5	183	2,2',3,4,4',5',6
23	2,3,5	77	3,3',4,4'	130	2,2',3,3',4,5'	184	2,2',3,4,4',6,6'
24	2,3,6	78	3,3',4,5	131	2,2',3,3',4,6	185	2,2',3,4,5,5',6
25	2,3',4	79	3,3',4,5'	132	2,2',3,3',4,6'	186	2,2',3,4,5,6,6'
26	2,3',5	80	3,3',5,5'	133	2,2',3,3',5,5'	187	2,2',3,4',5,5',6
27	2,3',6	81	3,4,4',5	134	2,2',3,3',5,6	188	2,2',3,4',5,6,6'
28	2,4,4'		pentaklorobifenili	135	2,2',3,3',5,6'	189	2,3,3',4,4',5,5'
29	2,4,5	82	2,2',3,3',4	136	2,2',3,3',6,6'	190	2,3,3',4,4',5,6
30	2,4,6	83	2,2',3,3',5	137	2,2',3,4,4',5	191	2,3,3',4,4',5',6
31	2,4,5'	84	2,2',3,3',6	138	2,2',3,4,4',5'	192	2,3,3',4,5,5',6
32	2,4',6	85	2,2',3,4,4'	139	2,2',3,4,4',6	193	2,3,3',4',5,5',6
33	2',3,4	86	2,2',3,4,5	140	2,2',3,4,4',6'		oktaklorobifenili
34	2',3,5	87	2,2',3,4,5'	141	2,2',3,4,5,5'	194	2,2',3,3',4,4',5,5'
35	3,3',4	88	2,2',3,4,6	142	2,2',3,4,5,6	195	2,2',3,3',4,4',5,6
36	3,3',5	89	2,2',3,4,6'	143	2,2',3,4,5,6'	196	2,2',3,3',4,4',5',6
37	3,4,4'	90	2,2',3,4',5	144	2,2',3,4,5',6	197	2,2',3,3',4,4',6,6'
38	3,4,5	91	2,2',3,4',6	145	2,2',3,4,6,6'	198	2,2',3,3',4,5,5',6
39	3,4',5	92	2,2',3,5,5'	146	2,2',3,4,5,5'	199	2,2',3,3',4,5,6,6'
	tetraklorobifenili	93	2,2',3,5,6	147	2,2',3,4',5,6	200	2,2',3,3',4,5',6,6'
40	2,2',3,3'	94	2,2',3,5,6'	148	2,2',3,4',5,6'	201	2,2',3,3',4',5,5',6
41	2,2',3,4	95	2,2',3,5',6	149	2,2',3,4',5',6	202	2,2',3,3',5,5',6,6'
42	2,2',3,4'	96	2,2',3,6,6'	150	2,2',3,4',6,6'	203	2,2',3,4,4',5,5',6
43	2,2',3,5	97	2,2',3',4,5	151	2,2',3,5,5',6	204	2,2',3,4,4',5,6,6'
44	2,2',3,5'	98	2,2',3',4,6	152	2,2',3,5,6,6'	205	2,3,3',4,4',5,5',6
45	2,2',3,6	99	2,2',4,4',5	153	2,2',4,4',5,5'		nonaklorobifenili
46	2,2',3,6'	100	2,2',4,4',6	154	2,2',4,4',5,6'	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6
46	2,2',4,4'	101	2,2',4,5,5'	155	2,2',4,4',6,6'	207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'
48	2,2',4,5	102	2,2',4,5,6'	156	2,3,3',4,4',5	208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'
49	2,2',4,5'	103	2,2',4,5',6	157	2,3,3',4,4',5'		dekaklorobifenil
50	2,2',4,6	104	2,2',4,6,6'	158	2,3,3',4,4',6	209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'
51	2,2',4,6'	105	2,3,3',4,4'	159	2,3,3',4,5,5'		
52	2,2',5,5'	106	2,3,3',4,5	160	2,3,3',4,5,6		

Strukture PCB-jev so lahko planarne ali neplanarne. Med PCB-je s planarno strukturo spadajo ne-orto in mono-orto PCB-ji, ki so označeni v Preglednici 1. Ne-orto in mono-orto PCB-ji imajo v svoji strukturi 4 ali več klorovih atomov, vendar pri ne-orto PCB-jih na orto mestih bifenilne strukture (2, 2', 6, 6') ni klorovih atomov, pri mono-orto PCB-jih pa je na enem od mest 2, 2', 6 ali 6' en klorov atom (3). 12 PCB-jev s planarno strukturo ima, po vezavi na aril-ogljikovodikov receptor (AhR) v sesalskih celicah, enak mehanizem delovanja in enake učinke kot jih imata skupini spojin imenovani dioksini in furani, zato jih imenujemo dioksinom podobni PCB-ji. Med 209 PCB kongenersi so dioksinom podobni najbolj strupeni (3).

Dioksine imenujemo skupino spojin s kemijskim imenom poliklorirani dibenzo-p-dioksini (PCDD-ji, Slika 2a). Glede na število in položaj klorovih atomov v strukturi poznamo 75 položajnih izomer. Po strukturi so sorodni polikloriranim dibenzofuranom, oziroma furanom (PCDF-jev, Slika 2b), ki imajo 135 položajnih izomerov. Obe skupini zajemata triciklične spojine z dvema aromatskima obročema v strukturi, povezanima s šestčlenskim, (Slika 2a) oziroma petčlenskim (Slika 2b) heterogenim obročem. Poleg strukturne podobnosti, imata skupini spojin tudi podobne kemijske lastnosti (8). Slika 2 prikazuje splošni formuli PCDD-jev (a) in PCDF-jev (b).



(a)



(b)

Slika 2: Splošni strukturni formuli PCDD-jev (a) in PCDF-jev (b), kjer x in y pomenita število klorovih atomov

Dioksini in furani se, tako kot PCB-ji, v okolju prenašajo z zračnimi tokovi. Na odloženih mestih se lahko vežejo na delce zemlje in posledično akumulirajo v prehranjevalni verigi ter tako predstavljajo nevarnost za vse organizme, vključno s človekom (8).

17 med 75 dioksini ima klorove atome vezane na mestih 2,3,7- ali 8- in veljajo za najbolj strupene (8). Najbolj toksičen med njimi je 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD), zato je bila tudi večina toksikoloških študij opravljenih na tej molekuli (3, 8). Mednarodna agencija za raziskavo raka (IARC) ga obravnava kot kancerogeno spojino za človeka (9). Njegova toksičnost je razvidna iz meje priporočljivega dnevnega vnosa (TDI) za odraslega človeka, ki ga določa Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) in se giblje od 1 do 4 pg kg⁻¹ telesne teže na dan (9). Testi, ki so jih s TCDD-jem izvedli na laboratorijskih živalih, so pokazali predvsem učinke na endokrini sistem, s spremembo delovanja večih hormonskih sistemov, ter učinke na reprodukcijski sistem (8, 9). Pri samicah rhesus opic povzroča TCDD v nizkih koncentracijah, tekom daljšega obdobja tudi endometriozo, simptom, kjer celice endometrija, poleg maternične votline, rastejo še na drugih mestih (8, 9). TDI so določili predvsem na podlagi tega simptoma. Glavni ne – kancerogeni učinki, ki jih dolgotrajna izpostavljenost TCDD-ju povzroči na ljudeh so klorakne, začasno povišanje jetrnih encimov, supresija imunskega sistema, učinki na reproduktivni in kardiovaskularni sistem, spremembe vedenjskih vzorcev (8) ter povečan nivo tveganja za razvoj sladkorne bolezni (9).

Večino organskih onesnažil iz okolja, kot so npr. PCB-ji, sintetiziramo zaradi njihove komercialne uporabe. PCDD-jev in PCDF-jev pa ne proizvajamo namerno. Na splošno se PCDD-ji in PCDF-ji tvorijo kot stranski produkti pri proizvodnji kloriranih spojin ter pri sežiganju odpadkov, ki vsebujejo klorirane spojine (kot npr. PCB-je), pri temperaturah nižjih od 1200 °C in v prisotnosti kisika (10). Skoraj vse originalne mešanice PCB-jev so kontaminirane s PCDF-ji v nizkih koncentracijah. Njihove koncentracije v PCB oljih, ki se npr. uporabljajo kot hladilne tekočine, se lahko ob prisotnosti kisika povečajo, zaradi segrevanja olj med uporabo (5).

Najučinkovitejša metoda za uničenje organoklorovih odpadkov je njihovo sežiganje v posebnih sežigalnicah, ki dosegajo temperature sežiga nad 1200 °C. Pod temi pogoji in v prisotnosti kisika, se PCB-ji skoraj popolnoma pretvorijo v CO₂, HCl, H₂O in manjše

količine Cl₂, hkrati pa se pri tej temperaturi uničijo tudi neželeni stranski produkti, kot so PCDD-ji in PCDF-ji (5). Odpadke, ki vsebujejo manjše količine organoklorovih spojin (PCB-jev) lahko uničimo tudi s kemijsko dekontaminacijo, kjer klorove atome po reakciji z Na ali K odstranimo iz molekul PCB-jev kot neškodljiva NaCl in KCl. Zemljo in sedimente, kontaminirane s PCB-ji, pa lahko dekontaminiramo z mešanico KOH in polietilen glikola. Pri tovrstni dekontaminaciji klorove atome v PCB molekuli zamenja alkoksidni ion (RO⁻), kar pripelje do nastanka polietrov, ki so manj toksični, vendar bolj vodotopni kot izhodne spojine (5).

3.3 Kemijske in fizikalne lastnosti PCB-jev

PCB-ji so spojine z lipofilnimi lastnostmi, slabo topne v vodi ter dobro topne v hidrofobnih medijih, kot so maščobe in olja ($\log K_{ov} > 4$) (11). Na splošno se topnost v vodi zmanjšuje z večanjem števila klorovih atomov in je tako odvisna od molekulske mase. Tako kot topnost v vodi, je tudi koeficient porazdelitve med oktanolom in vodo (K_{ov}) odvisen od stopnje kloriranja ter lege substituentov (12). K_{ov} se podaja z enačbo:

$$K_{ov} = c_o \cdot c_v^{-1} \quad (\text{enačba 1})$$

kjer c_o predstavlja ravnotežno koncentracijo neke snovi (npr. PCB-jev) v n-oktanolu (g mL^{-1}) in c_v ravnotežno koncentracijo izbrane spojine v vodi (g mL^{-1}).

Splošno velja, da imajo PCB-ji z večjo vsebnostjo klorovih atomov večji K_{ov} . Iz tega sledi, da večje število klorovih atomov pomeni večjo topnost v n-oktanolu in večjo lipofilnost PCB kongenersa ter posledično bioakumulacijo v biološkem materialu. Načeloma parni tlak z večanjem molekulske mase pada, narašča pa s stopnjo kloriranja na orto mestih v bifenilni strukturi (12). Parni tlak se podaja z enačbo:

$$p = H \cdot S \quad (\text{enačba 2})$$

kjer S predstavlja topnost (mol L^{-1}), H pa Henryevo konstanto ($\text{Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$).

PCB-ji so kemično in termično zelo stabilne ter negorljive spojine. Zaradi njihove stabilnosti, odpornosti na hidrolizo in oksidacijske ter redukcijske procese so zelo primerni

za uporabo v različnih vejah industrije (6, 11). V Preglednici II prikazujem vse zgoraj našete fizikalne lastnosti PCB-jev.

Preglednica II: Fizikalne lastnosti PCB-jev v odvisnosti od števila klorovih atomov (11)

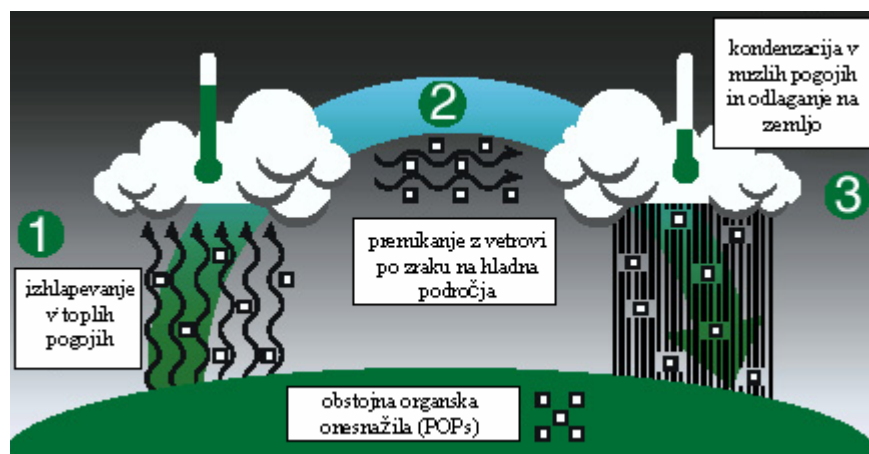
Število klorovih atomov	Topnost v vodi / ng L ⁻¹	Parni tlak pri 20°C / Pa	log K _{ov}
1	1,3 10 ³ – 7,0 10 ³	2,2 10 ³ – 9,2 10 ²	4,6 – 4,7
2	0,6 10 ² – 7,9 10 ²	3,7 10 ² – 7,5 10	5,2 – 5,3
3	0,1 10 ² – 6,4 10 ²	1,1 10 ² – 1,3 10	5,7 – 6,1
4	0,2 10 ² – 1,7 10 ²	1,8 - 4	5,9 – 6,7
5	4,5 - 12	5,3 – 0,8	6,4 – 7,5
6	0,4 – 0,9	1,9 – 0,2	6,4 – 7,6
7	0,5	0,5 – 4,8 10 ²	7,0 – 7,7
8	0,2 – 0,3	7,8 10 ² – 9,0 10 ³	7,0 – 7,6
9	0,1	2,3 10 ² – 1,1 10 ²	7,7 – 7,9
10	0,02	5,6 10 ³	8,4

3.4 Obstojnost in mobilnost PCB-jev

Obstojna organska onesnažila, med njimi PCB-ji, se po svetu širijo s prenosom, ki posnema skakanje kobilice (»grasshopper effect«) (Slika 3). Pri višjih temperaturah organska onesnažila izhlapijo ter se adsorbirajo na delce v atmosferi. Tako vezana lahko prepotujejo velike razdalje, dokler ne pridejo na območja nižjih temperatur, kjer se ponovno odložijo. Proces se ponovi, ko se temperatura znova zviša, kar povzroči, da PCB-ji ponovno izhlapijo in nadaljujejo pot (13).

Kljub lokalni uporabi in kasnejši prepovedi proizvodnje in uporabe v razvitih delih sveta, je onesnaženje s PCB-ji globalno. Njihovo prisotnost so določili v vodnih vzorcih iz Severnega morja, Južnega Pacifika, Indijskega oceana ter v morjih okoli Arktike in Antarktike, daleč od izvora onesnaževanja, kjer zaradi nizkih temperatur tudi ostanejo (najbolj furani, dioksini in PCB-ji) (14). Schmidt in sodelavci (15) so dokazali prisotnost PCB-jev in drugih POPs tudi v visoko ležečih jezerih v Švici. Ker ta jezera nimajo neposrednega dotoka vode, so ta onesnažila lahko vanje prišla samo preko zgoraj

opisanega atmosferskega prenosa. Ribe, ki v teh jezerih živijo, so odličen indikator dolgoročnega bioakumuliranja POPs. Rezultati analiz rib iz sedmih alpskih jezer, ležečih na nadmorski višini med 2026 in 2637 m v jugovzhodni Švici, so pokazali prisotnost več obstojnih organskih onesnažil v njih, med drugim PCB-jev, DDT-ja, PCDD-jev in PCDF-jev (15).



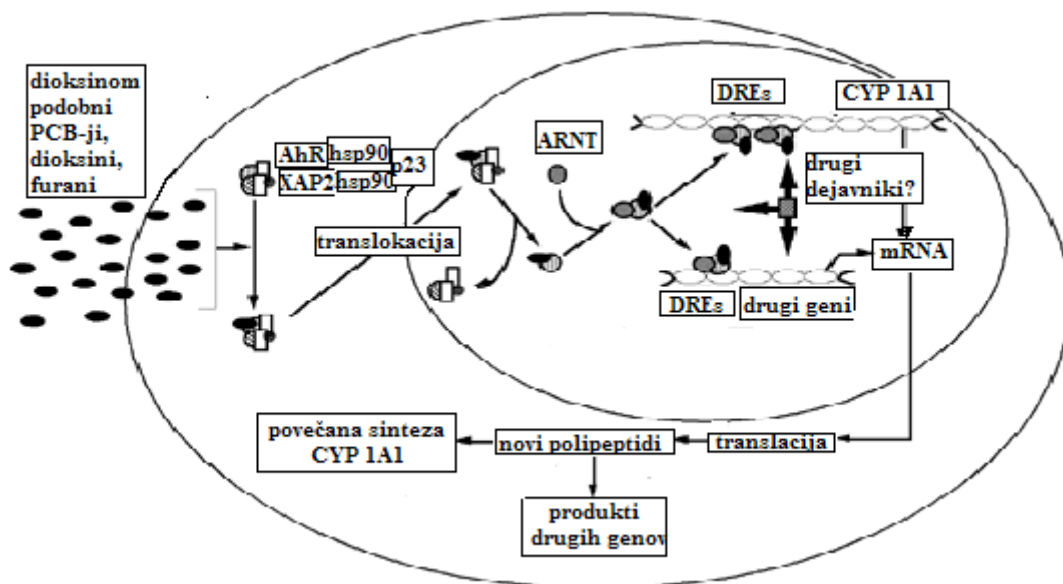
Slika 3: Na sliki je prikazano prenašanje POPs po svetu s prenosom, ki posnema skakanje kobilice (16)

3.5 Toksičnost in biotransformacija PCB-jev

Leta 1968 je na Japonskem prišlo do nenamerne kontaminacije riževega olja s PCB olji, ki so jih v hladilnem sistemu uporabljali kot tekočine za prenos toplote (17). Na tisoče izpostavljenih ljudi je trpelo za boleznijo, ki so jo poimenovali »Yu-sho«. Značilni simptomi bolezni so klorakne, pigmentacija kože ter abdominalne bolečine (4). Na osnovi tega dogodka so znanstveniki dobili potrdilo o škodljivosti PCB-jev za človeka (17). Kasneje so ugotovili, da so PCB olja vsebovala večje količine PCDF-jev, ki bi lahko bili odgovorni za del opaženih toksičnih učinkov (18). Leta 1979 se je podobna nesreča zgodila na Tajvanu (17).

Za ocenjevanje toksičnosti spojin, kot so PCDD-ji, PCDF-ji in PCB-ji, pogosto uporabljamo biomarkerje. To so molekularni markerji bioloških učinkov, ki jih različne mešanice spojin povzročijo v organizmih. Indukcija ali povečana sinteza biotransformacijskega encima citokrom P-450 1A (CYP1A) je specifičen biomarker, saj je

njegova indukcija izključno posledica izpostavljenosti organskim onesnažilom (19). Indukcija je posledica vezave dioksinov, furanov in dioksinom podobnih PCB-jev na AhR (aril-ogljikovodikov receptor), ki sodi v družino transkripcijskih faktorjev in se nahaja v citosolu celic sesalcev. Zaradi svoje velikosti in oblike se zelo dobro prilegajo na vezavno mesto na receptorju. Po vezavi na receptor, kompleks protein-spojina potuje v jedro celice, kjer se veže na DNK (deoksiribonukleinska kislina) ter sproži spremembe v transkripciji različnih genov. Najpogosteje so to geni, ki nosijo zapise za biotransformacijske encime, kot so npr. citokrom P-450 1A, citokrom P-450 1B in glukuronil transferaza ter geni, ki sodelujejo pri regulaciji rasti celic (8, 20). Slika 4 prikazuje posledice vezave dioksinov, furanov in dioksinom podobnih PCB-jev na AhR.



Slika 4: Shematski prikaz vezave dioksinov, furanov in dioksinom podobnih PCB-jev na AhR (AhR: aril-ogljikovodikov receptor; ARNT: jedrni transporter za AhR; CYP 1A1: gen, ki nosi zapis za encim citokrom P450-1A1; DRE: mesto na DNK kamor se veže kompleks dioksin-AhR; hsp90: »heat shock« protein (protein toplotnega šoka); p23: 23 kDa dolg protein; XAP2: »hepatitis B virus X-associated protein 2«) (21)

Sposobnost vzbujanja encimov lahko uporabimo za razvrščanje spojin glede na toksičnost. Pri tem si pomagamo s toksičnimi ekvivalentnimi faktorji (TEF), ki predstavljajo vzbujevalne aktivnosti posameznih spojin in so določeni samo za nekatere spojine, kot so

npr. PCDD-ji, PCDF-ji in dioksinom podobni PCB-ji. Kot najbolj toksičen predstavnik dioksinov ima TCDD (2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin) predpisano TEF vrednost 1, TEF vrednosti ostalih spojin, pa so določene relativno na to vrednost. Skupni toksični ekvivalent (TEQ) mešanice različnih spojin je vsota produktov koncentracij posameznih spojin in njim pripadajočega toksičnega ekvivalentnega faktorja (8, 11, 22) in se podaja z enačbo:

$$\text{TEQ} = (\text{PCB}_i \cdot \text{TEF}_i)_n, \quad (\text{enačba 3})$$

kjer sta PCB_i koncentracija določenega PCB kongenersa, TEF_i njej ustrežni toksični ekvivalentni faktor, n pa število različnih kongenersov v mešanici, ki vzbujajo citokrom P-450 encimski sistem. V Preglednici III so zbrane nekatere TEF vrednosti dioksinov, furanov in dioksinom podobnih PCB-jev.

Preglednica III: TEF vrednosti nekaterih dioksinov, furanov in vseh dioksinom podobnih PCB-jev določene s strani WHO 1997

RAZLIČNE SPOJINE	TEF VREDNOSTI
PCDD-ji / PCDF-ji	
2,3,7,8 - TCDD	1
2,3,7,8 - TCDF	0,1
ne- orto dioksinom podobni PCB-ji	
3,3',4,4' – TCB (PCB 77)	0,0001
3,4,4',5 – TeCB (PCB 81)	0,0001
3,3',4,4',5 – PeCB (PCB 126)	0,1
3,3',4,4',5,5' – HxCB (PCB 169)	0,01
mono- orto dioksinom podobni PCB-ji	
2,3,3',4,4' – PeCB (PCB 105)	0,0001
2,3,4,4',5 – PeCB (PCB 114)	0,0005
2,3',4,4',5 – PeCB (PCB 118)	0,0001
2',3,4,4',5 – PeCB (PCB 123)	0,0001
2,3,3',4,4',5 – HxCB (PCB 156)	0,0005
2,3,3',4,4',5' – HxCB (PCB 157)	0,0005
2,3',4,4',5,5' – HxCB (PCB 167)	0,00001
2,3,3',4,4',5,5' – HpCB (PCB 189)	0,0001

3.5.1 Toksičnost PCB-jev

PCB-jem smo lahko izpostavljeni zaradi uhajanja PCB olj iz transformatorjev in druge električne opreme na odlagališčih, kot tudi zaradi zaužitja vode ali hrane kontaminirane s PCB-ji (npr. ribe). Zaradi kronične izpostavljenosti je do zastrupitve s PCB-ji prišlo predvsem med delavci v objektih, v katerih so PCB-je proizvajali ali uporabljali. Pri kronični izpostavitvi je izbruh simptomov (klorakne ter povišana koncentracija jetrnih transaminaz), običajno zakasnen. Zaradi velike verjetnosti njihovega kancerogenega delovanja na človeka in njihove kontaminacije okolja, je ameriška Agencija za zaščito okolja (EPA), leta 1977 uporabo in proizvodnjo PCB-jev prepovedala (23).

Toksični odmerek

PCB-ji se po absorpciji (dobro se absorbirajo preko kože, dihalnega sistema in prebavnega trakta) prerazporedijo v maščobna tkiva. Pri koncentraciji $0,1 \text{ mg m}^{-3}$ v zraku PCB-ji kožo le delno dražijo, pri koncentraciji 10 mg m^{-3} , pa se draženje kože močno poveča. Maksimalne dovoljene koncentracije (za 8 urni delovni čas) PCB-jev v zraku v objektih, v katerih se ti uporabljajo, so $0,5 \text{ mg m}^{-3}$ za PCB-je, ki vsebujejo 54 % klorovih atomov ter 1 mg m^{-3} za PCB-je, ki vsebujejo 42 % klorovih atomov. Koncentracija PCB-jev v zraku, ki predstavlja trenutno nevarnost za življenje in zdravje, je za oba tipa PCB-jev 5 mg m^{-3} (23).

Klinični znaki zastrupitve

Simptomi akutne zastrupitve s PCB-ji so draženje kože, ustne in očne sluznice ter sluznice grla. Simptom kronične zastrupitve s PCB-ji, ki se pojavi šele 6 tednov ali celo več po izpostavitvi, so klorakne. To so cistične, aknam podobne tvorbe, ki nastanejo predvsem na vratu, pod pazduho in na zgornjem delu hrbta. Lahko se pojavijo tudi pigmentacija kože, porfirija (motnje v metabolizmu porfirina) ter povišane koncentracije jetrnih aminotransferaz (23).

Epidemiološke študije kažejo tudi povezavo med izpostavljenostjo PCB-jem ter spremenjenimi vedenjskimi vzorci pri novorojenčkih in otrocih. Ostali učinki vključujejo zmanjšano telesno težo novorojenčkov ter učinke na imunski sistem dojenčkov, kar je posledica prenosa PCB-jev na otroka preko placente ali pri dojenju, predvsem pri materah,

ki imajo v maščobnem tkivu visoke koncentracije PCB-jev. Dokazano je tudi, da PCB-ji povzročajo spremenjeno delovanje estrogena pri novorojenčkih moškega spola (23).

Zdravljenje

Ker specifičnih antidotov pri akutni zastrupitvi s PCB-ji ni, so prvi ukrepi pri zastrupitvi, takojšnje zdravljenje morebitnega bronhospazma ter nadziranje povišanih koncentracij jetrnih encimov, kloraken, nespecifičnih nevroloških simptomov in simptomov na očeh ter v gastrointestinalnem traktu (23). V primeru zastrupitve zaradi vdihavanja PCB-jev, je žrtev potrebno umakniti iz kontaminiranega območja in ji, če je mogoče, nuditi vdihavanje kisika. Pri zastrupitvi preko oči in kože je potrebno kontaminirana oblačila in izpostavljene dele kože oprati z vodo in milom. Oči je potrebno izpirati z velikimi količinami mlačne vode. Pri peroralni zastrupitvi pomaga zaužitje aktivnega oglja. Če je bilo aktivno oglje pravočasno zaužito, izpiranje želodca pri vnosu majhnih količin PCB-jev ni potrebno (23).

V primeru kronične zastrupitve so toksični učinki PCB-jev ponavadi posledica njihovega kopičenja v telesu tekom daljšega obdobja in ne enkratnega vnosa. Zaradi njihove lipofilne narave, odpornosti višje kloriranih PCB-jev na metabolno razgradnjo in s tem počasnega izločanja se v telesu nalagajo (biološka akumulacija) predvsem v maščobnem tkivu. Po določenem času presežejo za naš organizem še sprejemljive količine, kar vodi do kronične zastrupitve.

3.5.2 Biotransformacija PCB-jev

Biotransformacija ksenobiotikov v telesu je del razstrupljevalnega procesa, pri katerem se tvorijo bolj topni hidroksi ali polihidroksi derivati, ki se lahko po konjugaciji, kot npr. sulfati ali glukuronidi, izločijo iz telesa. Nižje klorirani (di- in tri-kloro) PCB kongenersi se lahko metabolizirajo tako v vodnih kot tudi kopenskih organizmih. Medtem ko se nekateri metaboliti izločijo iz telesa kot vodotopni konjugati, se ostali v telesu prerazporedijo in akumulirajo v različnih tkivih, predvsem maščobah (24). Biotransformacija PCB-jev poteka v glavnem v jetrih s citokrom P-450 encimi. Najlažje se biotransformirajo PCB-ji, ki imajo na enem fenilnem obroču mesti orto/meta oziroma meta/para paroma nesubstituirani. Glavna skupina metabolitov so hidroksi, metilsulfoksid in metilsulfon derivati (MeSO₂ - PCB-ji). Ti se zadržujejo predvsem v mehkih tkivih kot so pljuča, ledvica in možgani. Hidroksilirani derivati nastanejo preko aren oksidnega intermedita,

metilsulfon derivati pa se tvorijo po poti merkapturne kisline po konjugaciji z glutationom preko metilsulfoksidnih intermediatov (24).

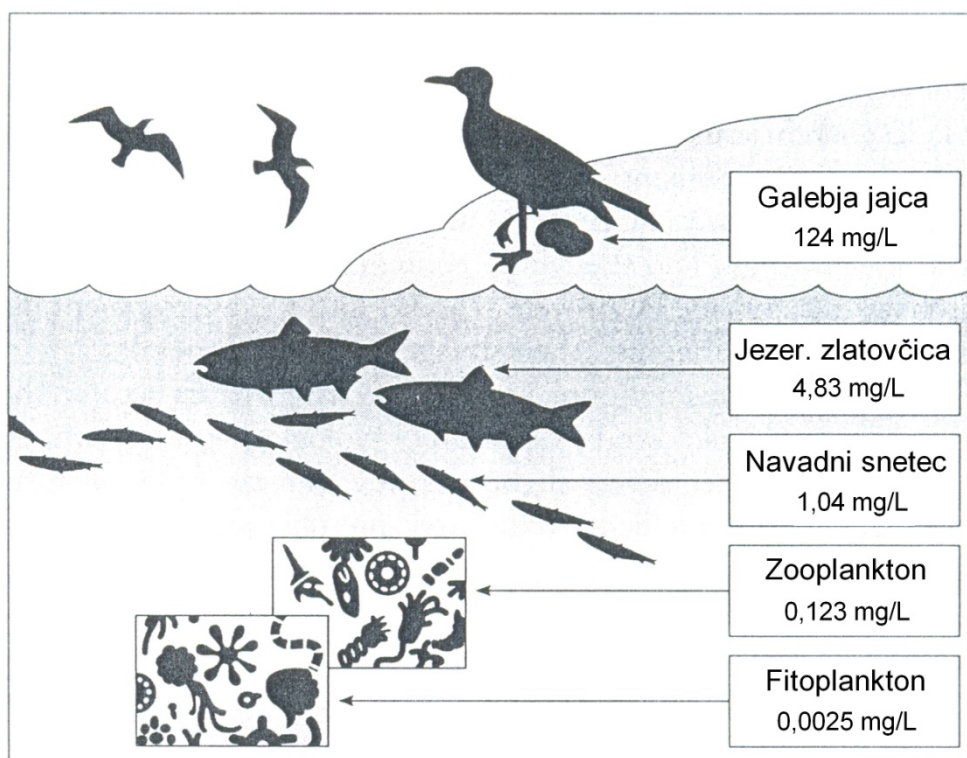
Hitrost biotransformacije je odvisna od vzbujanja encimske družine citokromov P-450. Na splošno je čas izločanja iz telesa odvisen tudi od števila klorovih atomov v bifenilni strukturi in njihove razporeditve. Načeloma je čas izločanja daljši, pri molekuli PCB-jev z večjim številom klorovih atomov v (11).

3.6 Bioakumulacija PCB-jev v vodnih organizmih

Vodni organizmi pridejo v stik z organskimi onesnažili (npr. PCB-ji) preko vode in/ali preko hrane. Zaradi lipofilnosti se organska onesnažila v maščobnih tkivih vodnih organizmov kopičijo (»bioakumulacija«) (25). Manjši organizmi so plen večjim, tako se koncentracije organskih onesnažil v maščobnih tkivih večjih organizmov, npr. rib višajo, kar vodi do t.i. »biomagnifikacije« (25) vzdolž prehranjevalne verige. Colborn s sodelavci, (26) je preučeval mikroorganizme v okolici Velikih jezer v Kanadi in ugotovil, da ti obstojna organska onesnažila zaužijejo preko sedimentov. Po prehranjevalni verigi PCB-ji potujejo preko fitoplanktona, zooplanktona in majhnih rakcev do navadnega snetca in jezerske zlatovščiice (26). Slika 5 shematsko ponazarja »bioakumulacijo« in »biomagnifikacijo« vzdolž prehranjevalne verige. Iz slike je razvidno, da so koncentracije PCB-jev v galebjih jajcih do 50.000 krat višje kot v fitoplanktonu (5). Za gojene ribe je glavni vir onesnaženja s PCB-ji krma, ki vsebuje kontaminirano ribje meso ali ribje olje (26).

3.7 PCB-ji v Sloveniji

Leta 1962 je tovarna Iskra Kondenzatorji iz Semiča začela proizvajati kondenzatorje, v katerih so kot dielektrike uporabljali PCB-je. Do leta 1970 so v tovarni uporabljali tehnični mešanici Clophen A-30 in A-50 (Bayer, Zvezna republika Nemčija), od leta 1970 do leta 1985, pa tehnično mešanico Pyralen 1500 (Prodelec, Francija). Tehnične mešanice PCB-jev se med seboj razlikujejo po vsebnosti posameznih zvrsti PCB-jev (monoklorobifenili, diklorobifenili, triklorobifenili,...) in vsebnosti klora v zmesi (2, 27), kar predstavljam v Preglednicah IV in V.



Slika 5: Bioakumulacija in biomagnifikacija PCB-jev vzdolž prehranjevalne verige v Velikih jezerih v Kanadi (5)

Preglednica IV: Vsebnosti posameznih zvrsti PCB-jev in vsebnosti klora v tehnični mešanici Aroclora 1242 (2), ki po sestavi ustreza mešanici Pyralen 1500

PCB	Molska masa	Vsebnost Cl v PCB (ut %)	Vsebnost posamezne zvrsti PCB v Arocloru 1242 (%)
monoklorobifenil	188,65	18,79	3
diklorobifenil	223,10	31,77	13
triklorobifenil	257,54	41,30	28
tetraklorobifenil	291,99	48,56	30
pentaklorobifenil	326,43	54,30	22
heksaklorobifenil	360,88	58,93	4
heptaklorobifenil	395,32	62,77	-

Preglednica V: Vsebnosti posameznih zvrsti PCB-jev v tehničnih mešanica Clophen A-30 in Clophen A-50 (2)

PCB	Vsebnosti posameznih zvrsti PCB v Clophenu A-30 (%)	Vsebnosti posameznih zvrsti PCB v Clophenu A-50 (%)
monoklorobifenil	1	-
diklorobifenil	9	1
triklorobifenil	16	14
tetraklorobifenil	18	13
pentaklorobifenil	10	19
heksaklorobifenil	1	22
heptaklorobifenil	-	-
oktaklorobifenil	-	-

Od leta 1962 do leta 1984, ko so prepovedali uporabo PCB-jev v Sloveniji, so v tovarni kondenzatorjev v Semiču uporabili okoli 3700 ton PCB-jev (27). Zaradi odmevnih raziskav strupenosti PCB-jev v svetu ter dolgoletnega onesnaževanja kraškega območja reke Krupe z njimi so leta 1983 analizirali (2) vodo iz reke Krupe, zrak, sediment, zemljo in ribe (2). V vseh analiziranih vzorcih so dokazali visoke koncentracije PCB-jev, zato so proizvodnjo kondenzatorjev ukinili in leta 1985 začeli s sanacijskimi programi (2). Ti so vključevali prekinitev proizvodnje PCB kondenzatorjev, načrte za izgradnjo trajnega odlagališča in nadzorne meritve v okolju (2).

Zaradi obstojnosti PCB-jev so se vse industrijske panoge, ki so PCB-je uporabljale, znašle pred enakim problemom, kaj narediti z njimi po končani proizvodnji, ko niso več uporabni. Ker se niso zavedali posledic, so problem večinoma reševali tako, da so jih odlagali v okolje. Šele pozneje so ugotovili, da se v njem akumulirajo in posledično, zaradi bioakumulacije, predstavljajo nevarnost za vsa živa bitja.

3.8 Določanje PCB-jev v bioloških vzorcih

PCB-ji so okoljska onesnažila, katerih prisotnost v okolju spremljamo že več kot tri desetletja (26). V literaturi najdemo objavljene raziskave določanja PCB-jev v okoljskih vzorcih, kakor tudi določanje njihove kemične in biološke stabilnosti ter strupenosti (28).

Postopek analize lipofilnih organskih onesnažil je sestavljen iz naslednjih osnovnih korakov: ekstrakcija, čiščenje ter kvalitativna in kvantitativna določitev analiziranih spojin.

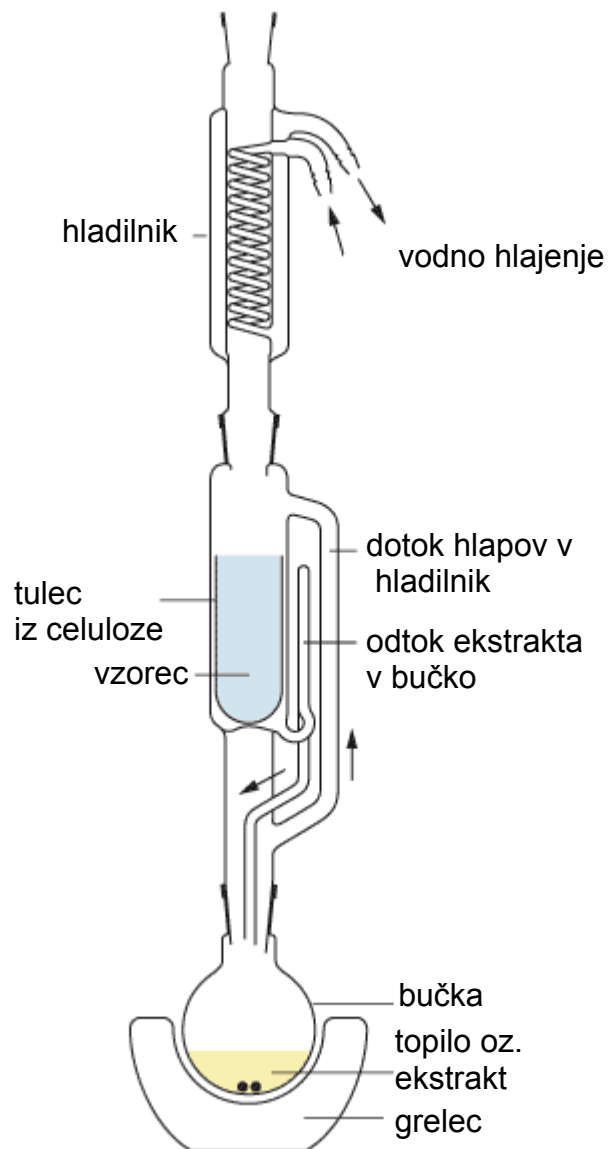
3.8.1 Ekstrakcija

PCB-ji so lipofilne organske spojine, ki se akumulirajo v maščevju organizmov. Njihova ekstrakcija temelji na izolaciji lipidne frakcije iz osnovne matrike. Organska onesnažila lahko iz različnih matrik ekstrahiramo z različnimi ekstrakcijskimi postopki, kot na primer s Soxhletovo ekstrakcijo, s Soxtec ekstrakcijo, z ekstrakcijo z ultrazvokom, z ekstrakcijo s superkritičnimi tekočinami in z ekstrakcijo z mikrovalovi. Postopki so različno učinkoviti in se med seboj razlikujejo glede na vrsto in količino uporabljenih topil, temperaturo, čas in selektivnost ekstrakcije. Pogoji ekstrakcije pogojujejo učinkovitost postopka, ki ga določamo kot razmerje med množino analita v ekstraktu in množino analita v matriki pred ekstrakcijo (28, 29).

Soxhletova ekstrakcija

Soxhletovo ekstrakcijo najpogosteje uporabljamo za ekstrakcijo obstojnih organskih onesnažil, kot so npr. PCB-ji iz različnih matrik (zemlja, sediment in biološki materiali). Za ekstrakcijo uporabimo različna nepolarna in polarna topila in njihove mešanice v različnih razmerjih (npr. čisti n-heksan, n-pentan/diklormetan 1:1 (v/v), heksan/acetone 1:1 (v/v)). Nepolarno topilo ekstrahira PCB-je, adsorbirane na plast trigliceridov, srednje polarno topilo ali bolj polarno topilo pa iz plasti fosfolipidov (30). Slika 6 prikazuje Soxhletov aparat.

Pri ekstrakciji po Soxhletu ponavadi ekstrahiramo do 24 ur. Izkoristki ekstrakcije so ponavadi visoki, zato se velikokrat uporablja za primerjavo z drugimi ekstrakcijskimi postopki. Slaba stran postopka je dolgotrajnost, neselektivnost in poraba velike količine topila (32). Postopek ekstrakcije poteka tako, da topilo v bučki zaradi segrevanja izhlapeva in potuje do hladilnika, kjer hlapi kondenzirajo in se vrnejo v ekstrakcijski celulozni tulec z vzorcem. Komponente iz vzorca, ki jih želimo ekstrahirati, se v topilu raztopijo. Ko se ekstrakcijski tulec napolni s topilom, ta s prelivom odteče nazaj v bučko. Cikel se nato ponavlja, v bučki s topilom pa se zbirajo ekstrahirane komponente vzorca. Po končani ekstrakciji, ki je neselektivna, je navadno potrebno zahtevno in zamudno čiščenje vzorcev.



Slika 6: Shema Soxhletovega aparata (31)

Soxtec ekstrakcija

Pri tem postopku, ki ga lahko poimenujemo tudi avtomatizirana ekstrakcija po Soxhletu, za razliko od Soxhletove ekstrakcije, ekstrakcijski celulozni tulec z vzorcem za približno 1 uro potopimo v vrelo topilo. Ekstrahirane komponente iz vzorca tako prehajajo v topilo. Del ekstraktov, ki ostanejo v celuloznem tulcu, odstranimo tako, da celulozni tulec dvignemo nad vrelo topilo, kot pri Soxhletovi ekstrakciji, in ga s kondenziranimi hlapi topila ekstrahiramo še 1 uro. Na koncu topilo odparimo, tako da nam v Soxtec aparatu ostanejo samo skoncentrirane ekstrahirane komponente vzorca. Glavna prednost Soxtec ekstrakcijskega postopka, v primerjavi z ekstrakcijo po Soxhletu je hitrejša ekstrakcija in

manjša poraba topil. Prednost tega ekstrakcijskega postopka je tudi v tem, da vzorec lahko skoncentriramo direktno v Soxtec aparatu (32).

Ekstrakcija z ultrazvokom

Za ultrazvočno ekstrakcijo uporabljamo ultrazvočno kopel ali ultrazvočno konico kot vir ultrazvočnih valov. Trdne vzorce, ki jim dodamo organsko topilo, ekstrahiramo z ultrazvočnimi valovi določen čas (do 10 min). Ekstrakcijo istega vzorca lahko ponovimo večkrat ter po vsaki ekstrakciji topilo oddekantiramo, ga združimo in na koncu skoncentriramo na želen volumen. Prednost ekstrakcije z ultrazvokom je v tem, da lahko v ultrazvočni kopeli, v relativno kratkem času, ekstrahiramo več vzorcev hkrati, slaba stran ekstrakcije pa so nižji izkoristki ekstrakcije in velika poraba topil (29, 32).

Ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami

Ob povišanju temperature in tlaka nad kritično točko, snovi preidejo v superkritično stanje. Superkritične tekočine zaradi visoke difuzivnosti, nizke viskoznosti ter minimalne površinske napetosti lažje in hitreje prodrejo v vzorec ter tako boljše in hitreje raztapljajo analite. S spreminjanjem tlaka in temperature, lahko na izbrane lastnosti vplivamo ter tako izboljšamo učinkovitost in selektivnost ekstrakcije.

Najpogosteje se kot superkritični reagent uporablja CO₂. Ker je nepolaren, je njegova sposobnost raztapljanja polarnih organskih onesnažil v večini analiznih postopkov manjša, zato mu pogosto dodajamo polarna organska topila (modifikatorje), ki zvišajo odstotek ekstrakcije polarnih spojin (29, 32). Glavni prednosti ekstrakcije s superkritičnimi tekočinami sta, enostavna odstranitev topila (superkritične tekočine) iz vzorca po ekstrakciji, in sicer z zniževanjem pritiska, ter majhna poraba topila. Slabost pa je robustnost same metode (32).

Ekstrakcija z mikrovalovi

Pri postopku ekstrakcije z mikrovalovi, ki je ena novejših ekstrakcijskih tehnik, se za desorpcijo organskih onesnažil iz njihovih matrik, uporablja elektromagnetno valovanje. Prednost metode je v kratkih ekstrakcijskih časih, majhni porabi topil in ekstrakciji večih vzorcev hkrati (32).

3.8.2 Čiščenje ekstrakta

Pred kvalitativnim in kvantitativnim določanjem PCB-jev v izbrani matriki, moramo iz ekstrakta odstraniti moteče lipide. To lahko naredimo z destruktivnimi metodami, kot je saponifikacija s 96% žveplovo kislino, ali z nedestruktivnimi metodami, kot je gelska permeacijska kromatografija (30). Sledi ločba na silikagel ali florisil kolonah, kjer PCB-je ločimo od ostalih organoklorovih spojin in tako preprečimo motnje med ločevanjem PCB-jev s plinsko kromatografijo (30).

3.8.3 Separacija in identifikacija analiziranih spojin

Kromatografski postopek omogoča separacijo in identifikacijo posameznih spojin v kompleksnih mešanica. Spojine se pri kromatografiji porazdelijo med stacionarno in mobilno fazo (33). V mobilni fazi, ki je lahko plin, tekočina ali superkritična tekočina in potuje skozi kolono, na katero je nanešena stacionarna faza, se komponente raztopijo. Zaradi različne afinitete posameznih spojin do stacionarne, oziroma mobilne faze, pride med ponavljajočim procesom sorpcije/desorpcije do ločitve zmesi. Komponenta, ki je dobro topna v stacionarni fazi, bo potrebovala več časa za potovanje po koloni, medtem ko bo komponenta, ki je dobro topna v mobilni fazi, prispela do detektorja hitreje (33, 34).

Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija spada med učinkovite in hitre separacijske metode za analizo zmesi organskih spojin. Na trgu obstaja veliko vrst kolon z različnimi stacionarnimi fazami in specifičnih GC detektorjev (npr. plamensko ionizacijski detektor – FID, detektor na zajetje elektronov – ECD, masno spektrometrični detektor - MSD), kar omogoča široko uporabo te metode (35).

Za določitev PCB-jev, v zadnjem času, uporabljamo kapilarno plinsko kromatografijo sklopljeno z detektorjem na zajetje elektronov (ECD detektorjem), ki ima, v primerjavi z drugimi detektorji za halogenirane spojine, boljšo občutljivost. Ločitev spojin poteka na različnih kapilarnih kolonah z različno polarnimi stacionarnimi fazami. Kljub temu trenutno na tržišču ni kolone, ki bi lahko ločila vseh 209 kongenersov (30).

Ločba komponent poteka po osnovnem principu, da mobilna faza (inerten plin) pri prehodu skozi kolono nosi molekule vzorca. Na tej poti molekule prehajajo iz mobilne faze (plin) na stacionarno fazo, plast nanešeno na steno kapilarne kolone. Od fizikalno - kemijskih lastnosti posameznih komponent v vzorcu je odvisno, koliko časa potujejo izbrane spojine po koloni. Čas, ki poteče od injiciranja vzorca do trenutka, ko detektor zazna kromatografski vrh, imenujemo retencijski čas komponente (t_r). Retencijski čas posamezne komponente je odvisen od fizikalno-kemijskih lastnosti izbrane spojine, vrste in debeline stacionarne faze, dolžine kolone, temperaturnega programa peči, v kateri se kolona nahaja in pretoka nosilnega plina (mobilne faze) (36, 37).

Instrument za plinsko kromatografijo (Slika 7) sestavljajo:

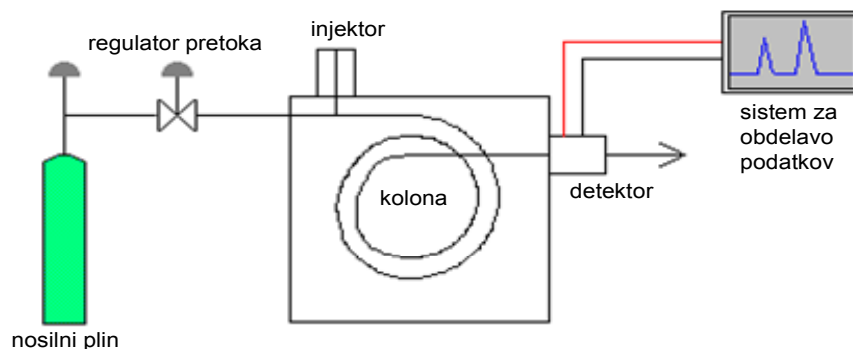
1. **injektor**, kjer vzorec vstopi v plinski kromatograf in se upari. Za to mora biti temperatura injektorja dovolj visoka. Možni so trije načini vnosa vzorca:

- »split«: vzorec se po injiciranju razdeli na dva dela in samo en del vzorca nadaljuje pot v kromatografsko kolono. Ta injektor uporabljamo pri vzorcih, ki imajo analite v visokih koncentracijah.
- »splitless«: po odparitvi topila, injiciran vzorec v celoti nadaljuje pot v kromatografsko kolono. Volumen vzorca, ki pride na kolono, je večji in zato bolj primeren za vzorce, ki vsebujejo analite v sledovih (34).
- »on column«: vzorec injiciramo direktno v predkolono ali kolono. Prednost tega postopka je v tem, da lahko določamo nižje koncentracije analitov.

2. **kolona**: tu poteka ločba spojin iz vzorca. Poznamo polnjene in kapilarne kolone. Kapilarne kolone so daljše (do 100 m), tanjše (do 0,53 mm) in imajo stacionarno fazo na steno nanešeno kot film (μm debeline). Posledično omogočajo boljšo ločbo.

3. **detektor**: zazna komponente, ki se izločijo iz kolone (36, 37).

Nosilni plin, v katerem izbrana spojina potuje od injektorja do detektorja, mora biti inertni do preiskovane komponente in stacionarne faze, ne sme reagirati z materiali injektorja, kolone in detektorja ter mora biti poceni in varen. Kot nosilni plin ponavadi uporabljamo helij, dušik ali argon (37).



Slika 7: Poenostavljena shema plinskega kromatografa (38)

Detektor na zajetje elektronov (ECD)

Ker so organska onesnažila, kot so npr. PCB-ji, v okolju večinoma prisotna v nizkih koncentracijah, je njihovo dokazovanje v okoljskih vzorcih pogosto oteženo. To je vodilo do razvoja vrste občutljivih kromatografskih detektorjev, med njimi tudi ECD, ki se uporablja za analizo halogeniranih spojin (5). Pri tem detektorju eluent iz kolone potuje preko dveh elektrod, od katerih je ena radioaktiven izotop, navadno Ni^{63} , ki emitira elektrone (beta delce). Ti visokoenergijski elektroni povzročajo po trkih z nosilnim plinom v detektorju, ki je običajno dušik ali pa mešanica argon/metan (5% metana), nastanek plazme. Dobimo konstanten tok, ki predstavlja bazno linijo. Ko pride iz kolone elektrofilna spojina, pride do zajetja elektronov, kar povzroči negativni signal, ki je sorazmeren množini eluirane komponente. Tako lahko z ECD-jem določimo količino ciljanega analita. Iskane spojine identificiramo na podlagi retencijskih časov standardov (5).

3.8.4 Kvantitativna analiza

Kvantitativna analiza v plinski kromatografiji temelji na primerjavi odzivnosti detektorja na analit (spojina, katere koncentracijo določamo) in na standard (spojina z znano koncentracijo). Odziv detektorja se meri kot višina kromatografskega vrha ali površina pod krivuljo. Ta se pretvori v podatke o relativni sestavi vzorca po eni od sledečih metod:

- metoda zunanega standarda (29, 34, 37)
- metoda internega standarda (29, 34, 37)
- metoda standardnega dodatka (29, 34, 37).

Pri metodi eksternega standarda posnamemo kromatograme standardov v različnih koncentracijah, pri čemer upoštevamo, da morajo biti te koncentracije primerljive s koncentracijo analitov v vzorcu. Nato naredimo umeritveno krivuljo in koncentracije analitov v vzorcu odčitamo iz grafa ali izračunamo iz enačbe umeritvene krivulje (29, 37). Pri metodi internega standarda izberemo spojino (interni standard), ki je po kemijskih in fizikalnih lastnostih čim bolj podobna preiskovanim analitom in jo v znani koncentraciji dodamo k vsakemu standardu in vzorcu. Kromatografski vrh internega standarda mora biti od kromatografskih vrhov ostalih komponent vzorca dobro ločen.

Metoda standardnega dodatka je zelo zamudna, zato se najmanj uporablja. Pri tej metodi vzorec najprej analiziramo, nato mu dodamo znano množino standardov in vzorec ponovno analiziramo. Koncentracijo analitov določimo iz razmerja med odzivi detektorja za vzorce z in brez standardov (29, 34, 37).

3.8.5 Kvalitativna analiza

Kvalitativno določanje PCB kongenersov v vzorcih lahko opravimo na dva načina, to je z analizo na GC-ECD, ki ima skupni injektor ter vzporedno vezani koloni z dvema različnima stacionarnima fazama in detektorjema ali s plinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (v kolikor so koncentracije analitov dovolj visoke).

4 NAMEN DELA

Poliklorirani bifenili spadajo po Stockholmski konvenciji med glavna organska obstojna onesnažila. Obstojna organska onesnažila so spojine, največkrat uporabljene v različnih industrijskih panogah in kmetijstvu, ki stalno prehajajo v okolje ter onesnažujejo vodne in zemeljske površine. Nepravilno odlaganje odpadnih mešanic PCB-jev v okolje v drugi polovici 20. stoletja, je povzročilo onesnaženje izpostavljenih zemlje, vode, sedimentov, različnih organizmov in posledično človeka.

V obdobju uporabe polikloriranih bifenilov v Iskri, Semič (1962-1985), so izrabljena olja pogosto odlagali na različnih »divjih« odlagališčih v Beli krajini. Po ustnih virih so tovrstna nelegalna odlagališča tudi v JZ delu Slovenije, vzdolž reke Idrijce. Poliklorirani bifenili so v vodi slabo topni, in dobro topni v maščobnem tkivu organizmov, kjer se akumulirajo. Zato bomo v predloženem diplomskem delu analizirali ribe, ulovljene na različnih vzorčnih mestih (nad izlivom Belce, severnem delu Idrije, v Kozarski Grapi in Bači pri Modreju) vzdolž reke Idrijce leta 2003 in s tem preverili, ali so bile v preteklosti izpostavljene polikloriranim bifenilom. Za analizo smo izbrali sedem »indikatorskih polikloriranih bifenilov«, ki so glavni pokazatelji onesnaženja z različnimi komercialnimi mešanicami polikloriranih bifenilov. Za analizo vzorcev rib bomo optimizirali postopek določitve polikloriranih bifenilov v vzorcih rib, uporabili bomo različna topila za ekstrakcijo po Soxhletu, sledila bo odstranitev lipidov, čiščenje na florisil koloni, koncentriranje v toku dušika ter kvalitativna in kvantitativna analiza s plinsko kromatografijo z detektorjem na zajetje elektronov. Analizni postopek bomo validirali s potrditvijo identitete spojin, z določitvijo meje zaznavnosti/določljivosti instrumenta in analiznega postopka, linearnosti in izkoristka analiznega postopka z uporabo referenčnega materiala.

Dobljene rezultate bomo primerjali z vrednostmi, določenimi v literaturi ($2 \mu\text{g g}^{-1}$ mokre teže jedilnega dela ribe določeno s strani FDA) in iz njih ocenili, ali so bile ribe, ki smo jih analizirali, izpostavljene povišanim količinam polikloriranih bifenilov zaradi nepravilnega odlaganja tovrstnih odpadkov v bližini reke Idrijce. Ocenili bomo tudi škodljivost teh rib za človekovo zdravje.

5 MATERIALI IN METODE

5.1 Materiali

Za analizni postopek smo uporabili naslednje spojine in materiale:

- 95% n-heksan (»Baker Ultra Resi-Analysed«, Mallinckrodt, Deneventer, Nizozemska)
- diklormetan (»Baker Ultra Resi-Analysed«, Mallinckrodt, Deneventer, Nizozemska)
- aceton (»Baker Ultra Resi-Analysed«, Mallinckrodt, Deneventer, Nizozemska)
- 96% H₂SO₄ p.a. (Carlo Erba, Milano, Italija)
- Na₂SO₄ brezvodni (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- florisil PR 60/100 mesh (Supelco, Bellefonte, ZDA)
- ekstrakcijski celulozni tulci MN 645 30x100 mm, (Macherey-Nagel, Düren, Nemčija)
- steklena volna (»untreated«, Supelco, Bellefonte, ZDA)
- voda za kromatografijo (water for Chromatography, Merck, Darmstadt, Nemčija)
- standardna raztopina 2,4,6-triklorobifenil (PCB 30) (Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers, Ausburg, Nemčija)
- standardna raztopina 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-dekaklorobifenil (PCB 209) (Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers, Ausburg, Nemčija)
- standardna raztopina izbranih PCB kongenersov (28, 52, 101, 118,138, 153 in 180) – MIX 21 (Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers, Ausburg, Nemčija)

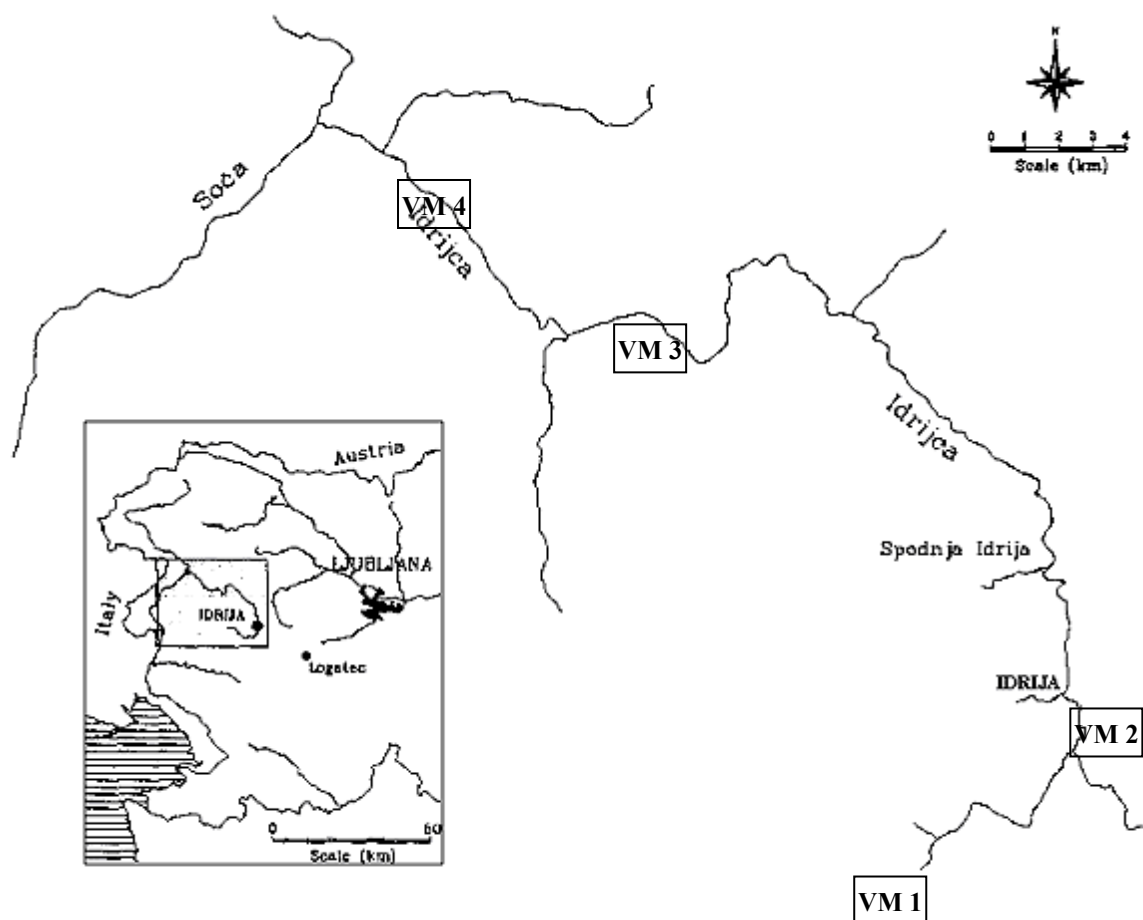
Za analizni postopek smo uporabili tudi naslednje aparature:

- liofilizator Christ Alpha 1-4 LOC (Christ, Osterode, Nemčija)
- Soxhlet aparat (Wheaton-33, Wheaton Science Products, Millville, ZDA)
- grelci za segrevanje (Lab-line[®] Multi-Unit Extraction Heater 5000, Barnstead/Lab-line, Melrose Park, ZDA)
- plinski kromatograf HP 6890 (Hewlett-Packard, Waldbronn, Nemčija)

5.2 Metode dela

5.2.1 Vzorčenje, transport, shranjevanje

Ribe smo ujeli na različnih lokacijah reke Idrijce (Slika 8, Preglednica VI) in jih v hladilni torbi prenesli v laboratorij. Tu smo jih očistili (odstranili glavo, kožo, kosti in notranje organe) ter v polietilenske vrečke shranili preostali jedilni del ribe ter jih zmrznili na -18°C . Na teh vzorcih smo opravili tudi analize vsebnosti živega srebra in selena (39).



Slika 8: Reka Idrijca z vzorčnimi mesti (VM): VM 1: nad izlivom Belce, VM 2: severni del Idrije, blizu Kolektorja, VM 3: Kozarska Grapa in VM 4: Bača pri Modreju (39)

Preglednica VI: Različne vrste rib ujete na različnih lokacijah reke Idrijce ter teže posameznih vzorcev pred in po liofilizaciji (*: za vzorec 8 nista znana ne vzorčno mesto ulova ne vrsta ribe)

Vzorčno mesto (VM)	Številka vzorca (VZ)	Vrsta ribe (latinsko ime / slovensko ime)	Teža pred liofilizacijo (g)	Teža po liofilizaciji (g)
VM 1	VZ 7	<i>Salmo species</i> / križanec med potoško in soško postrvijo	5,1	1,11
*	VZ 8	*	14,64	2,55
VM 2	VZ 12	<i>Salmo gairdneri</i> / šarenka	13,71	3,38
VM 2	VZ 4	<i>Salmo species</i>	11,5	2,5
VM 2	VZ 1	<i>Salmo trutta fario</i> / potočna postrv	8,96	2,15
VM 2	VZ 2	<i>Thymallus thymallus</i> / lipan	18,87	3,96
VM 3	VZ 6	<i>Salmo gairdneri</i>	26,06	4,94
VM 3	VZ 5	<i>Salmo species</i>	32,92	8,1
VM 3	VZ 10	<i>Thymallus thymallus</i>	14,88	3,56
VM 3	VZ 3	<i>Barbus meridionalis caninus</i> / mrenič	9,83	1,99
VM 4	VZ 9	<i>Salmo species</i>	24,48	5,66
VM 4	VZ 11	<i>Salmo gairdneri</i> / šarenka	31,4	7,81
VM 4	VZ 13	<i>Thymallus thymallus</i>	19,48	4,23
VM 4	VZ 14	<i>Barbus meridionalis caninus</i>	4,51	0,89

5.2.2 Homogenizacija in liofilizacija

Vzorci smo 72 ur liofilizirali v liofilizatorju Christ Alpha 1-4 LOC. Liofilizator uporabljamo za sušenje bioloških vzorcev pri nižani temperaturi (-52 °C) in nižanem tlaku (5 Pa). Pri tem postopku prehaja voda iz trdnega stanja v vzorcu direktno v vodne hlapce. Pri postopku liofilizacije je pomembno, da vzorce liofiliziramo v ustrezni embalaži, tako da ostalih vzorcev ne kontaminiramo z morebitnimi nečistočami iz liofilizatorja in obratno. Po liofilizaciji smo vzorce mehansko homogenizirali v terilnici s pestilom, dokler nismo dosegli enakomerne velikosti delcev.

5.2.3 Priprava standardnih raztopin

Priprava raztopin internih standardov

Kot interna standarda smo pri analizi uporabljali PCB-ja 30 in 209, ki običajno nista prisotna v okoljskih vzorcih. Raztopini internih standardov smo pripravili v koncentraciji 200 ng mL⁻¹. Izhajali smo iz standardnih raztopin 2,4,6 - triklorobifenil (PCB 30) in 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6' - dekaklorobifenil (PCB 209) s koncentracijo 10 ng µL⁻¹. 200 µL posamezne spojine smo z injekcijsko brizgo prenesli v 10 mL merilni bučki ter jih razredčili s heksanom do oznake. 100 µL vsake raztopine (v koncentraciji 200 ng mL⁻¹) smo v vsaki seriji meritev dodali vsem vzorcem in slepemu vzorcu. Za preverjanje morebitne kontaminacije, smo slepe vzorce v vsaki seriji meritev analizirali skupaj z vzorci, po enakem postopku.

Med analiznim postopkom lahko pride do izgub, kar ovrednotimo z dodatkom internih standardov (PCB 30 in 209) vzorcem. V ta namen smo pripravili raztopini internih standardov v koncentraciji 20 ng mL⁻¹. Pri vsaki meritvi na GC-ECD, smo interna standarda analizirali skupaj z vzorci in iz razmerja površin raztopin internih standardov in površin internih standardov v vzorcih določili izkoristek analiznega postopka za posamezen vzorec, kar smo upoštevali pri izračunu dejanske vsebnosti izbranih PCB-jev v vzorcih rib.

Priprava raztopine eksterne standarda

Kot eksterni standard smo uporabili raztopino PCB - MIX 21, ki vsebuje PCB-je 28, 31, 52, 101, 118, 138, 153 in 180. Raztopino eksterne standarda smo pripravili v koncentraciji 20 ng mL^{-1} . Izhajali smo iz standardne raztopine PCB-MIX 21 s koncentracijo $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Eksterni standard, s koncentracijo 20 ng mL^{-1} , smo merili skupaj z analiziranimi vzorci, da smo določili retencijske čase indikatorskih PCB-jev.

V ribah iz reke Idrijce smo določali 7 »indikatorskih PCB-jev« (28, 52, 101, 118, 138, 153 in 180). Izbrani PCB-ji so prisotni v večini različnih tehničnih mešanica polikloriranih bifeniлов, ki so bili v uporabi v industriji, in sicer v dovolj visokih koncentracijah, da jih lahko določamo (3). Glede tega smo se ravnali po priporočilih, ki veljajo v tujini (3), kajti slovenska zakonodaja še ne predpisuje, katere PCB-je je potrebno določati v bioloških matrikah.

5.2.4 Uporaba referenčnega materiala (RM)

Najboljši način za validiranje analiznega postopka ter izračun izkoristkov analiznih postopkov je uporaba referenčnega materiala (RM) ali certificiranega referenčnega materiala (CRM). Referenčni material ima določene priporočljive in/ali informativne vrednosti spojin ter intervale zaupanja njihove določitve, vendar te vrednosti še niso certificirane. Certificirani referenčni material pa je referenčni material, katerega ena ali več vrednosti, je certificiranih s tehnično veljavnim postopkom. V certifikatu, ki ga dobimo z certificiranim referenčnim materialom, so podane certificirane vrednosti, njihove negotovosti ter interval zaupanja s stopnjo negotovosti (40). Pri našem delu, smo za izračun izkoristkov analiznega postopka za posamezen PCB kongener, uporabili referenčni material IAEA – 406: Organochlorine Compounds and Petroleum Hydrocarbons in a Fish Homogenate (Mednarodna agencija za atomsko energijo, International Atomic Energy Agency: IAEA, Dunaj, Avstrija) (40). Uporabljen referenčni material je podobna matrika kot naš analiziran vzorec in vsebuje vseh 7 indikatorskih PCB-jev, od katerih imajo PCB-ji 28, 52, 101, 138, 153 in 180 določene priporočljive vrednosti, PCB 118 pa ima določeno informativno vrednost (vrednosti podajamo v Preglednici VII), v koncentracijskem območju od $0,5$ do $4,0 \text{ ng g}^{-1}$.

Referenčni material, katerega zatehta je znašala 5 g, smo v vsaki drugi seriji meritev analizirali po enakem postopku kot vzorce. Dodali smo mu 100 μL internih standardov s koncentracijo 200 ng mL^{-1} .

Preglednica VII: Priporočljive in informativne vrednosti indikatorskih PCB-jev (suha teža materiala) ter 95 % interval zaupanja v referenčnem materialu IAEA – 406 (* priporočljive vrednosti, ** informativna vrednost)

PCB kongener	Koncentracija (ng g^{-1})	95 % interval zaupanja (ng g^{-1})
28	0,57*	0,43 – 1,3
52	1,3*	1,0 – 2,2
101	3,1*	2,2 – 3,4
118	2,5**	1,9 – 3,7
138	4,0*	2,5 – 6,3
153	3,7*	2,9 – 6,0
180	1,2*	1,0 – 1,2

5.2.5 Ekstrakcija vzorcev

Naša aparatura za ekstrakcije po Soxhletu nam omogoča analizo 6 vzorcev hkrati. Približno 5 gramov vsakega vzorca smo zatehtali v 5 ekstrakcijskih celuloznih tulcev in jim dodali 100 μL predhodno pripravljenih raztopin internih standardov, PCB 30 in 209. Točno težo vzorca smo upoštevali pri izračunu vsebnosti izbranih PCB kongenersov. V šestem ekstrakcijskem tulcu smo ekstrahirali slepi vzorec, ki nam je služil za izključitev morebitne kontaminacije vzorca. Vzorce smo ekstrahirali v Soxhletovem aparatu Wheaton-33 približno 17 ur s segrevanjem z grelci Lab-line® Multi-Unit Extraction Heater 5000 na 70 °C. Kot ekstrakcijsko topilo smo uporabili 140 ml mešanice topil heksana in acetona v razmerju 1:1, (v/v). Tulce smo predhodno 8 ur čistili z ekstrakcijo s heksanom v Soxhletovem aparatu.

Po končani ekstrakciji smo ekstrakte skoncentrirali v toku dušika do približno 2 mL. Pri tem smo odstranili lažje hlapen aceton, ki bi se lahko mešal s 96 % H_2SO_4 , s katero v postopku odstranimo lipide. 2 mL ekstrakta smo pred fazo odstranitve lipidov ponovno razredčili s 50 mL heksana.

5.2.6 Odstranjevanje lipidov in koncentriranje vzorcev

Lipide smo iz ekstraktov odstranili z dodatkom 6 mL 96 % H_2SO_4 . Po končani ekstrakciji smo vzorce prelili v lij ločnik, dodali zahtevano količino kisline, stresali ter počakali na ločitev faz. Kislinsko fazo smo odstranili, heksansko fazo pa prelili v bučke. Stene lija ločnika smo sprali s heksanom in ta volumen dodali k vzorcem v bučke. V bučke smo nato dodali še brezvodni Na_2SO_4 , da bi odstranili še morebitni preostali vodni del. Ekstrakte v bučkah smo skoncentrirali v toku dušika na 1 mL.

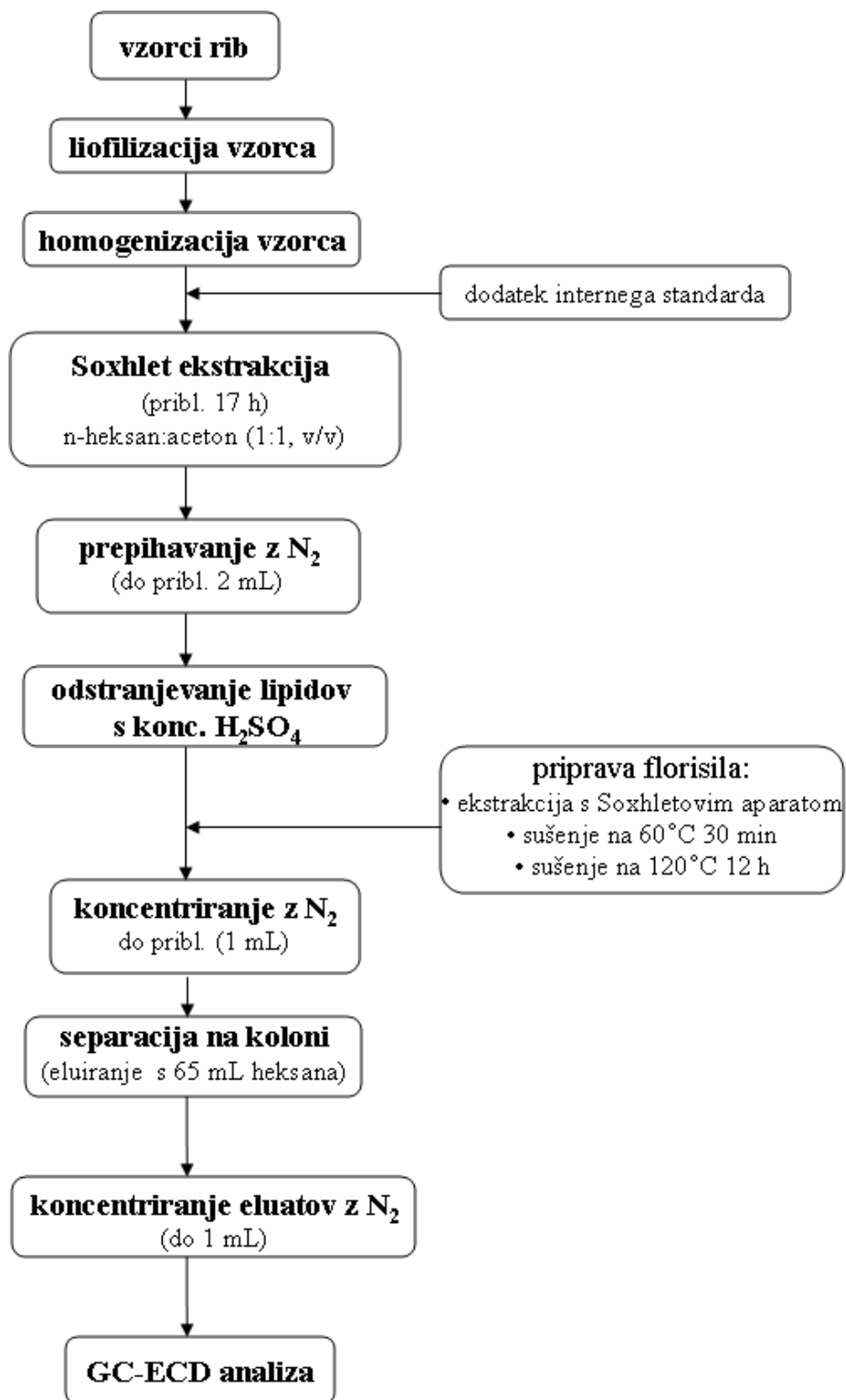
5.2.7 Čiščenje vzorcev na koloni

V separacijskih kolonah, polnjenih s florisilom, smo ločili izbrane PCB-je od morebitnih drugih organskih onesnažil, ki bi lahko motila kromatografsko ločbo. Florisil smo pred uporabo 8 ur čistili s heksanom v Soxhletovem aparatu, ga nato sušili 30 minut na $60\text{ }^\circ\text{C}$, da smo odstranili topilo in nato še 12 ur na $130\text{ }^\circ\text{C}$. Pred uporabo smo ga deaktivirali z 0,5 % vode («organic free water») in s tem povečali njegovo adsorpcijsko učinkovitost.

Kolono smo polnili po »mokrem postopku«. Spodaj smo jo zaprli s stekleno volno, ki preprečuje izhajanje florisila in jo napolnili z 18,5 g florisila, omočenega s heksanom. Vrh kolone smo prekrili z 1 g brezvodnega Na_2SO_4 . Pred nanosom vzorca smo heksan spustili skozi kolono do 1 mm nad Na_2SO_4 . Paziti moramo, da je kolona cel čas postopka polnjenja omočena s topilom. Vzorce smo eluirali s 65 ml heksana. Eluate v bučki smo skoncentrirali na 2 mL v toku dušika in jih prenesli v vialo. Stene bučk smo trikrat sprali s heksanom in ga dodali našemu vzorcu v viali, ki smo ga v toku dušika skoncentrirali na končni volumen 1 mL. Slika 9 shematsko prikazuje celoten analizni postopek za določanje PCB-jev v ribah.

5.2.8 Instrumentalna analiza GC-ECD

Vzorce smo analizirali s plinskim kromatografom sklopljenim z detektorjem na zajetje elektronov (GC-ECD). Poleg vzorcev smo na GC-ECD analizirali še interna standarda (PCB 30 in 209) ter eksterni standard MIX 21, vse v koncentraciji 20 ng mL^{-1} . MIX 21 smo uporabili za kvalitativno določitev indikatorskih PCB-jev.



Slika 9: Shematski prikaz poteka analiznega postopka za določanje PCB-jev v ribah

Pogoji meritev

Ločbo smo izvedli s plinskim kromatografom HP 6890 na kapilarni koloni DB-XLB (30 m), notranjega premera 0,25 mm in s stacionarno fazo (polisiloksan polimer) debeline 0,25 μm . GC ločba je potekala pod naslednjimi delovnimi pogoji:

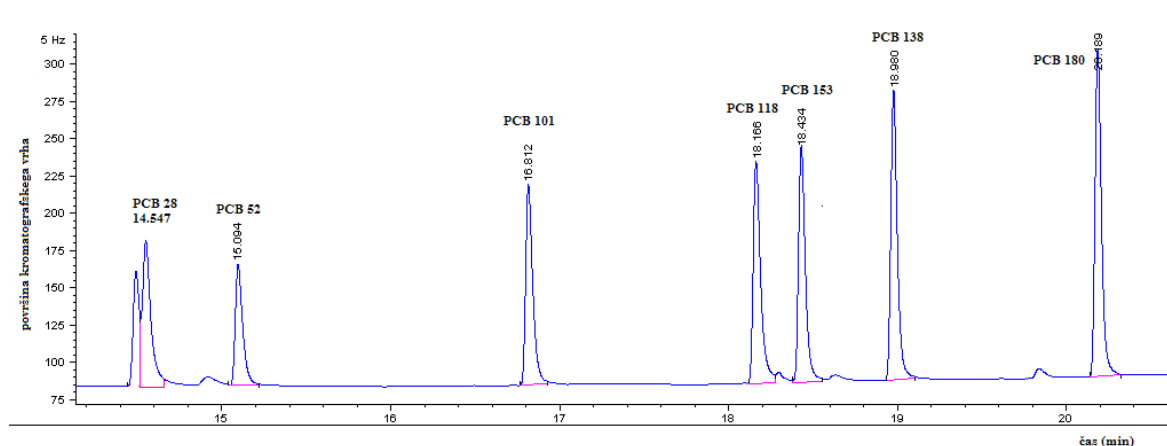
- nosilni plin: helij
- hitrost nosilnega plina (velocity): 28 cm s^{-1} pri $100 \text{ }^\circ\text{C}$, konstantna
- temperatura »cool on column« injektorja: $250 \text{ }^\circ\text{C}$
- volumen injiciranega vzorca: $1 \mu\text{L}$
- temperaturni program segrevanja peči plinskega kromatografa (skupaj 28 minut): začetna temperatura $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 minuta), naraščanje $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ do $300 \text{ }^\circ\text{C}$ (20 minut), končna temperatura $300 \text{ }^\circ\text{C}$ (7 minut);
- temperatura detektorja na zajetje elektronov: $320 \text{ }^\circ\text{C}$.

6 REZULTATI IN RAZPRAVA

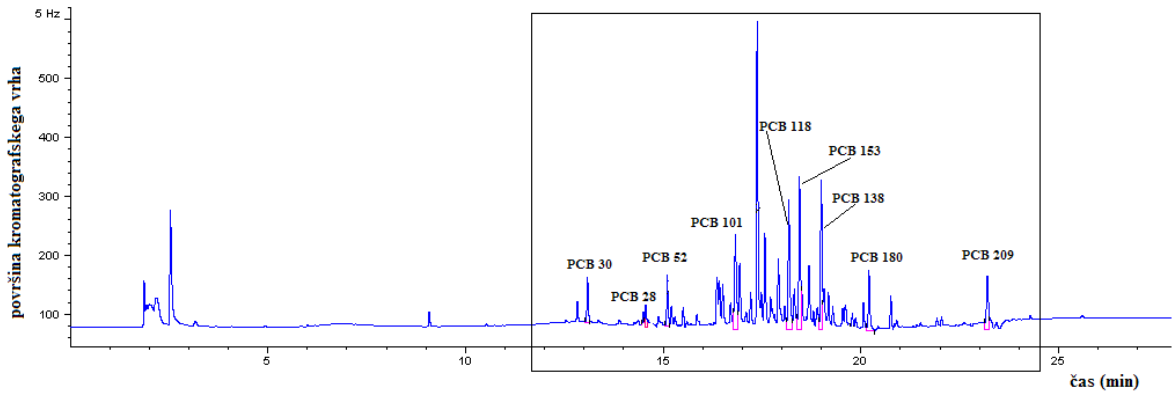
6.1 Kromatografska analiza

Iz kromatogramov analiziranih vzorcev smo dobili površine kromatografskih vrhov za posamezne PCB kongenerse, ki so se nahajali v vzorcih. Te smo uporabili v enačbah umeritvenih krivulj za posamezen PCB kongener ter izračunali njihove koncentracije.

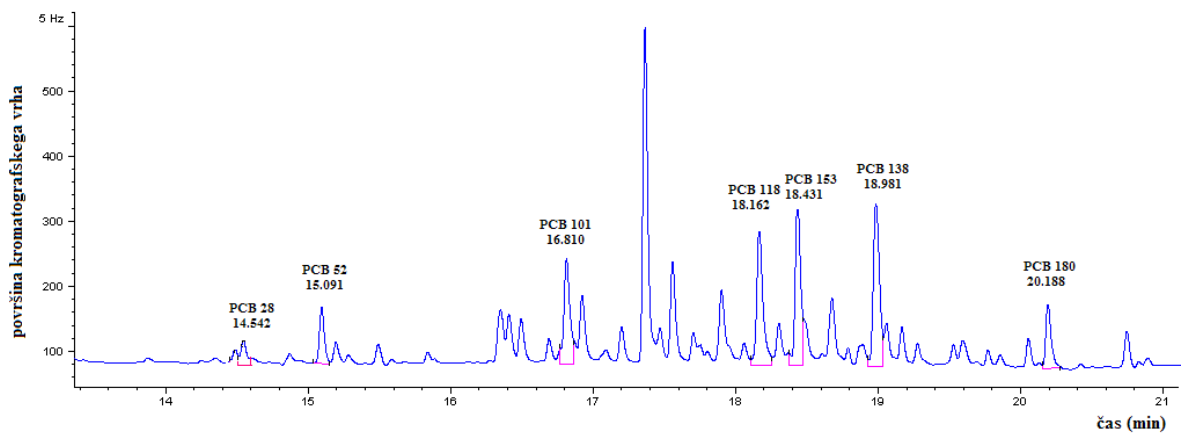
Slika 10 prikazuje izsek kromatograma MIX-a 21 z retencijskimi časi vseh 7 indikatorskih PCB-jev. Slika 11 prikazuje celoten kromatogram vzorca 13, ki sem ga izbrala zato, ker vsebuje vseh 7 indikatorskih kongensov v visokih koncentracijah in so njihovi kromatografski vrhovi dobro ločeni. Slika 12 pa prikazuje izsek kromatograma vzorca 13, kjer se površine kromatografskih vrhov, kakor tudi retencijski časi posameznih PCB kongensov, še bolj nazorno vidijo. Retencijski časi posameznih PCB kongensov na Slikah 10, 11 in 12 se med seboj ujemajo. Na Sliki 13 je prikazan izsek kromatograma slepega vzorca, kjer sta vidna kromatografska vrhova internih standardov, PCB-ja 30 in 209, medtem ko ostalih indikatorskih PCB-jev ni, kar dokazuje, da med samim analiznim postopkom ni prišlo do kontaminacije.



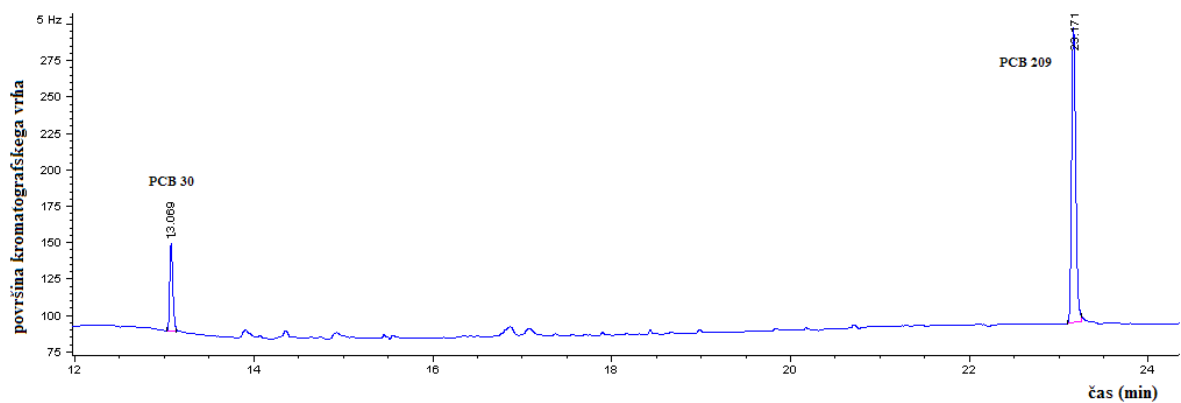
Slika 10: Izsek kromatograma MIX-a 21



Slika 11: Kromatogram Vzorca 13



Slika 12: Izsek kromatograma Vzorca 13



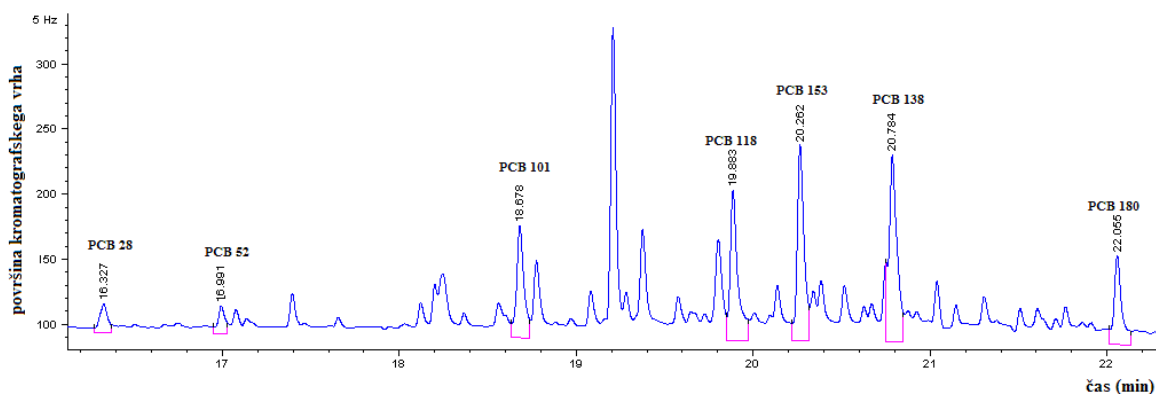
Slika 13: Izsek kromatograma slepega vzorca

6.2 Validacija analiznega postopka

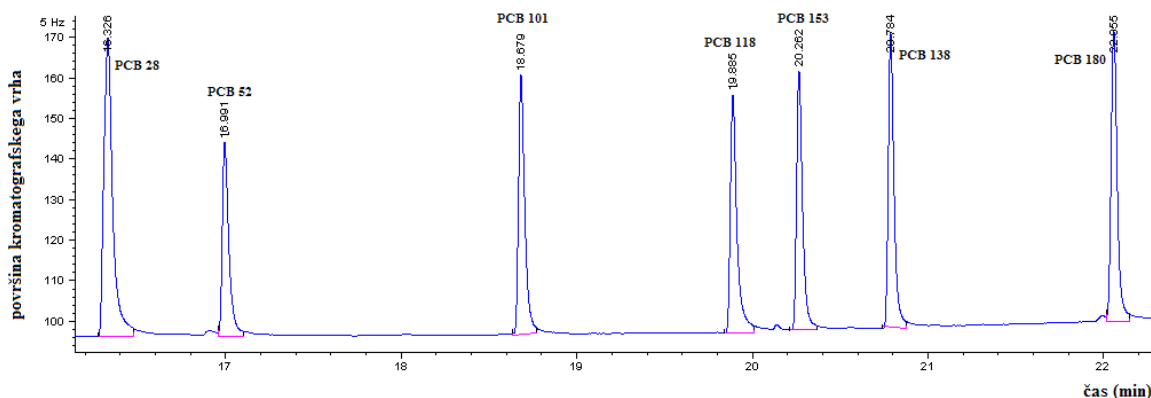
Validacija analiznega postopka je niz testov, s katerimi ugotavljamo primernost analiznega postopka za reševanje določenega analiznega problema, in nam zagotavlja pravilnost rezultatov, določenih z izbranim analiznim postopkom. Elementi validacije analiznega postopka so potrditev identitete, določitev delovnega območja, linearnosti, občutljivosti, meja zaznavnosti/določljivosti, natančnosti in točnosti ter odpornost metode na zunanje vplive. Pri določitvi PCB-jev v bioloških matrikah smo potrdili identiteto analitov, določili mejo zaznavnosti/določljivosti analiznega postopka in instrumenta, linearnost ter izkoristek analiznega postopka z uporabo referenčnega materiala.

6.2.1 Potrditev identitete PCB kongenersov z drugo kolono

Identiteto PCB kongenersov v analiziranih vzorcih lahko potrdimo na več načinov. Ena izmed najzanesljivejših metod potrditve, ki jo priporoča tudi EPA (41), je uporaba plinskega kromatografa s skupnim injektorjem, ki razcepi tok vzorca v plinu na dve vzporedno vezani koloni, z dvema ločenima ECD detektorjema. S primerjavo retencijskih časov PCB kongenersov v kromatogramih standardnih vzorcev lahko prisotnost PCB-jev v analiziranem vzorcu potrdimo ali pa ovržemo (41). Najzanesljiveje pa bi identiteto PCB-jev potrdili z uporabo plinske kromatografije s tandemsko masno spektrometrijo (GC-MS/MS), vendar to pri naših vzorcih ni bilo mogoče, zaradi prenizkih koncentracij analitov. Ker v našem laboratoriju plinskega kromatografa s skupnim injektorjem, vzporednima kolonama in ECD detektorjema nimamo, smo identiteto PCB-jev potrdili z analizo izbranih vzorcev na istem GC-ECD z uporabo kolone z drugo stacionarno fazo ter metodo standardnega dodatka. 5 naključno izbranih vzorcev, predhodno analiziranih na DB-XLB koloni, smo ponovno analizirali na GC-ECD z DB-5 kolono. Poleg vzorcev, smo analizirali tudi raztopino obeh internih standardov in MIX-a 21, ter primerjali retencijske čase izbranih PCB-jev v vzorcih in raztopinah standardov. Sliki 14 in 15 prikazujeta ujemanje retencijskih časov izbranih PCB-jev v vzorcu (Slika 14) in raztopini standardov (Slika 15). Identiteto izbranih 7 »indikatorskih PCB kongenersov« smo potrdili tudi z metodo standardnega dodatka izbranih spojin v predhodno analiziranem vzorcu, kjer smo določili izbrane spojine. S sorazmernim povečanjem kromatografskih vrhov pri določenih retencijskih časih posameznih kongenersov smo potrdili identiteto analitov.



Slika 14: Izsek kromatograma Vzorca 13 na koloni DB-5 dolžine 60 m, z notranjim premerom 0,25 mm in 0,25 μm debeline stacionarne faze 5% fenil - metilpolisiloksanski polimer



Slika 15: Izsek kromatograma MIX-a 21 na koloni DB-5 dolžine 60 m, z notranjim premerom 0,25 mm in 0,25 μm debeline stacionarne faze 5% fenil - metilpolisiloksanski polimer

Pogoji meritev z drugo kolono

Ločbo smo izvedli s plinskim kromatografom HP 6890 (Hewlett-Packard, Waldbronn, Nemčija), s kapilarno kolono DB-5, dolžine 60 m, z notranjim premerom 0,25 mm in 0,25 μm debeline stacionarne faze 5% fenil - metilpolisiloksanski polimer. GC ločba je potekala pod naslednjimi delovnimi pogoji:

- nosilni plin: helij

- hitrost nosilnega plina (velocity): 44 cm s^{-1} pri 100°C , konstantna
- temperatura »cool on column« injektorja: 250°C
- volumen injiciranega vzorca: $1 \mu\text{L}$
- temperaturni program segrevanja peči plinskega kromatografa (skupaj 31 minut): začetna temperatura 100°C (1 minuta), naraščanje $10^\circ\text{C min}^{-1}$ do 300°C (20 minut), končna temperatura 300°C (10 minut).

6.2.2 Meja zaznavnosti in meja določljivosti instrumenta ter analiznega postopka

Meja zaznavnosti instrumenta (Instrument Detection Limit – IDL) je definirana kot najmanjša koncentracija analita, ki jo še lahko določimo z uporabljenimi analizo metodo (42), meja določljivosti instrumenta (Instrument Quantification Limit – IQL), pa je definirana kot koncentracija analita, pri kateri podajamo rezultate kvantitativne analize z večjo verjetnostjo (42). Izračunamo ju kot koncentracijo analita, pri kateri je kromatografski vrh enak trikratni in desetkratni vrednosti standardne deviacije sipanja signala (42). Standardno deviacijo sipanja signala smo določili v treh slepih vzorcih, v katerih ni bilo iskanih kongenersov.

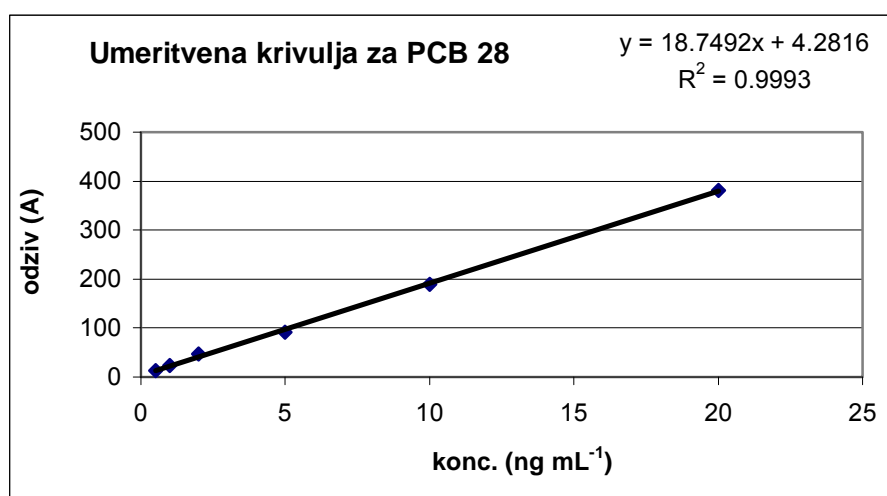
Iz površine vrhov pri retencijskih časih preiskovanih kongenersov smo izračunali IDL in IQL za posamezen kongener, in sicer smo standardno deviacijo sipanja signala pomnožili s faktorjem 3, za izračun IDL in faktorjem 10, za izračun IQL. Mejo zaznavnosti analizne metode (Method Detection Limit – MDL) in mejo določljivosti analizne metode (Method Quantification Limit – MQL) smo izračunali tako, da smo IDL in IQL delili s povprečno suho težo treh slepih vzorcev. Rezultate izračunov podajamo v Preglednici VIII. Iz enačb umeritvenih krivulj za posamezne kongenerse smo izračunali koncentracije posameznih kongenersov, ki jih z našo analizo metodo še lahko zaznamo.

Preglednica VIII: Meje zaznavnosti instrumenta (ILD) in analizne metode (MLD) ter meje določljivosti instrumenta (ILQ) in analizne metode (MQL) za 7 indikatorskih PCB-jev

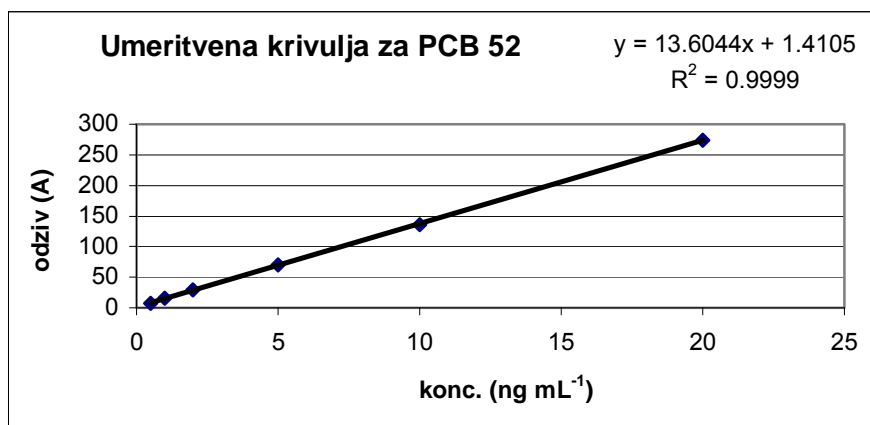
PCB komponenta	IDL (ng mL ⁻¹)	MDL (ng g ⁻¹)	IQL (ng mL ⁻¹)	MQL (ng g ⁻¹)
28	0,10	0,01	0,60	0,16
52	0,17	0,04	0,79	0,21
101	0,03	0,01	0,58	0,16
118	0,09	0,02	0,64	0,17
138	0,04	0,01	0,39	0,11
153	0,02	0,01	0,60	0,16
180	0,13	0,04	0,64	0,17

6.2.3 Lineranost analiznega postopka

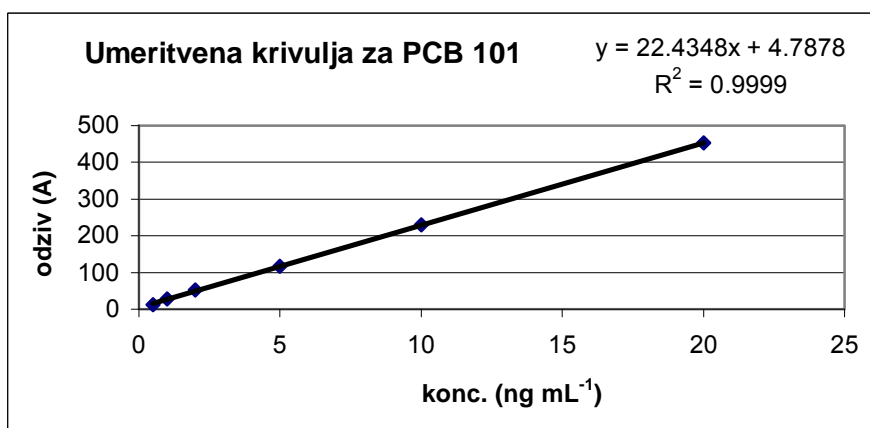
Za vsak posamezni PCB kongener smo izdelali umeritveno krivuljo in s tem določili območje, v katerem je analizni postopek linearen. Za vsak PCB smo pripravili raztopine standardov v heksanu, v šestih različnih koncentracijah, od 0,5 ng mL⁻¹ do 20 ng mL⁻¹. Sledila je GC-ECD analiza. Vzorce, v katerih je bila koncentracija analitov večja od 20 ng mL⁻¹, smo razredčili, tako da so bili znotraj izbranega koncentracijskega območja. Umeritvene krivulje za posamezne PCB kongenerse prikazujemo na Slikah od 14 do 20.



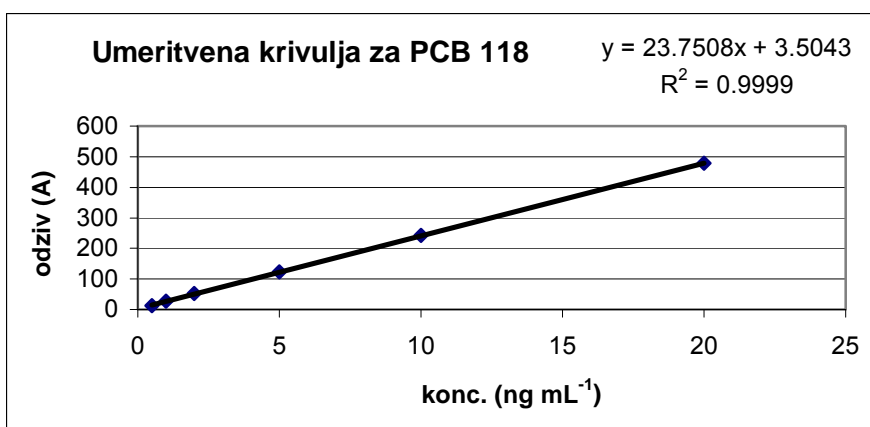
Slika 14: Umeritvena krivulja za PCB 28



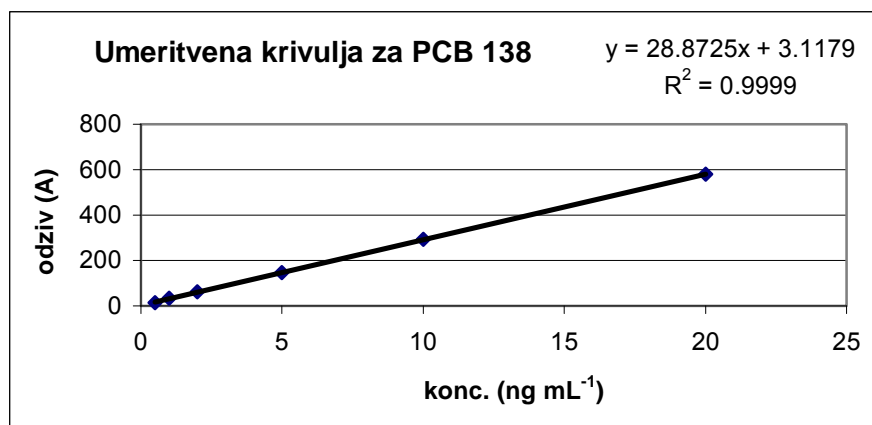
Slika 15: Umeritvena krivulja za PCB 52



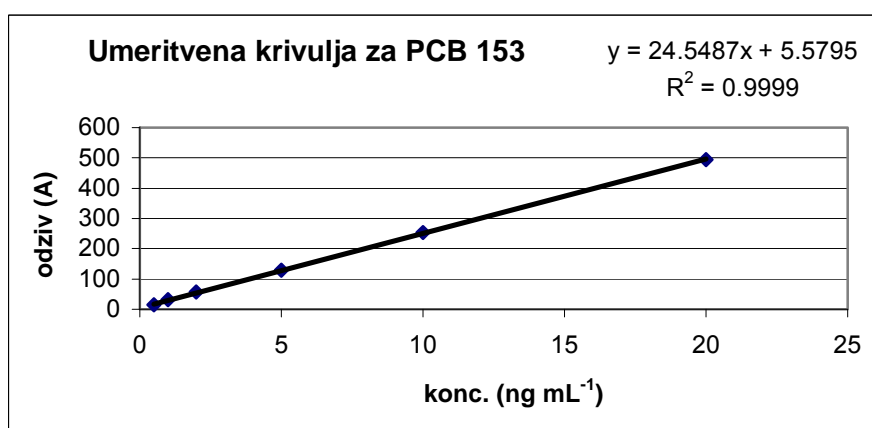
Slika 16: Umeritvena krivulja za PCB 101



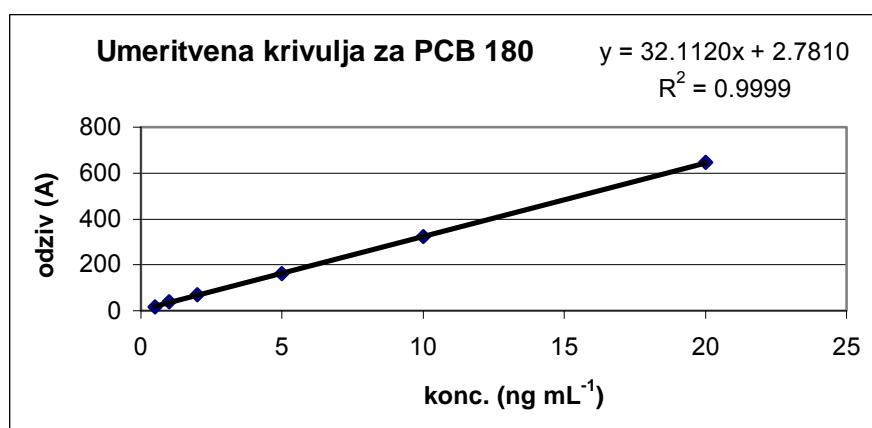
Slika 17: Umeritvena krivulja za PCB 118



Slika 18: Umeritvena krivulja za PCB 138



Slika 19: Umeritvena krivulja za PCB 153



Slika 20: Umeritvena krivulja za PCB 180

Visoki determinacijski koeficienti za izbrane PCB kongenerse (od 0,9993 do 0,9999) potrjujejo linernost v izbranem koncentracijskem območju.

6.2.4 Izkoristek analiznega postopka za posamezne PCB kongenerse, določen na podlagi uporabe referenčnega materiala

Za izračun izkoristka analiznega postopka z uporabo referenčnega materiala, smo vzorce pripravili po naslednjem postopku: 5 g referenčnega materiala smo dodali 100 µL vsakega internega standarda (PCB 30 in 209) in ga analizirali po postopku, opisanem v poglavju 5.2. Izkoristke smo izračunali kot razmerja med površino vrhov, oziroma koncentracijo analitov po ekstrakciji in koncentracijo analitov v vzorcih pred ekstrakcijo, po naslednji enačbi:

$$\% \text{ ekstr.} = 100 \% \cdot \frac{c_{IS} \cdot \frac{A_{RM}}{\left(\frac{A_{30IS} + A_{209IS}}{2}\right)} \cdot V}{m \cdot RM \cdot \frac{A_{30S} + A_{209S}}{2}} \quad (\text{enačba 4})$$

kjer je c_{IS} koncentracija internega standarda (20 ng mL⁻¹), A_{RM} površina posameznega PCB kongenersa v referenčnem materialu po analiznem postopku, V volumen ekstrakta (1 mL), A_{30IS} in A_{209IS} površini internih standardov merjeni direktno na GC-ECD, m masa zatehtanega referenčnega materiala, RM deklarirana vrednost posameznega PCB kongenersa v referenčnem materialu, A_{30S} in A_{209S} površini internih standardov, ki jih damo v referenčni material pred analiznim postopkom. V Preglednici IX podajamo izkoristke analiznega postopka za posamezen PCB kongener, določene na podlagi uporabe referenčnega materiala.

Preglednica IX: Izkoristki analiznega postopka za posamezne PCB kongenerse

PCB kongener	28	52	101	118	153	138	180
Izkoristki analiznega postopka (%)	47	103	104	99	102	86	104
Standardni odmik (σ) (%)	32	12	12	13	14	15	10

Izračunani izkoristki analiznega postopka so bili za večino komponent okoli 100 %, razen za PCB kongener 28, ki je med izbranimi indikatorskimi PCB-ji najbolj hlapen. Nizek izkoristek ekstrakcije tega PCB-ja, je najverjetneje posledica izgub pri preprihovanju v toku dušika. Relativni standardni odmiki so od 12 do 32 %, kar je sprejemljivo za tovrstni analizni postopek.

6.3 Vsebnost PCB-jev v vzorcih rib iz reke Idrijce

Koncentracije (v ng mL^{-1}) posameznih kongenersov v vzorcih smo izračunali iz umeritvenih krivulj. Izkoristke analiznega postopka posameznih meritev smo upoštevali pri izračunu površin kromatografskih vrhov. Koncentracije posameznih PCB kongenersov smo preračunali na suho/mokro težo vzorca (ng g^{-1}) ter v Preglednici X podali vsote vseh 7 kongenersov na suho/mokro težo vzorca (ng g^{-1}). Vmesni rezultati analiz za posamezne vzorce pa so zbrani v poglavju 9, v Preglednicah od XI do XXIV.

Preglednica X: Vsote vseh sedmih indikatorskih PCB-jev v vzorcih analiziranih rib glede na suho/mokro težo vzorca. Za vzorec 8 vzorčno mesto ni znano

Vzorčno mesto (VM) / Številka vzorca (VZ)	Vsota 7 PCB-jev na suho težo vzorca (ng g^{-1})	Vsota 7 PCB na mokro težo vzorca (ng g^{-1})
VM 1 / VZ 7	13,4	2,8
VM 2 / VZ 12	8,4	2,0
VM 2 / VZ 4	58,4	11,9
VM 2 / VZ 1	34,3	8,1
VM 2 / VZ 2	30,7	6,4
VM 3 / VZ 6	26,1	4,8
VM 3 / VZ 5	31,5	7,7
VM 3 / VZ 10	13,8	3,2
VM 3 / VZ 3	14,0	2,8
VM 4 / VZ 9	34,8	8,1
VM 4 / VZ 11	20,7	5,2
VM 4 / VZ 13	51,3	11,0
VM 4 / VZ 14	26,7	4,3
VZ 8*	53,8	9,1

Rezultati analiz vzorcev rib iz reke Idrijce so pokazali prisotnost PCB kongenersov v vseh 14 vzorcih. Vsote vsebnosti vseh indikatorskih PCB-jev se gibljejo med 8,4 in 58,4 ng g⁻¹ na suho težo vzorca oziroma med 2,0 in 11,9 ng g⁻¹ na mokro težo vzorca. Najvišje vsote vseh indikatorskih PCB kongenersov so v vzorcih 4, 8 ter 13, in sicer 58,4, 53,8 in 51,3 ng g⁻¹ na suho težo vzorca.

Na splošno so koncentracije višje kloriranih PCB kongenersov v vzorcih višje. Z večanjem števila klorovih atomov v bifenilni strukturi se namreč povečujejo njihove lipofilne lastnosti in s tem njihova sposobnost bioakumulacije v maščobnih tkivih rib. Najvišji sta vrednosti PCB kongenersov 153 in 138 (heksaklorobifenila), sledijo jima PCB kongenersa 118 in 101 (pentaklorobifenila) in PCB kongener 180 (heptaklorobifenil). Manjšo vsebnost PCB kongenersa 180, v primerjavi z drugimi kongenersi, lahko pojasnimo s tem, da so molekule s sedmimi ali večimi klorovimi atomi v bifenilni strukturi tako velike, da le s težavo prehajajo skozi fosfolipidne celične membrane in se zato v tkivih akumulirajo v manjši meri (43). Nižje klorirana kongenersa (PCB 28 in 52) nista bila prisotna v vseh 14 analiziranih vzorcih rib iz reke Idrijce.

Literaturni podatki kažejo, da je na svetu več področij, ki imajo občutno višje vsebnosti PCB-jev v različnih matrikah, in so največkrat posledica močno razvite industrije. Tovrstni primer so območja Velikih jezer in reke Hudson v ZDA ter ustje reke Rio de la Plata v Argentini, kjer je kontaminacija rib s PCB-ji občutno večja kot drugod po svetu (44). V primerjavi z vsebnostmi PCB-jev, ki so jih v ribah iz Michiganskih vod, vključno z ribami iz Velikih jezer v Kanadi, določili Kannan in sodelavci (45), so vsebnosti indikatorskih PCB-jev v naših vzorcih izredno majhne. Visoke vsebnosti indikatorskih PCB-jev v Michiganskih vodah, ki se gibljejo od 11 do 5600 ng g⁻¹ mokre teže vzorca rib (45), so verjetno posledica onesnaževanja tamkajšnjega okolja z industrijskimi odpadki, ki vsebujejo PCB-je.

V Sloveniji je zaradi nepravilnega odlaganja izrabljenih PCB olj, v drugi polovici prejšnjega stoletja, prišlo do onesnaženja s PCB-ji v okolici Semiča v Beli Krajini. Po prepovedi uporabe PCB olj leta 1985, so na prizadetem območju začeli s sanacijskim programom. Rezultati nadzornih meritev med leti 1984 – 2005 (46), kažejo padec vsebnosti PCB-jev v ribah iz reke Krupe z 10 – 2000 µg g⁻¹ (1984) na 6 – 65 µg g⁻¹ (2005).

Zakonodaja glede vsebnosti PCB-jev v različnih vrstah hrane in njihovih proizvodih, med drugim tudi ribah in njihovih proizvodih, v Evropski Uniji ni enotna. Tako naprimer v Belgiji, dovoljena vsota 7 »indikatorskih PCB-jev« na kg ribjega proizvoda znaša 75 µg. V Franciji je dovoljena vsota 7 »indikatorskih PCB-jev« določena na kg maščobe ribjega proizvoda, in znaša 200 µg. Na Madžarskem je dovoljena vsota vseh PCB-jev na kg ribjega proizvoda 1 mg na kg proizvoda, na Nizozemskem pa 620 µg na kg proizvoda. V Sloveniji dovoljena vsota »indikatorskih PCB-jev« v ribjih proizvodih ni določena.

Zaradi pomanjkljive zakonodaje, smo rezultate analiz vsebnosti PCB-jev v vzorcih rib iz reke Idrijce ovrednotili z mejo tolerance, ki jo določa FDA (Agencija za hrano in zdravila) (44, 45) in znaša 2000 ng (vsota vseh PCB-jev) na gram mokre teže jedilnega dela ribe. Glede na to vrednost, so vsote vsebnosti »indikatorskih PCB-jev«, ki so glavni pokazatelj kontaminacije bioloških vzorcev s PCB-ji in predstavljajo glavni delež vseh PCB-jev, določene v vzorcih rib iz reke Idrijce, bistveno nižje od mejne vrednosti. Tako nizke koncentracije PCB-jev v ribah iz reke Idrijce ne potrjujejo neuradnih govoric o nepravilnemu odlaganju odpadkov, kontaminiranih s PCB-ji, v bližini reke Idrijce, niti ne predstavljajo grožnje za človeško zdravje ob njihovem uživanju.

7 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo merili vsebnost polikloriranih bifenilov v 14 vzorcih rib ulovljenih v reki Idrijci leta 2003. Za analizo smo izbrali 7 »indikatorskih polikloriranih bifenilov« (28, 52, 101, 118, 138, 153 in 180), ki so reprezentativni za komercialne tehnične mešanice polikloriranih bifenilov.

Analizni postopek za določanje polikloriranih bifenilov v bioloških vzorcih sestavljajo:

- ekstrakcija po Soxhletu z mešanico heksana in acetona (1:1, v/v)
- odstranitev lipidne frakcije s 96 % žveplovo kislino
- ločba od ostalih organskih onesnažil na koloni polnjeni s florisilom
- koncentriranje vzorcev v toku dušika
- kvalitativno in kvantitativno analiza s plinsko kromatografijo z detektorjem na zajetje elektronov

Kvalitativno določitev vsebnosti polikloriranih bifenilov smo potrdili z analizo istih vzorcev na kapilarni koloni z drugo stacionarno fazo ter z metodo standardnega dodatka. Kvantitativna določitev je potekala na osnovi umeritvenih krivulj izbranih kongenersov.

- validacija analiznega postopka

Analizni postopek določitve vsebnosti PCB-jev v ribah iz reke Idrijce smo validirali z določitvijo meje zaznavnosti/določljivosti za analizni postopek in instrument, z določitvijo linearnosti in izkoristka analiznega postopka z uporabo referenčnega materiala, ki je bil nad 86% za večino izbranih kongenersov.

Na osnovi vsote vsebnosti izbranih 7 polikloriranih bifenilov v vzorcih jedilnih delov rib iz reke Idrijce (do 58,4 ng g⁻¹) sklepamo, da so izbrane komponente prisotne v nizkih koncentracijah in ne nakazujejo bližine »divjih« odlagališč polikloriranih bifenilov. Prav tako sklepamo, da uživanje rib iz Idrijce ne ogroža človekovega zdravja, saj je meja tolerance za vnos vseh polikloriranih bifenilov v jedilnem delu ribe (ameriška FDA, Agencija za zdravila in hrano) v mikrogramskem območju na gram mokre teže ribe, določena vsota izbranih sedmih »indikatorskih polikloriranih bifenilov« v vzorcih rib iz Idrijce, pa najmanj stokrat nižja.

8 LITERATURA

- (1) Johansen B E: The dirty dozen: Toxic chemicals and Earth's future, Praeger Publishers, Westport, 2003: 1-45.
- (2) Polič S: Onesnaženost in ekološke obremenitve okolja kraškega območja reke Krupe s polikloriranimi bifenili-PCB. Doktorska disertacija. Ljubljana: Biotehnična fakulteta, Področje Varstvo okolja, 2005: 1-15.
- (3) Watson D H: Pesticide, veterinary and other residues in food, 4th ed., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2004: 519-524.
- (4) Jensen S: The PCB story. *Ambio*, 1972; 1: 123-131.
- (5) Baird C: Environmental chemistry, 2nd ed., W.H. Freeman and Company, New York, 2003: 310-372.
- (6) Sklarew D S, Girvin D C: Reviews of environmental contamination and toxicology, Attenuation of Polychlorinated Biphenyls in soils, Springer- Verlag, New York, 1987; 98: 1-5.
- (7) Ballschmitter K, Rappe C, Buser H R: Chemical properties, analytical methods and environmental levels of PCBs, PCTs, PCNs and PBBs. V: Kimbrough R D, Jensen A A: Halogenated Biphenyls, terphenyls, naphthalens, dibenzodioxins and related products. *Topics in environmental health*, 1989; 4: 47-69.
- (8) Department for Environment, Food and Rural Affairs and the Environment Agency: Contaminants in soil: Collation of toxicological data and intake values for humans. Dioxins, furans and dioxin-like PCBs, Environment Agency, Bristol, 2003: 1-5.
- (9) Kogevinas M: Human health effects of dioxins: cancer, reproductive and endocrine system effects. *Human Reproductive Update*, 2001; 7: 331-339.
- (10) Fiedler H, Hutzinger O, Timms C: Dioxins: Sources of environmental load and human exposure. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 1990; 29: 157-243.
- (11) Kodba Z: Določevanje PCB v sedimentu Krupe in vrednotenje toksičnih ekvivalentnih faktorjev. Magistrsko delo. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 1998: 7-14.
- (12) Jemec M: Določanje toksičnih polikloriranih bifenilov v bioloških vzorcih. Diplomsko delo. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 1996: 6.

- (13) Dewailly E, Ayotte P, Bruneau S, Laliberte C, Muir D C G, Nordstrom R J: Human exposure to Polychlorinated Biphenyls through the Aquatic Food Chain in the Arctic. *Organohalogen Compounds*, 1993: 173-76.
- (14) Thornton J: *Pandora's Poison: Chlorine, Health, and a New Environmental Strategy*, MIT Press, Cambridge, 2000: 34.
- (15) Schmidt P, Kohler M, Gujer E, Zennegg M, Lanfranchi M: Persistent organic pollutants, brominated flame retardants and synthetic musks in fish from remote alpine lakes in Switzerland. *Chemosphere*, 2007: 1-2.
- (16) <http://www.on.ec.gc.ca/laws/coa/atmospheric-e.html> (31.10. 2007).
- (17) Kuratsune M, Yoshimura T, Matsuzaka J, Yamaguchi M: Epidemiologic study on Yusho, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial brand of polychlorinated biphenyls. *Environmental Health Perspectives*, 1972; 109: 119-128.
- (18) Olie K, Vermeulen P L, Hutzinger O: Chlorodibenzo-p-dioxins and chlorodibenzofurans and trace components of fly ash and flue gas of some municipal incinerators in Netherlands. *Chemosphere* 1977; 8: 455-459.
- (19) Livingstone D R: *Cytochrome P-450 in Pollution Monitoring. Use of Cytochrome P-450 1A (CYP1A) as a Biomarker of Organic Pollution in Aquatic and other Organisms*. V: Richardson M: *Environmental Xenobiotics*, Taylor & Francis, London & Bristol, 1996: 143-160.
- (20) Guo J, Sartot M, Karayalas, Medvedovic M, Kann S, Puga A, Ryan P, Tomlinson C G: Expression of genes in the TGF- β signalling pathway is significantly deregulated in smooth muscle cells from aorta of aryl hydrocarbon receptor knockout mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004: 79-89.
- (21) http://en.wikipedia.org/wiki/Aryl_hydrocarbon_receptor (12.11.2007).
- (22) van den Berg M, Birnbaum L S, Bosveld A T C, Brunström B, Cook P, Feeley M, Giesy J P, Henberg A, Hasegawa R, Kennedy S W, Kubiak T, Larsen J C, van Leeuwen F X R, Liem A K D, Nolt C, Peterson R E, Poellinger L, Safe S, Schrenk D, Tillitt D, Tysklind M, Younes M, Wärn F, Zacharewski T: Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives*, 1998; 106: 775-792.
- (23) Olson R K: *Poisoning & Drug Overdose*, 5th ed, The McGraw-Hill companies, Inc., New York, 2004: 321-322.

- (24) Barcelo D: Environmental Analysis, Techniques, Applications and Quality Assurance, Elsevier, Amsterdam, 1993: 141.
- (25) Geyer H J, Rimkus G G, Scheunert I, Kaune A, Schramm K W, Kettrup A, Zeeman M, Muir D C G, Hansen L G, Mackay D: Bioaccumulation and occurrence of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) persistent organic pollutants (POPs), and other organic compounds in fish and other organisms including humans, in B. Beek. Bioaccumulation, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. 2, part J: 1-178.
- (26) Colborn T, Dumanoski D, Myers J P: Our stolen Future: Are we threatening our fertility, intelligence and survival?, A scientific detective story, Penguin, New York, 1996.
- (27) Družina B: National Implementation Plan for the Management of persistent Organic Pollutants. University College of Health Care, University of Ljubljana, Slovenia. (NATO/CCMS Pilot Study Meeting Prevention and Remediation in Selected Industrial Sectors: Mega sites, June 12-15, 2005, Ottawa, Canada).
- (28) Sporning S, Böwadt S, Svensmark B, Björklund E: Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil, Journal of Chromatography A 2005; 1090: 1-9.
- (29) Antonić J: Določanje ostankov zdravilnih učinkovin v sedimentih. Diplomsko delo. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2005: 13-23.
- (30) Hess P, de Boer J, Cofino W P, Leonards P E G, Wells D E.: Critical review of the analysis of non- and mono-ortho-chlorobiphenyls, Journal of Chromatography A, 1995: 417-465.
- (31) http://www.chemie.unibas.ch/~nachwuchs/chemie/modul2_4.html (5.10.2007).
- (32) Dean J R: Extraction methods for environmental analysis, John Wiley/Sons, New York, 1998: 107-110.
- (33) Skoog D A, West D M, Holler J F, Crouch S R: Analytical chemistry, 8th ed., Brooks/Cole, Belmont, 2004: 920.
- (34) Poole C F, Poole S K: Chromatography today, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1991: 1-103.
- (35) Heath E: Mikrobiološka razgradnja nekaterih poliaromatskih ogljikovodikov in identifikacija njihovih produktov. Doktorska disertacija. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 1998.

- (36) Prošek M: Plinska kromatografija, Seminar 2004.
- (37) Kosjek T: Razvoj analiznega postopka določitve ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v odpadnih vodah. Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo, 2004.
- (38) <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrm.htm> (31.10.2007).
- (39) Naglič M: Kopičenje živega srebra v tkivih izbranih ribjih vrst v reki Idrijci. Diplomaska naloga. Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 2005.
- (40) International Atomic Energy Agency, Analytical Quality Control Services, Vienna: Reference Material IAEA-406: Organochlorine Compounds and petroleum Hydrocarbons in a Fish Homogenate, November 2000.
- (41) EPA: Method 8082, Polychlorinated Biphenyls (PCBs) by Gas Chromatography, December 1996.
- (42) Knoll J E: Estimation of the limit of detection in chromatography. Journal of Chromatographic Science, 1985; 23 (9): 422-425.
- (43) Yang N, Matsuda M, Kawano M, Wakimoto T: PCBs and organochlorine pesticides (OCPs) in edible fish and shellfish from China. Chemosphere, 2006, 63: 1342-1352.
- (44) Colombo J C, Cappelletti N, Migoya M C, Esperanza E: Bioaccumulation of anthropogenic contaminants by detritivorous fish in the Rio de la Plata estuary: 2-Polychlorinated Biphenyls. Chemosphere, doi:10.1016/j.chemosphere.2007.05.073.
- (45) Kannan K, Yamashita N, Imagawa T, Decoen W, Khim J S, Day R M, Summer C L, Giesy J P: Polychlorinated Naphtalens and Polychlorinated Byphenyls in Fishes from Michigan Waters Including the Great Lakes. Environmental Science Technologies 2000, 34: 566-572.
- (46) dr. Svetozar Polič: Recenzija zaključnega poročila »Posledice vpliva PCB na okolje v Beli krajini v letu 2005« (Zavod za zdravstveno varstvo Novo mesto, št. 421-43/05): 16. november 2005.

9 PRILOGA

Preglednica XI: Vsebnost izbranih kongenersov v Vzorc 1

PCB kongener	28	52	101	118	138	153	180	Vsota 7 indikatorskih PCB-jev
Površina kromatografskega vrha	10,6	30,8	165,8	138,3	329,3	289,8	131,5	-
Izkoristek analiznega postopka (%)	58,9	58,9	58,9	58,9	58,9	58,9	58,9	-
Konc. PCB po analiznem postopku (ng mL ⁻¹)	0,73	3,74	12,33	9,74	19,26	19,82	6,87	72,5
Teža suhega/mokrega vzorca (g)	2,11/ 8,96	2,11/ 8,96	2,11/ 8,96	2,11/ 8,96	2,11/ 8,96	2,11/ 8,96	2,11/ 8,96	-
Vsebnost PCB kongenersa: suha/mokra teža (ng g ⁻¹)	<u>0,35/</u> <u>0,08</u>	<u>1,77/</u> <u>0,41</u>	<u>5,84/</u> <u>1,38</u>	<u>4,61/</u> <u>1,09</u>	<u>9,13/</u> <u>2,15</u>	<u>9,39/</u> <u>2,21</u>	<u>3,25/</u> <u>0,77</u>	<u>34,3 / 8,1</u>

Preglednica XII: Vsebnost izbranih kongenersov v Vzorc 2

PCB kongener	28	52	101	118	138	153	180	Vsota 7 indikatorskih PCB-jev
Površina kromatografskega vrha	35,2	65,6	219,7	200,3	456,1	431,8	191,1	-
Izkoristek analiznega postopka (%)	53,1	53,1	53,1	53,1	53,1	53,1	53,1	-
Konc. PCB po analiznem postopku (ng mL ⁻¹)	3,31	8,98	18,23	15,74	29,64	32,90	11,12	119,9
Teža suhega/mokrega vzorca (g)	3,91/ 18,87	3,91/ 18,87	3,91/ 18,87	3,91/ 18,87	3,91/ 18,87	3,91/ 18,87	3,91/ 18,87	-
Vsebnost PCB kongenersa: suha/mokra teža (ng g ⁻¹)	<u>0,85/</u> <u>0,18</u>	<u>2,30/</u> <u>0,48</u>	<u>4,66/</u> <u>0,97</u>	<u>4,02/</u> <u>0,83</u>	<u>7,58/</u> <u>1,57</u>	<u>8,41/</u> <u>1,74</u>	<u>2,84/</u> <u>0,59</u>	<u>30,7/ 6,4</u>

Preglednica XIII: Vsebnost izbranih kongenersov v Vzorcju 3 (p.m.d.: pod mejo detekcije analiznega postopka)

PCB kongener	28	52	101	118	138	153	180	Vsota 7 indikatorskih PCB-jev
Površina kromatografskega vrha	p.m.d.	p.m.d.	43,4	102,0	119,3	118,9	34,8	-
Izkoristek analiznega postopka (%)	57,5	57,5	57,5	57,5	57,5	57,5	57,5	-
Konc. PCB-ja po analiznem postopku (ng mL ⁻¹)	p.m.d.	p.m.d.	3,15	7,32	7,08	8,20	1,80	27,6
Teža suhega/mokrega vzorca (g)	1,97/ 9,83	1,97/ 9,83	1,97/ 9,83	1,97/ 9,83	1,97/ 9,83	1,97/ 9,83	1,97/ 9,83	-
Vsebnost PCB kongenersa: suha/mokra teža (ng g ⁻¹)	p.m.d.	p.m.d.	<u>1,60/</u> <u>0,32</u>	<u>3,72/</u> <u>0,75</u>	<u>3,60/</u> <u>0,72</u>	<u>4,16/</u> <u>0,83</u>	<u>0,91/</u> <u>0,18</u>	<u>14,0 / 2,8</u>
MDL (ng g ⁻¹)	0,01	0,04	0,01	0,02	0,01	0,01	0,04	-

Preglednica XIV: Vsebnost izbranih kongenersov v Vzorcju 4

PCB kongener	28	52	101	118	138	153	180	Vsota 7 indikatorskih PCB-jev
Površina kromatografskega vrha	35,1	56,9	285,8	237,3	539,0	535,7	269,2	-
Izkoristek analiznega postopka (%)	56,4	56,4	56,4	56,4	56,4	56,4	56,4	-
Konc. PCB po analiznem postopku (ng mL ⁻¹)	3,09	7,31	22,37	17,57	33,0	38,46	14,78	136,6
Teža suhega/mokrega vzorca (g)	2,34/ 11,5	2,34/ 11,5	2,34/ 11,5	2,34/ 11,5	2,34/ 11,5	2,34/ 11,5	2,34/ 11,5	-
Vsebnost PCB kongenersa: suha/mokra teža (ng g ⁻¹)	<u>1,32/</u> <u>0,27</u>	<u>3,12/</u> <u>0,64</u>	<u>9,56/</u> <u>1,95</u>	<u>7,51/</u> <u>1,53</u>	<u>14,10</u> <u>2,87</u>	<u>16,44/</u> <u>3,34</u>	<u>6,32/</u> <u>1,29</u>	<u>58,4 / 11,9</u>

Preglednica XV: Vsebnost izbranih kongenersov v Vzorcju 5

PCB kongener	28	52	101	118	138	153	180	Vsota 7 indikatorskih PCB-jev
Površina kromatografskega vrha	20,64	148,4	373,5	406,2	465,2	429,4	115,3	-
Izkoristek analiznega postopka (%)	67,7	67,7	67,7	67,7	67,7	67,7	67,7	-
Konc. PCB-ja po analiznem postopku (ng mL ⁻¹)	1,40	16,01	24,38	25,11	23,69	25,61	5,22	121,4
Teža suhega/mokrega vzorca (g)	3,86/ 15,69	3,86/ 15,69	3,86/ 15,69	3,86/ 15,69	3,86/ 15,69	3,86/ 15,69	3,86/ 15,69	-
Vsebnost PCB kongenersa: suha/mokra teža (ng g ⁻¹)	<u>0,36/</u> <u>0,09</u>	<u>4,15/</u> <u>1,0</u>	<u>6,32/</u> <u>1,55</u>	<u>6,51/</u> <u>1,60</u>	<u>6,14/</u> <u>1,51</u>	<u>6,64/</u> <u>1,63</u>	<u>1,35/</u> <u>0,33</u>	<u>31,5 / 7,7</u>

Preglednica XVI: Vsebnost izbranih kongenersov v Vzorcju 6

PCB kongener	28	52	101	118	138	153	180	Vsota 7 indikatorskih PCB-jev
Površina kromatografskega vrha	20,3	75,2	289,2	205,5	356,4	365,1	78,5	-
Izkoristek analiznega postopka (%)	45,6	45,6	45,6	45,6	45,6	45,6	45,6	-
Konc. PCB po analiznem postopku (ng mL ⁻¹)	2,15	12,01	28,06	18,83	26,96	32,38	5,27	125,7
Teža suhega/mokrega vzorca (g)	4,81/ 26,06	4,81/ 26,06	4,81/ 26,06	4,81/ 26,06	4,81/ 26,06	4,81/ 26,06	4,81/ 26,06	-
Vsebnost PCB kongenersa: suha/mokra teža (ng g ⁻¹)	<u>0,45/</u> <u>0,08</u>	<u>2,50/</u> <u>0,46</u>	<u>5,83/</u> <u>1,08</u>	<u>3,91/</u> <u>0,72</u>	<u>5,61/</u> <u>1,05</u>	<u>6,73/</u> <u>1,24</u>	<u>1,10/</u> <u>0,20</u>	<u>26,1 / 4,8</u>

Preglednica XVII: Vsebnost izbranih kongenerov v Vzorcju 7 (p.m.d.: pod mejo detekcije analizne metode)

PCB kongener	28	52	101	118	138	153	180	Vsota 7 indikatorskih PCB-jev
Površina kromatografskega vrha	p.m.d.	13,3	29,4	33,0	72,3	77,2	48,1	-
Izkoristek analiznega postopka (%)	72,5	72,5	72,5	72,5	72,5	72,5	72,5	-
Konc. PCB po analiznem postopku (ng mL ⁻¹)	p.m.d.	1,24	1,59	1,77	3,35	4,11	1,98	14,0
Teža suhega/mokrega vzorca (g)	1,05/ 5,1	1,05/ 5,1	1,05/ 5,1	1,05/ 5,1	1,05/ 5,1	1,05/ 5,1	1,05/ 5,1	-
Vsebnost PCB kongenera: suha/mokra teža (ng g ⁻¹)	p.m.d.	<u>1,18/</u> <u>0,24</u>	<u>1,52/</u> <u>0,31</u>	<u>1,69/</u> <u>0,35</u>	<u>3,19/</u> <u>0,66</u>	<u>3,91/</u> <u>0,81</u>	<u>1,89/</u> <u>0,39</u>	<u>13,4 / 2,8</u>
MDL(ng g ⁻¹)	0,01	0,04	0,01	0,02	0,01	0,01	0,04	-

Preglednica XVIII: Vsebnost izbranih kongenerov v Vzorcju 8

PCB kongener	28	52	101	118	138	153	180	Vsota 7 indikatorskih PCB-jev
Površina kromatografskega vrha	6,6	26,7	223,3	244,9	342,1	459,4	183,3	-
Izkoristek analiznega postopka (%)	43,9	43,9	43,9	43,9	43,9	43,9	43,9	-
Konc. PCB po analiznem postopku (ng mL ⁻¹)	0,57	4,37	22,46	23,34	26,88	42,40	12,92	132,9
Teža suhega/mokrega vzorca (g)	2,47/ 14,64	2,47/ 14,64	2,47/ 14,64	2,47/ 14,64	2,47/ 14,64	2,47/ 14,64	2,47/ 14,64	-
Vsebnost PCB kongenera: suha/mokra teža (ng g ⁻¹)	<u>0,23/</u> <u>0,04</u>	<u>1,77/</u> <u>0,30</u>	<u>9,09/</u> <u>1,53</u>	<u>9,45/</u> <u>1,59</u>	<u>10,88</u> <u>1,84</u>	<u>17,17</u> <u>2,90</u>	<u>5,23/</u> <u>0,88</u>	<u>53,8 / 9,1</u>

Preglednica XIX: Vsebnost izbranih kongenersov v Vzorcju 9

PCB kongener	28	52	101	118	138	153	180	Vsota 7 indikatorskih PCB-jev
Površina kromatografskega vrha	97,9	103,5	303,5	472,6	669,8	615,6	183,3	-
Izkoristek analiznega postopka (%)	54,3	54,3	54,3	54,3	54,3	54,3	54,3	-
Konc. PCB-ja po analiznem postopku (ng mL ⁻¹)	9,39	13,91	24,70	36,50	42,61	45,95	10,43	183,5
Teža suhega/mokrega vzorca (g)	5,27/ 22,79	5,27/ 22,79	5,27/ 22,79	5,27/ 22,79	5,27/ 22,79	5,27/ 22,79	5,27/ 22,79	-
Vsebnost PCB kongenersa: suha/mokra teža (ng g ⁻¹)	<u>1,78/</u> <u>0,41</u>	<u>2,64/</u> <u>0,61</u>	<u>4,69/</u> <u>1,08</u>	<u>6,93/</u> <u>1,60</u>	<u>8,09/</u> <u>1,87</u>	<u>8,72/</u> <u>2,02</u>	<u>1,98/</u> <u>0,46</u>	<u>34,8 / 8,1</u>

Preglednica XX: Vsebnost izbranih kongenersov v Vzorcju 10

PCB kongener	28	52	101	118	138	153	180	Vsota 7 indikatorskih PCB-jev
Površina kromatografskega vrha	23,7	116,6	144,8	113,0	103,6	100,9	26,3	-
Izkoristek analiznega postopka (%)	60,6	60,6	60,6	60,6	60,6	60,6	60,6	-
Konc. PCB po analiznem postopku (ng mL ⁻¹)	1,86	14,04	10,44	7,70	5,81	6,55	1,27	47,7
Teža suhega/mokrega vzorca (g)	3,45/ 14,88	3,45/ 14,88	3,45/ 14,88	3,45/ 14,88	3,45/ 14,88	3,45/ 14,88	3,45/ 14,88	-
Vsebnost PCB kongenersa: suha/mokra teža (ng g ⁻¹)	<u>0,54/</u> <u>0,13</u>	<u>4,07/</u> <u>0,94</u>	<u>3,03/</u> <u>0,70</u>	<u>2,23/</u> <u>0,52</u>	<u>1,68/</u> <u>0,39</u>	<u>1,90/</u> <u>0,44</u>	<u>0,37/</u> <u>0,09</u>	<u>13,8 / 3,2</u>

Preglednica XXI: Vsebnost izbranih kongenersov v Vzorcju 11

PCB kongener	28	52	101	118	138	153	180	Vsota 7 indikatorskih PCB-jev
Površina kromatografskega vrha	26,1	59,0	212,7	240,1	350,8	284,8	105,5	-
Izkoristek analiznega postopka (%)	74,3	74,3	74,3	74,3	74,3	74,3	74,3	-
Konc. PCB po analiznem postopku (ng mL ⁻¹)	1,65	5,73	12,55	13,46	16,24	15,39	4,34	69,4
Teža suhega/mokrega vzorca (g)	3,35/ 13,47	3,35/ 13,47	3,35/ 13,47	3,35/ 13,47	3,35/ 13,47	3,35/ 13,47	3,35/ 13,47	-
Vsebnost PCB kongenersa: suha/mokra teža (ng g ⁻¹)	<u>0,49/</u> <u>0,12</u>	<u>1,71/</u> <u>0,43</u>	<u>3,75/</u> <u>0,93</u>	<u>4,02/</u> <u>1,00</u>	<u>4,85/</u> <u>1,21</u>	<u>4,59/</u> <u>1,14</u>	<u>1,29/</u> <u>0,32</u>	<u>20,7 / 5,2</u>

Preglednica XXII: Vsebnost izbranih kongenersov v Vzorcju 12

PCB kongener	28	52	101	118	138	153	180	Vsota 7 indikatorskih PCB-jev
Površina kromatografskega vrha	17,2	29,2	41,8	37,3	113,6	112,6	57,1	-
Izkoristek analiznega postopka (%)	58,8	58,8	58,8	58,8	58,8	58,8	58,8	-
Konc. PCB po analiznem postopku (ng mL ⁻¹)	1,33	3,55	2,96	2,52	6,58	7,57	2,94	27,5
Teža suhega/mokrega vzorca (g)	3,27/ 13,71	3,27/ 13,71	3,27/ 13,71	3,27/ 13,71	3,27/ 13,71	3,27/ 13,71	3,27/ 13,71	-
Vsebnost PCB kongenersa: suha/mokra teža (ng g ⁻¹)	<u>0,41/</u> <u>0,10</u>	<u>1,09/</u> <u>0,26</u>	<u>0,90/</u> <u>0,22</u>	<u>0,77/</u> <u>0,18</u>	<u>2,01/</u> <u>0,48</u>	<u>2,32/</u> <u>0,55</u>	<u>0,90/</u> <u>0,21</u>	<u>8,4 / 2,0</u>

Preglednica XXIII: Vsebnost izbranih kongenersov v Vzorcju 13

PCB kongener	28	52	101	118	138	153	180	Vsota 7 indikatorskih PCB-jev
Površina kromatografskega vrha	83,1	203,0	435,9	605,9	751,5	674,3	248,6	-
Izkoristek analiznega postopka (%)	58,2	58,2	58,2	58,2	58,2	58,2	58,2	-
Konc. PCB po analiznem postopku (ng mL ⁻¹)	7,39	25,53	33,17	43,69	44,61	46,97	13,21	214,6
Teža suhega/mokrega vzorca (g)	4,18/ 19,48	4,18/ 19,48	4,18/ 19,48	4,18/ 19,48	4,18/ 19,48	4,18/ 19,48	4,18/ 19,48	-
Vsebnost PCB kongenersa: suha/mokra teža (ng g ⁻¹)	<u>1,77/</u> <u>0,38</u>	<u>6,11/</u> <u>1,31</u>	<u>7,94/</u> <u>1,70</u>	<u>10,45</u> <u>2,24</u>	<u>10,67</u> <u>2,29</u>	<u>11,24</u> <u>2,41</u>	<u>3,16/</u> <u>0,68</u>	<u>51,3 / 11,0</u>

Preglednica XXIV: Vsebnost izbranih kongenersov v Vzorcju 14 (p.m.d.: pod mejo
detekcije analizne metode)

PCB kongener	28	52	101	118	138	153	180	Vsota 7 indikatorskih PCB-jev
Površina kromatografskega vrha	p.m.d.	p.m.d.	19,4	46,4	109,8	90,4	135,4	-
Izkoristek analiznega postopka (%)	71,5	71,5	71,5	71,5	71,5	71,5	71,5	-
Konc. PCB po analiznem postopku (ng mL ⁻¹)	p.m.d.	p.m.d.	1,00	2,58	5,21	4,92	5,81	19,5
Teža suhega/mokrega vzorca (g)	0,73/ 4,51	0,73/ 4,51	0,73/ 4,51	0,73/ 4,51	0,73/ 4,51	0,73/ 4,51	0,73/ 4,51	-
Vsebnost PCB kongenersa: suha/mokra teža (ng g ⁻¹)	p.m.d.	p.m.d.	<u>1,36/</u> <u>0,22</u>	<u>3,54/</u> <u>0,57</u>	<u>7,14/</u> <u>1,16</u>	<u>6,74/</u> <u>1,09</u>	<u>7,96/</u> <u>1,29</u>	<u>26,7 / 4,3</u>
MDL(ng g ⁻¹)	0,01	0,04	0,01	0,02	0,01	0,01	0,04	-

