Organoklorovi spojevi u ribi iz Jadranskog mora

Štrbac, Mirna

Master's thesis / Diplomski rad

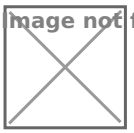
2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:060158

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

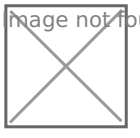


Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository







SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Istraživanje i razvoj lijekova

Mirna Štrbac

Organoklorovi spojevi u ribi iz Jadranskog mora

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Istraživanje i razvoj lijekova

Mirna Štrbac

Organoklorovi spojevi u ribi iz Jadranskog mora

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

Mentor rada: Dr.sc. Snježana Herceg Romanić

Komentor rada: Prof. dr. sc. Ana Lucić Vrdoljak

Diplomski rad je obranjen dana 19.02.2020. pred povjerenstvom:

1. Doc. dr. sc. Željka Maglica
2. Izv. prof. dr. sc. Elitza Markova Car
3. Dr. sc. Snježana Herceg Romanić
4. Prof. dr. sc. Ana Lucić Vrdoljak

Rad ima 40 stranica, 13 slika, 12 tablica i 33 literaturna navoda.

Sažetak:

Postojani organski spojevi (POPs) su spojevi od globalnog značaja jer značajno utječu na okoliš i ljudsko zdravlje. Razine i raspodjela 17 pojedinačnih kongenera PCB-a i 7 organoklorovih pesticida su istraživane u mišićnom tkivu srdele ulovljene u Jadranskom moru. Svi analizirani spojevi su pronađeni u uzorcima srdela. Indikatorski PCB-153 bio je najzastupljeniji kongener PCB-a. Također su bili dominantni kongeneri PCB-138 i PCB-180. Raspon masenih udjela indikatorskih kongenera PCB-a bio je od 0.06 *ng* g^{-1} do 3.29 *ng* g^{-1}. Raspon toksikološki značajnih PCB-a bio je od 0.02 *ng* g^{-1} do 1.16 *ng* g^{-1}. Raspon masenih udjela OCP-a u srdeli bio je od 0.02 *ng* g^{-1} do 2.32 *ng* g^{-1}. Najdominantniji pesticid u uzrocima bio je *p,p'*-DDE. Statističkom analizom podataka nisu pronađene značajne razlike u razinama onečišćenja između grupa uzoraka. Rezultati istraživanja su pokazali da su srdele sigurne za konzumaciju na temelju toksikološki relevantnih parametara.

Ključne riječi: poliklorirani bifenili, organoklorovi pesticidi, morska riba, onečišćenje mora, Jadransko more

Summary:

Persistent organic pollutants (POPs) are compounds of global importance because they have a significant impact on the environment and human health. The levels and distribution of 17 individual PCB congeners and 7 organochlorine pesticides were investigated in the muscle tissue of sardines caught in the Adriatic Sea. All the compounds analyzed were found in sardine samples. Indicator PCB-153 was the most dominant PCB congener. PCB-138 and PCB-180 congeners were also dominant. The range of PCB indicator congeners was from 0.06 *ng* g^{-1} to 3.29 *ng* g^{-1}. The range of toxicologically significant PCBs was from 0.02 *ng* g^{-1} to 1.16 *ng* g^{-1}. The range of the OCP sardine was from 0.02 *ng* g^{-1} to 2.32 *ng* g^{-1}. The most dominant pesticide in samples was *p,p'*-DDE. Statistical analysis of the data did not reveal significant differences in contamination levels between the sample groups. Based on toxicologically relevant parameters our results have shown that sardines are safe for consumption.

Key words: polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, marine fish, marine pollution, Adriatic sea

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Organoklorovi spojevi 1

1.2. Fizikalno kemijska svojstva poliklorbifenila i organoklorovih spojeva 2

1.2.1. Poliklorbifenili 2

1.2.2. DDT, DDE, DDD 3

1.2.3. Heksaklorbenzen 4

1.2.4. Heksaklorcikloheksan 5

1.3. Primjena poliklorbifenila i organoklorovih pesticida i raspodjela u okolišu 6

1.4. Toksični učinci PCB i OCP 8

1.5. Faktor ekvivalentne toksičnosti 9

1.6. Razine poliklorbifenila i organoklorovih pesticida u ribama 13

2. CILJ RADA 20

3. MATERIJALI I METODE 21

3.1. Priprema standardnih otopina 21

3.2. Prikupljanje uzoraka 22

3.3. Priprema uzorka 23

3.3.1. Ekstrakcija 24

3.3.2. Pročišćavanje uzorka 24

3.4. Plinska kromatografija 25

3.5. Određivanje djelotvornosti ekstrakcije 27

3.6. Statistička analiza podataka 27

4. REZULTATI 28

4.1. Razine poliklorbifenila i organoklorovih pesticida u srdeli iz Jadranskog mora 28

4.2. Procjena rizika 31

5. RASPRAVA 32

7. LITERATURA 35

8. ZAHVALA 38

9. ŽIVOTOPIS ..... **Error! Bookmark not defined.**

1. UVOD

1.1. Organoklorovi spojevi

Polikloriranibifenili (PCB) i organoklorovi pesticidi (OCP) pripadaju grupi postojanih organskih spojeva (POPs-*Persistent Organic Pollutants*)(1). Predmet su *Stocholmske konvencije* o postojanim organskim onečišćujućim tvarima, čije se odredbe odnose na smanjenje i sprečavanje ispuštanja postojanih organskih spojeva u okoliš.(2) PCB i OCP su aromatski spojevi sintetizirani početkom 20.st.(1) Primjenjivali su se intenzivno u poljoprivredi, industriji i javnom zdravstvu. Njihova upotreba je 70 godina u prošlom stoljeću zabranjena ili ograničena zbog štetnog utjecaja na okoliš i po zdravlje čovjeka i životinja.(3)

OCP i PCB su sličnih fizikalno-kemijskih svojstava. Karakterizira ih slaba topljivost u vodi, te velika lipofilnost i dugotrajna postojanost u okolišnim uvjetima i sklonost koncentriranju u masnim tkivima živih organizama.(4) Zbog tih svojstava usprkos zabrani ili ograničenju njihove upotrebe, dugo se zadržavaju u okolišu i ulaze u hranidbeni lanac. U okolišu se nalaze u svim dijelovima (voda, kopno, tlo, živi organizmi) diljem svijeta, uključujući i gdje nikada nisu primjenjivani. (5)

U morski dio okoliša OCP i PCB dospijevaju taloženjem iz atmosfere, putem ispiranja i odvodnje zemljišta (i poljoprivrednog), rijekama te ispuštanjem gradskog i industrijskog otpada. U morskom dijelu okoliša zbog lipofilnosti vežu se na suspendirane čestice (koje se talože na dno), a u organizme ulaze iz vode (npr. kroz škrge riba) i/ili kroz niz u hranidbenom lancu. Predatorske vrste sadrže najviše razine tih spojeva.

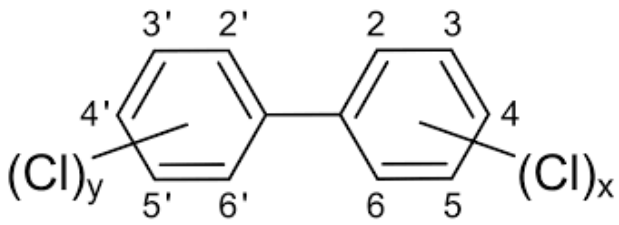
Velika rasprostranjenost OCP i PCB utječe na zdravlje čovjeka, stoga su predmet mnogih istraživanja. Najznačajniji unos u čovjeka je hranom, a zatim udisanjem onečišćenog zraka i kontaktom kožom.(6)

1.2. Fizikalno kemijska svojstva poliklorbifenila i organoklorovih spojeva

1.2.1. Poliklorbifenili

Poliklorbifenili su grupa kloriranih aromatskih spojeva. Sintetskog su porijekla, opće kemijske formule $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ (Slika 1), gdje *n* označava broj klorovih atoma koji može biti od 1 do 10.(7)

Obzirom na broj i položaj klorovih atoma postoji ukupno 209 izomera i homologa koji se nazivaju kongeneri. Svaki pojedinačno nosi brojčanu oznaku od 1-209, koja je prihvaćena od *Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju* (IUPAC).(8)



Slika 1 Opća strukturna forumula polikloriranih bifenila

Kongeneri PCB-a su lipofilni. Povećanjem broja klorovih atoma povećava se njihova lipofilnost, a smanjuje se topljivost u vodi. Po svom izgledu su bezbojni kristalinični spojevi. Komercijalne smjese PCB-a dolaze u obliku ulja ili smola, te su postojane i na nižim temperaturama jer ne kristaliziraju. Karakterizira ih niska električna vodljivost i zapaljivost. (4)

1.2.2. DDT, DDE, DDD

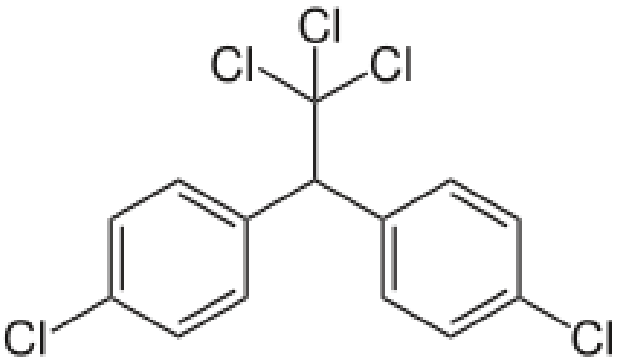
DDT je organoklorov insekticid, koji je bijela kristalizirana krutina, bez okusa. (9)

DDT je zajednički naziv za sintetsku kemikaliju i ne pojavljuje se u prirodno u okolišu (Slika 2). Tehnički DDT je smjesa čije su glavne komponente *p,p'*-DDT (63-77%), *o,p'*-DDT(8-21%) i *p,p'*-DDE (0,3-40%). Razlike u smjesama DDT-a se očituju u različitim proizvodnim procesima.

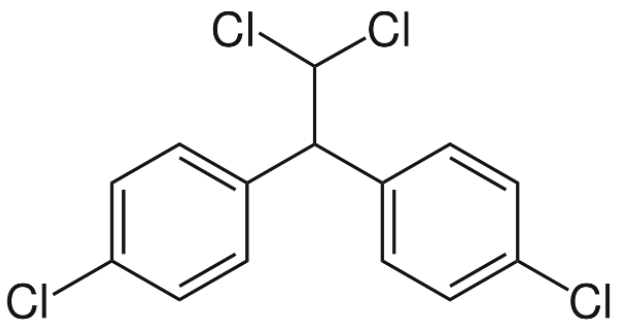
DDD (Slika 3) i DDE (Slika 4) su glavni metaboliti DDT-a u biološkim sustavima.

DDT i posebno DDE su jako otporni na degradaciju, pogotovo u hladnim i umjerenim uvjetima, te su postojani u okolišu.

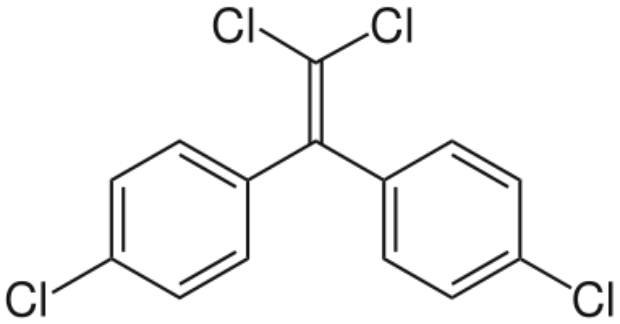
DDT je topljiv u organskim otapalima: benzenu, cikloheksanu, kloroformu, etanolu. (10)



Slika 2 Strukturna formula DDT-a



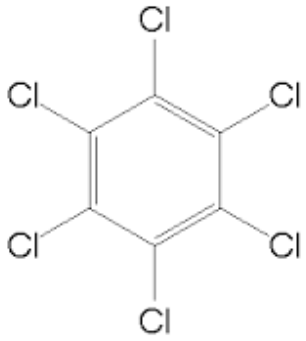
Slika 3 Strukturna formula DDD-a



Slika 4 Strukturna formula DDE-a

1.2.3. Heksaklorbenzen

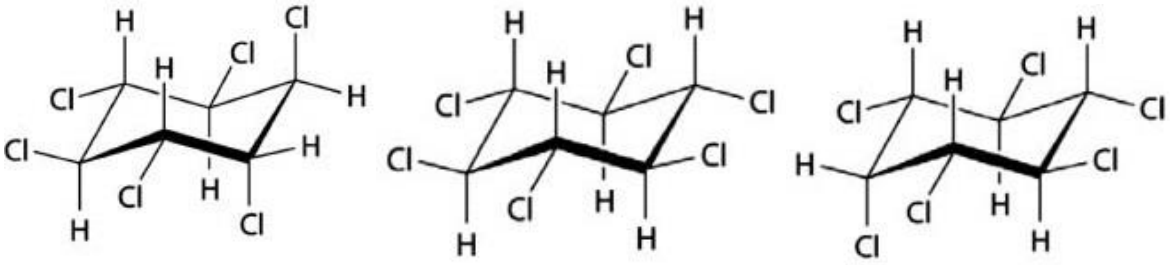
Heksaklorbenzen (HCB) je klorirani aromatski ugljkovodik, kemijske formule C_6Cl_6 (Slika 5). Proizvodi se kloriranjem benzena pri temperaturi 150° – 200 °C uz željezov klorid kao katalizator. Pri sobnoj temperaturi je bijel i kristaliničan, gotovo ne topljiv u vodi, ali topljiv u eteru , benzenu i kloroformu. Niske hlapljivosti i niske zapaljivosti. (11)



Slika 5 Strukturna forumula heksaklorbenzena

1.2.4. Heksaklorcikloheksan

HCH se sintetizira kloriranjem benzena uz djelovanje UV zraka. Sastoji se od svojih stereoizimera gdje prevladavaju 65-70 % *α*-HCH, 7-10% *β*-HCH i 14-15% *γ*-HCH, a ostatak od 10 % drugi izomeri (*δ i ε*). Kemijska formula je $C_6H_6Cl_6$ (Slika 6). HCH je krutina, slabe hlapljivosti, slabe topljivosti u vodi, ali lako topiv u acetonu, kloroformu i ksilenu. Najprimjenjivaniji je *γ* -HCH, koji čini 99% lindana.(12)



Slika 6 Strukturne formule α-HCH, β-HCH i γ-HCH

1.3. Primjena poliklorbifenila i organoklorovih pesticida i raspodjela u okolišu

Polikloriranibifenili su se zbog svojih dobrih izolacijskih svojstava i stabilnosti pri niskim temperatura počeli proizvoditi 1929. godine kao dielektrične tekućine i ulja za prijenos topline.(13) Nikada se nisu upotrebljavali kao pojedinačni spojevi nego uvijek u komercijalnim smjesama koje se međusobno razlikuju po sadržaju klora. Koristili su se još u kondenzatorima i transformatorima, kao plastifikator u bojama, tintama, tiskarama, ljepilima, te kao sastavna tekućina u plinskim turbinama i vakuum pumpi.(1, 13)

OC pesticidi su se nakon Drugog svjetskog rata primjenjivali u poljoprivredi kao insekticidi i fungicidi, za zaštitu drvene građe te u javnom zdravstvu za suzbijanje prenositelja malarije i tifusa.(6)

Danas je njihova proizvodnja i primjena ograničena ili zabranjena u razvijenim zemljama, dok se još u nekim nerazvijenim zemljama primjenjuju. Glavni izvor emisije PCB-a u okoliš nakon ograničenja i zabrana su odlagališta transformatora, kondenzatora i neadekvatno odlaganje opasnog otpada.(7)

Raspodjela PCB-a i OCP-a u okolišu određena je njihovim fizikalno kemijskim svojstvima i brojnim procesima u okolišu. Zbog svoje slabe hlapljivosti i hidrofobnosti vrlo se teško razgrađuju i opstaju duže u prirodi, te kruže između zraka, vode i tla.

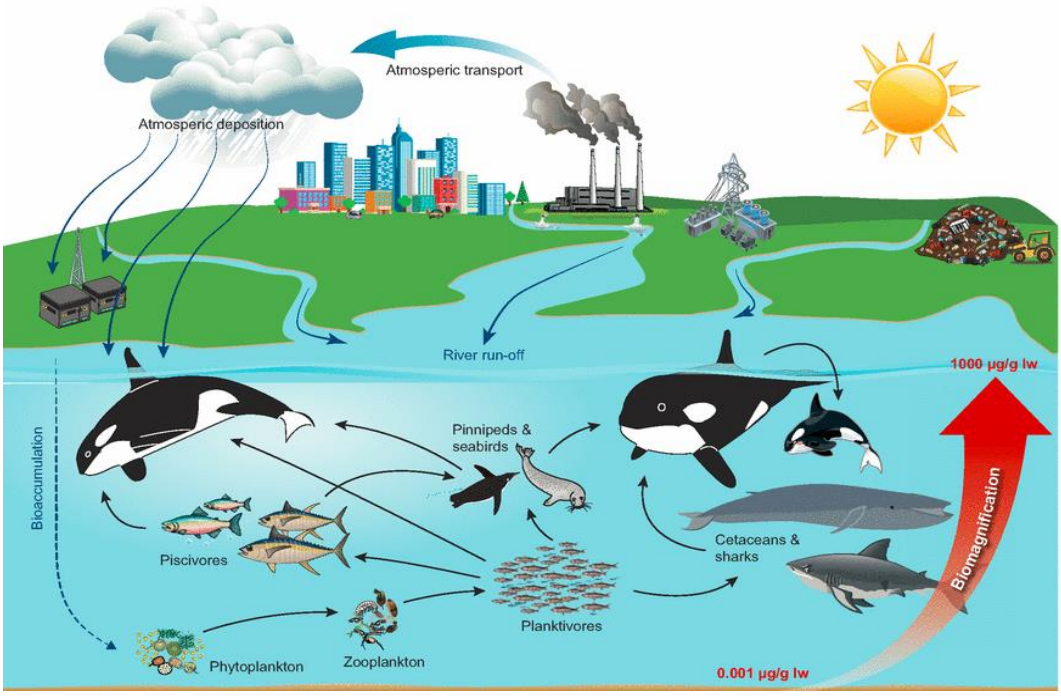
Zračnim strujanjima i ispiranjem iz zraka oborinama prenose se na velike udaljenosti od primarnog izvora zagađenja.(14)

Zbog prisutnosti organske tvari u tlu i sedimentu PCB-i i OCP-i se vrlo često vežu za njih, te tako tlo i sedimenti postaju sekundarni izvor onečišćenja voda, biljaka, životinja i naposljetku čovjeka. (7)

U vodenim sustavima PCB i OCP zbog svojih lipofilnih svojstava imaju veliku sposobnost vezanja na čestice koje su ili suspendirane u vodi ili su se već istaložile na dno.(7) Za sediment ostaju dugo vezani. Iz sedimenta

i suspendiranih čestica preko fitoplanktona ulaze u hranidbeni lanac. Ribe akumuliraju POPs-ove direktno iz vode procesom difuzije preko škrga i površine tijela, ali i hranom kroz probavni sustav.(1) Njihova intestinalna apsorpcija je brza i pomoću krvi se distribuiraju u masno tkivo i jetru.(15) Razgradnja i eliminacija organoklorovih spojeva je često spora, što dovodi do nakupljanja spojeva u organizmu tijekom vremena.

Obzirom da se PCB i OCP bioakumuliraju u živim organizmima direktno iz vode koja je njima zagađena, i/ili njihovim prijenosom kroz hranidbeni lanac, organizmi koji su viši u hranidbenom lancu imaju veće koncentracije PCB-a i OCP-a u sebi nego organizmi niže u hranidbenom lancu (Slika 7).(16) U vodenom sustavu koncentracije će biti veće u školjkaša nego u planktonu kojim se školjkaši hrane, a biti će veće i u viših životinja na vrhu hranidbenog lanca kao što su predatori ili sisavci (dupini, kitovi...). (17)



Slika 7 Progresivna kumulacija PCB-a i OCP-a unutar hranidbenog lanca (18)

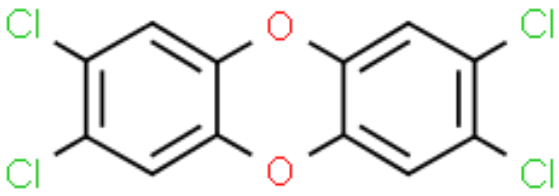
1.4. Toksični učinci PCB i OCP

OCP i PCB se unose u organizam hranom, udisanjem onečišćenog zraka ili preko kože. Nakupljaju se u masnome tkivu, te se slabo razgrađuju i izlučuju iz organizma urinom. (15)

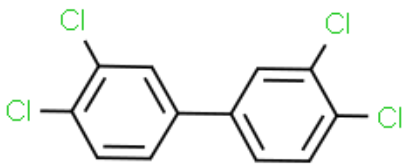
Kronična izloženost organoklorovim spojevima povezuje se s različitim poremećajima rada endokrinog sustava („hormonalni disruptori"), primjerice reproduktivnih organa i štitne žlijezde.(19,20) Izloženost ljudi višim koncetracijama može uzrokovati kožne ozljede (klorakne i svrbež), oštećenje jetre i oštećenja živčanog sustava (glavobolja, poremećaj u pamćenju, depresija).(21) Akutna trovanja su rjeđa i do njih dolazi prilikom raznih nesreća ili zloupotrebi.

1.5. Faktor ekvivalentne toksičnosti

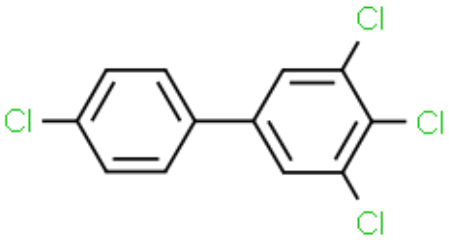
Zbog slične planarne strukture kao poliklorirani dibenzo-p-dioksini (PCDD) i poliklorirani dibenzofurani (PCDF), tzv. planarni *non-ortho* supstituirani PCB-i (Slike 9-12) imaju vrlo slične toksične učinke PCDD-ima i PCDF-ima. Najtoksičniji dioksin je 2,3,7,8-TCDD (Slika 8). Toksični učinci se pripisuju njihovom visokom afinitetu za vezanje na Ah receptor (aril ugljikovodični receptor). Neplanarni *ortho* supstituirani kongeneri čije je djelovanje neovisno o Ah receptori smatraju se manje toksičnim, međutim oni drugim mehanizmima izazivaju razne toksične učinke.(22) Obzirom da se PCB-i uvijek nalaze u smjesi u nekom uzorku, u svrhu procjene rizika uveden je pojam „faktora ekvivalentne toksičnosti" (*eng. Toxicity Equivalency Factor*, TEF), koji omogućava procjenu kulmulativne toksičnosti smjese dioksina i dioksinima sličnih PCB-a.(23) Kao referentni kongener uzet je najtoksičniji kongener 2,3,7,8-TCDD, čija je TEF vrijednost 1. TEF vrijednosti (Tablica 1) za ostale toksikološki značajne kongenere su mjera toksičnosti pojedinog kongenera prema 2,3,7,8-TCDD-u i njih utvrđuje i re-evaluira Svjetska zdravstvena organizacija.(24)



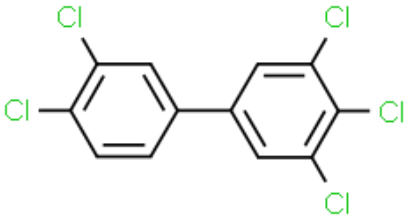
Slika 8 Strukturna formula 2,3,7,8-TCDD



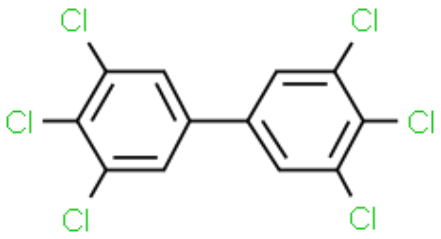
Slika 9 Strukturna formula PCB-77



Slika 10 Strukturna formula PCB-81



Slika 11 Strukturna formula PCB-126



Slika 12 Strukturna formula PCB-169

Tablica 1 Vrijednosti faktora ekvivalentne toksičnosti utvrđene 2015.godine

Kongener	TEF vrijednost
„Dioksinima slični" PCB-i *non-ortho* + *mono-ortho* PCB-i	
non-ortho	
PCB-77	0.0001
PCB-81	0.0003
PCB-126	0.1
PCB-169	0.03
mono-ortho	
PCB-105	0.00003
PCB-114	0.00003
PCB-118	0.00003
PCB-123	0.00003
PCB-156	0.00003
PCB-157	0.00003
PCB-167	0.00003
PCB-189	0.00003

Vrijednost toksičnog ekvivalenta (*eng. Toxic Equivalency*, TEQ) je zbroj TEF vrijednosti pojedinačnih spojeva pomnožen s njihovom koncentracijom. Računa se korištenjem jednadžbe:

$$TEQ = \sum_{i=1}^{n} (c_i \times TEF_i)$$

gdje je : TEQ- toksični ekvivalent

c_i -koncentracija pojedinačnog kongenera

TEF – faktor ekvivalentne toksičnosti.

Zbroj od 6 indikatorskih PCB-a (28, 52, 101, 138, 153 i 180) smatra se odgovarajućim markerom prisutnosti i izloženosti ljudi PCB-ima koji nisu slični dioksinima.

Uredbom Komisije (EU) br.1881/2006 *o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani*, kao najveća dopuštena količina zbroja indikatorskih PCB-a utvrđena je vrijednost od 75 *ng/g* mokre težine za mišićno tkivo riba i ribarskih proizvoda. Najveća dopuštena količina zbroja dioksina i dioksinima sličnih PCB-a (WHO-PCDD/F-TEQ) iznosi 6.5 *pg/g* mokre težine.(25)

1.6. Razine poliklorbifenila i organoklorovih pesticida u ribama

Ribe i ostali morski organizmi koriste se u istraživanjima kao bioindikatori onečišćenosti vode i pokazatelji razine i raspodjele PCB-a i OCP-a na različitim trofičkim razinama.

Istraživanjem prisutnosti 9 organoklorovih pesticida ($\alpha, \beta\ i\ \gamma -$ HCH), *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT, HCB i aldrin) u mišićnom tkivu triju vrsta riba: srdele, šaruna i skuše dobiveni su rezultati prikazani u Tablica 2. Uzorci riba su ulovljeni u zapadnom Atlantiku portugalske obale. U srdeli je pronađena najveća koncentracija *p,p'*-DDT-a, te β-HCH. Mišićno tkivo šaruna ima najveću koncentraciju *p,p'*-DDD-a , a zatim α-HCH. Skuša je od tri analizirane vrste imala najveću koncentraciju *p,p'*-DDT-a. Razine ukupnog Σ DDT-a su bile najviše u skuši. Najviše razine ukupnog Σ HCH-a i HCB-a bile su u srdeli. (20)

Tablica 2 Masene koncentracije OCP-a (ng/g mokre mase) riba ulovljenih 2003. godine na portugalskoj obali[20]

	Srdela		Šarun		Skuša	
Pesticid	$\bar{x} \pm SD$	maksimum	$\bar{x} \pm SD$	maksimum	$\bar{x} \pm SD$	maksimum
$\alpha - HCH$	1.1±3.5	16.4	10.5±37.4	182.1	1.6±4.3	18.2
$\beta - HCH$	29.0±93.5	457.2	8.2±21.9	91.8	1.9±5.4	25.7
γ *-HCH*	3.0±9.5	15.5	7.9±10.1	44.4	5.2±6.8	30.7
Σ-HCH	33.2±795.9	-	26.5±40.5	-	8.5±9.0	-
p,p'-DDE	2.1±2.8	11.2	0.7±1.4	6.2	3.3±7.1	32.4
p,p'-DDT	30.1±134.9	663.1	Np	Np	109.9±320	1540.2
p,p'-DDD	3.0±4.9	22.3	51.9±186.1	852.2	2.9±5.9	24.8
o,p'-DDT	2.2±2.9	13.5	2.1±1.9	10	23.3±102.1	502.3
Σ-DDT	37.1±134.3	-	55.7±185.8	-	139±423.1	-
HCB	6.5±15.9	68.3	5.0±13.9	56.5	2.7±7.9	38.5
Aldrin	13.3±58.4	287.2	1.0±1.5	6.9	1.1±2.4	11.7

np-nema podataka

Bayarri i suradnici su analizirali razinu POPs-a u različitim jestivim morskim vrstama iz Jadranskog mora. Uzorci su uzorkovani na sjevernom, srednjem i južnom dijelu talijanske obale Jadranskog mora. Analiza PCB-a pokazala je da je razina onečišćenja ovisna o vrsti. Najviše koncentracije PCB-a su pronađene u skuši, ribi koja ima najviše sadržaja masti. Ukupne koncentracije PCB-a pronađene u svakoj vrsti su prikazane u Tablica 3. Tablica također prikazuje razinu kontaminacije 7 pojedinačnih kongenara PCB-a (28, 52, 101, 118, 138, 153 i 180) u rasponu od 0.20-80.6 *ng/g*. Razine koncentracije DDE-a u ribama Jadranskog mora su u rasponu od 0.7-32.4 *ng/g*. Najveće koncentracije DDE-a su pronađene u skuši, zatim trlji i inćunu.(26)

Tablica 3 Ukupne masene koncentracije PCB-a i DDE-a (ng/g mokre mase) u uzorcima odabranih morskih vrsta iz Jadranskog mora ulovljenih 1998.godine[26]

Vrsta	Područje	% masti	PCB (*pg/g*)	PCB (*ng/g*)	DDE (*ng/g*)
Inćun	sjeverni	3.3	132	62.7	11.9
	srednji	3.2	43.2	19.8	8.6
	južni	1.8	33.6	16.4	6.4
Lignja	sjeverni	1.9	81.5	37.7	5.5
	srednji	1.8	41.1	21.2	2.3
	južni	1.2	22.0	9.53	3.7
Dagnje	sjeverni	1.6	45.0	18.5	3.0
	srednji	1.4	6.65	1.32	1.9
	južni	1.4	13.5	5.95	1.6
Škamp	sjeverni	0.6	7.62	4.10	0.9
	srednji	0.5	2.25	0.20	1.0
	južni	0.7	4.47	2.43	1.6
Skuša	sjeverni	8.7	177	80.6	17.7
	srednji	7.3	157	75.3	32.4
	južni	5.6	94.1	46.1	26.0
Trlja	sjeverni	4.9	90.2	43.4	8.5
	srednji	4.4	42.9	22.3	8.1
	južni	4.3	41.1	19.8	9.8
Školjke	sjeverni	1.0	10.3	3.93	0.8
	srednji	1.1	5.55	1.88	0.7
	južni	0.9	3.72	1.24	0.8

Analizom nekoliko morskih organizama Jadranskog mora različitih trofičkih razina, određivala se razina te raspodjela kongenera PCB-a (28, 52, 101, 118, 138, 153 i 180) i OCP-a (*p, p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDT i *o,p'*-DDT). Najveće koncentracije PCB-a i OCP-a pronađene su u ribama, a najmanje u glavonošcima (Tablica 4). Najveću koncentraciju ukupnog PCB-a ima skuša (20.6 *ng/g* mm), zatim slijedi trlja (17.96 *ng/g* mm), inćun (17.45 *ng/g* mm) i srdela (15.61 *ng/g* mm).(16)

Tablica 4 Maseni udjeli PCB-a (ng/g mokre mase) u odabranim morskim vrstama srednjeg Jadrana analiziranih 2002.godine[16]

Vrste	Područje	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180	Σ PCB
Dagnje	I	np	0.29-1.64 (0.76)	0.32-1.62 (0.75)	0.17-0.58 (0.30)	0.52-1.66 (0.90)	0.43-1.29 (0.68)	Np-0.07 (0.04)	3.43
	II	np	0.24-4.2 (1.70)	0.23-3.58 (1.95)	0.12-1.03 (0.64)	0.50-3.57 (2.11)	0.33-2.89 (1.55)	Np-0.29 (0.16)	9.81
Škamp	I	np	Np-0.15 (0.11)	0.1-0.32 (0.19)	0.35-0.71 (0.51)	1.95-3.00 (2.33)	1.26-1.91 (1.47)	0.41-0.65 (0.55)	5.16
	II	np	0.07-0.69 (0.26)	0.08-0.3 (0.21)	0.37-0.92 (0.65)	1.41-4.55 (2.67)	0.91-2.97 (1.78)	0.27-1.20 (0.60)	6.17
Trlja	I	np	0.91-3.84 (2.25)	0.42-1.84 (1.24)	1.12-3.33 (2.29)	2.96-8.58 (6.35)	2.42-6.59 (4.80)	0.48-1.00 (0.79)	17.72
	II	np	0.85-4.54 (2.58)	0.31-2.15 (1.10)	0.91-3.73 (2.35)	2.61-11.45 (6.50)	2.03-8.25 (4.88)	0.39-1.42 (0.79)	18.2
Lignje	I	np	0.02-0.55 (0.19)	0.06-0.92 (0.42)	0.04-0.65 (0.29)	0.17-2.19 (1.07)	0.14-1.93 (0.90)	0.03-0.46 (0.21)	3.08
	II	np	0.09-0.2 (0.14)	0.16-0.37 (0.22)	0.10-0.27 (0.15)	0.29-1.25 (0.60)	0.23-0.99 (0.47)	0.04-0.26 (0.11)	1.69
Sipa	I	np	Np-0.08 (0.06)	0.02-0.06 (0.04)	0.01-0.05 (0.02)	0.18-0.43 (0.32)	0.05-0.09 (0.07)	0.05-0.12 (0.07)	0.58
	II	np	Np-0.13 (0.10)	0.03-0.07 (0.05)	0.02-0.04 (0.03)	0.35-0.58 (0.46)	0.07-0.16 (0.12)	0.08-0.13 (0.11)	0.87
Inćuni	I	np	0.13-5.72 (2.00)	0.32-6.64 (2.73)	0.19-2.78 (1.17)	0.80-7.40 (3.76)	0.57-5.96 (2.95)	0.19-1.22 (0.63)	19.97
	II	np	0.11-2.06 (0.93)	0.19-4.38 (1.81)	0.10-1.64 (0.79)	0.41-5.82 (2.71)	0.31-4.24 (2.01)	0.10-0.88 (0.45)	14.94
Srdela	I	np	0.69-4.57 (2.34)	0.41-3.00 (1.33)	1.55-2.61 (1.91)	5.66-7.41 (6.72)	3.92-5.50 (4.89)	0.76-2.03 (1.19)	18.38
	II	np	0.24-3.46 (1.17)	0.14-1.73 (0.56)	0.48-2.78 (1.28)	3.05-9.90 (5.19)	2.04-7.16 (3.74)	0.76-1.22 (0.90)	12.84
Skuša	I	np	0.02-2.34 (1.17)	0.07-4.67 (2.36)	0.07-2.75 (1.37)	0.39-12.57 (5.89)	0.26-9.15 (4.36)	0.14-2.22 (1.16)	16.12
	II	np	Np-6.72 (2.64)	0.31-17.29 (4.88)	0.33-7.44 (2.22)	1.54-25.48 (8.12)	1.15-19.45 (6.19)	0.33-3.58 (1.34)	25.4

Rezultati iz Tablica 5 pokazuju da trlja ima najvišu koncentraciju ukupnog ∑ OC (7.88 *ng/g* mm), zatim ju slijedi srdela (6.125 *ng/g* mm), skuša (5.79 *ng/g* mm) i inćun (3.71 *ng/g* mm). Najmanju koncentraciju ukupnog ∑ PCB-a i ∑ OC ima sipa. Dobiveni podatci pokazuju da su ribe (skuša, srdela i inćun) najviše zagađene zbog svog položaja u trofičkom lancu.(16)

Tablica 5 Masene koncentracije OC-a (ng/g mokre mase) odabranih morskih vrsta srednjeg Jadrana analiziranih 2002. godine[16]

Vrste	*Područje*	p,p'-DDD	p,p'-DDE	o,p'-DDT	p,p'-DDT	∑ OC
Dagnje	I	0.78-1.63 (1.11)	0.27-0.79 (0.48)	Np-0.14 (0.10)	Np-0.24 (0.19)	1.88
	II	0.26-2.27 (1.10)	0.19-1.49 (0.65)	Np-0.11 (0.11)	Np-np (np)	1.90
Škamp	I	1.94-5.42 (3.22)	0.18-0.36 (0.25)	Np-0.03 (0.03)	Np-0.18 (0.13)	3.60
	II	0.92-7-14 (3.21)	0.10-0.31 (0.23)	Np-np (np)	Np-0.11 (0.08)	3.52
Trlja	I	3.40-13.89 (7.25)	0.31-2.23 (1.19)	Nop-np (np)	Np-0.58 (0.43)	8.87
	II	2.02-9.32 (5.44)	0.43-2.01 (1.12)	Np-np (np)	Np-0.33 (0.33)	6.89
Lignje	I	0.18-3.03 (1.13)	Np-0.39 (0.19)	Np-0.02 (0.02)	Np-0.11 (0.07)	1.41
	II	0.41-1.13 (0.73)	Np-0.08 (0.05)	Np-np (np)	Np-np (np)	0.78
Sipa	I	Np-np (np)	Np-np (np)	Np-np (np)	No-np (np)	Np
	II	Np-np (np)	Np-np (np)	Np-np (np)	Np-np (np)	Np
Inćuni	I	0.75-7.12 (3.28)	0.17-2.29 (0.84)	Np-0.30 (0.16)	Np-0.66 (0.26)	4.54
	II	0.51-3.07 (2.08)	0.09-0.80 (0.51)	Np-0.14 (0.13)	Np-0.23 (0.16)	2.88
Srdela	I	3.06-6.90 (5.21)	0.69-1.93 (1.32)	Np-0.22 (0.13)	Np-0.36 (0.21)	6.87
	II	2.00-9.26 (4.17)	0.33-2.58 (0.92)	Np-0.21 (0.13)	Np-0.26 (0.16)	5.38
Skuša	I	0.42-7.17 (3.95)	0.01-2.40 (0.99)	Np-0.14 (0.12)	Np-0.38 (0.19)	5.25
	II	0.95-14.47 (4.88)	0.37-2.76 (1.10)	Np-0.06 (0.06)	Np-0.51 (0.28)	6.33

U istraživanju 2005.godine izloženosti ljudi heksaklorbenzenu konzumacijom ribe i ribljih proizvoda u Kataloniji izvršena je analiza na 14 najviše konzumiranih ribljih vrsta. Dobivena masena koncentracija HCB-a u srdeli iznosila je 0.18 *ng* g^{-1} mokre mase.(27)

Također je izvršena i analiza 12 toksikološko značajnih PCB-a i 6 indikatorskih PCB-a u 16 riba i ribljih proizvoda najčešće konzumiranih u Španjolskoj (Tablica 6). Ukupna koncentracija PCB-a u srdeli iznosila je 32.14 *ng* g^{-1} svježe mase. Srdela je s ukupnom koncentracijom dioksinu sličnih PCB-a od 3.15 *ng* g^{-1} bila druga po redu s najvišom koncentracijom u odnosu na druge vrste. Najviše koncentracije PCB-a u srdeli slijedile su niz: PCB-153>PCB-138>PCB-180.(28)

Tablica 6 Masene koncentracije PCB-a (ng g^{-1}*) u srdeli ulovljenih u Španjolskoj 2012.godine*[28]

Kongener	Srdela		Kongener	Srdela
PCB-77	0.053		PCB-28	0.17
PCB-81	0.012		PCB-52	0.60
PCB-105	0.512		PCB-101	1.11
PCB-114	0.030		PCB-153	12.18
PCB-118	1.725		PCB-138	9.48
PCB-126	0.056		PCB-180	5.44
PCB-126	0.016		ΣNDL-PCB (ng/g)	28.98
PCB-156	0.355			
PCB-157	0.80			
PCB-167	0.235			
PCB-169	0.002			
PCB-189	0.074			
ΣDL-PCB (ng/g)	3.15			
ΣDL-PCB (pg WHO_TEQ/g)	1.99			
	ΣPCB (ng/g) 32.13			

U uzorcima srdela ulovljenih 2000.godine na portugalskoj obali, analizirala se razina 30 kongenara PCB-a u mišićnom tkivu, jetri i gonadama. Svi kongeneri PCB-a su bili kvantificirani u više od 95% uzoraka. Koncentracija kongenera u mišićnom tkivu bila je u rasponu od 3.0 *ng* g^{-1} do 5 *ng* g^{-1} suhe mase. PCB-153 i PCB-138 su imali najveću koncentraciju u uzorcima.(29)

Na 34 uzorka ribe istočnog dijela Jadranskog mora ulovljenih 2014. godine provedena je analiza PCB-a i OCP. Pronađeno je 6 indikatorskih kongenera PCB-a (28, 52, 101, 138, 153, 180) i 11 toksikološki značajnih kongenera (60, 74, 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167, 170, 189) i 7 OCP. Dobiveni podatci prikazani su u *Tablica 7*. U skupini DDT izomera, glavni metabolit DDT-a, DDE pronađen je u svim uzorcima. U skupini HCH-a dominira β-HCH, a α i gama HCH su niske razine. U skupini PCB-a dominiraju kongeneri PCB-138 i PCB-153. Kongeneri PCB-52, PCB-138, PCB-153 i PCB-180 pronađeni su u svim uzorcima, a kongeneri PCB-28 i PCB-101 u 97% uzoraka. Iz skupine toksikološki značajnih najčešći kongener je PCB-170. Pojavio se u 31 uzorku (91%).(30)

Maseni udio ukupnog ∑ PCB-a u uzorcima je bio između 106 *ng/g* i 11,326 *ng/g*, a ukupnog ∑ DDT-a u rasponu od 14.4 *ng/g* do 12,190 *ng/g*. U uzorcima najčešće konzumiranih riba maseni udjeli organskih spojeva slijedi niz: PCB>DDT>HCH>HCB.(30)

Tablica 7 Razine OCP i PCB u mišićnom tkivu riba ulovljenih 2014. godine u 17 lovnih zona istočnog Jadrana[30]

	(ng/g masti)				Mokra masa (ng/g mm)				
	$\bar{x}$	Med	Min	Max	$\bar{x}$	Med	Min	Max	N
OCP									
HCB	0.189	<LOD	<LOD	2.79	0.021	<LOD	<LOD	0.250	4
$\alpha-$ HCH	0.135	<LOD	<LOD	1.87	0.017	<LOD	<LOD	0.209	4
β –HCH	97.5	<LOD	<LOD	1.823	0.277	<LOD	<LOD	1.65	15
γ -HCH	15.6	<LOD	<LOD	529	0.023	<LOD	<LOD	0.478	3
Σ HCH	113	<LOD	<LOD	2.353	0.319	<LOD	<LOD	2.12	
DDE	110	54.6	14.2	649	1.61	0.79	0.047	6.38	34
DDT	288	9.52	<LOD	6.949	0.865	0.46	<LOD	6.71	18
DDD	150	2.74	<LOD	4.592	0.368	0.14	<LOD	4.44	18
DDE/DDT	3.4	3.16	0.09	8.8	3.4	3.16	0.09	8.8	18
Σ DDT	548	74.1	14.4	12.190	2.85	1.58	0.047	11.8	
PCB									
Indikatorski	PCB								
PCB-28	164	89.3	<LOD	965	0.863	0.76	<LOD	3.31	33
PCB -52	163	88.2	5.30	657	0.886	0.81	0.297	2.07	34
PCB -101	29.7	0.043	<LOD	306	0.399	0.01	<LOD	3.05	33
PCB -138	496	104	22.3	8.886	3.43	2.02	0.095	14.4	34
PCB -153	234	115	11.0	902	4.54	1.95	0.042	30.6	34
PCB -180	65.8	31.6	3.93	366	0.921	0.40	0.046	4.52	34
Σ Ind PCB	11.15	481	80.9	11.324	11.0	6.90	1.26	46.4	
ToxRel									
PCB -74	32.3	<LOD	<LOD	873	0.276	<LOD	<LOD	3.73	15
PCB -60	16.8	<LOD	<LOD	188	0.175	<LOD	<LOD	0.691	16
PCB -105	7.26	1.62	<LOD	55.3	0.073	<LOD	<LOD	0.403	19
PCB -114	3.49	<LOD	<LOD	23.4	0.146	<LOD	<LOD	0.709	21
PCB -118	25.8	7.79	<LOD	299	0.567	0.19	<LOD	3.27	15
PCB -123	10.5	1.88	<LOD	121	0.287	0.08	<LOD	1.94	22
PCB -156	1.69	<LOD	<LOD	17.7	0.084	<LOD	<LOD	0.700	22
PCB -157	0.265	<LOD	<LOD	6.32	0.012	<LOD	<LOD	0.373	8
PCB -167	21.0	1.55	<LOD	196	0.187	0.15	<LOD	0.814	2
PCB -170	11.7	5.88	<LOD	56.6	0.165	0.09	<LOD	0.871	31
PCB -189	0.084	<LOD	<LOD	2.85	0.005	<LOD	<LOD	0.180	1
ΣToxRel	131	52.1	<LOD	1,083	1.98	1.10	<LOD	8.80	
Σ PCB	1,283	524	106	11,326	13,0	8.98	1.33	53.0	

2. CILJ RADA

Svrha ovog diplomskog rada jest istraživanje razina i raspodjele pojedinačnih kongenera PCB-a i organoklorovih pesticida u srdeli (*Sardina pilchardus*) ulovljenoj u različitim ribarskim zonama u Jadranskom moru.

3. MATERIJALI I METODE

Diplomski rad izrađen je u Jedinici za biokemiju i organsku kemiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada pod vodstvom Dr. sc. Snježane Herceg Romanić u okviru internog institutskog projekta „Postojana organska zagađivala - procjena utjecaja na okoliš i stabilnost genetičkog materijala čovjeka". Uzorkovanje riba odvilo se u suradnji sa suradnicom internog institutskog projekta, Dr.sc. Bosiljka Mustać, Sveučilište u Zadru. Uzorci srdela, *Sardina pilchardus,* su sakupljeni u okviru projekta *„Zaštita, poboljšanje i integrirano upravljanje morskim okolišem i prekograničnim prirodnim resursima – EcoSea*", financiran od strane *IPA programa Jadranske – prekogranične suradnje (IPA CBC Adriatic)*. Suradnja IMI-a i Sveučilišta u Zadru utvrđena je *„Sporazumom o suradnji*" potpisanim u srpnju 2014.

3.1. Priprema standardnih otopina

Standardne otopine poznatih koncentracija PCB -a i OCP-a pripremljene su iz certificiranih izvornih standardnih otopina.

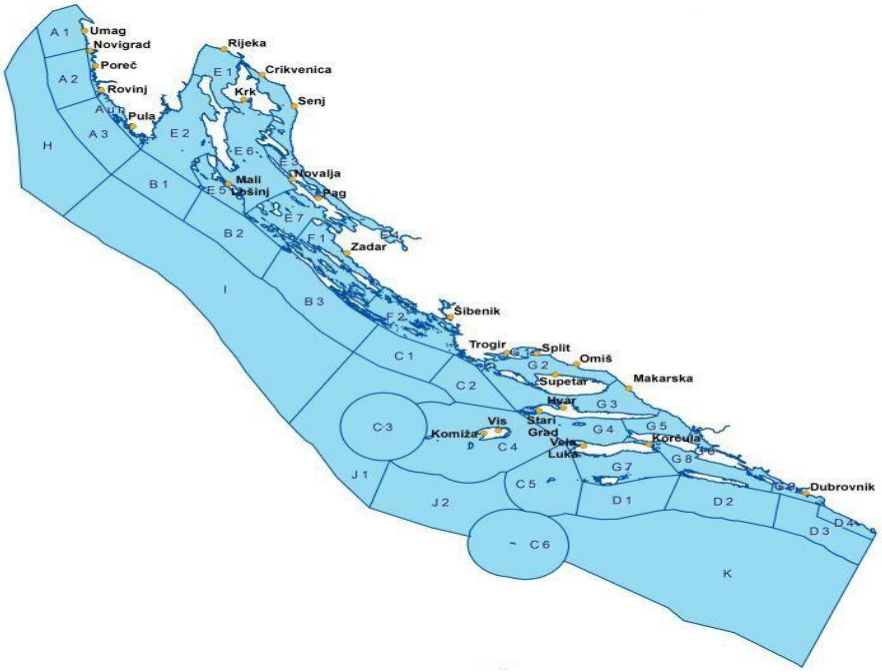
Standardna otopina PCB-a pripremljena je iz standardnih otopina pojedinačnih kongenera PCB-a u *n*-heksanu.

Standardna otopina OCP-a u *n*-heksanu pripremljena je iz pojedinačnih otopina OCP-a.

Miješanjem standardnih otopina PCB-a i OCP-a dobivena je standarda otopina poznate koncentracije potrebne za analizu.

3.2. Prikupljanje uzoraka

Ribe za uzorkovanje su ulovljene u 6 lovnih zona Jadranskoga mora (Slika 13) u vremenskom periodu od studenog 2015. - kolovoza 2016. tijekom komercijalnog izlova.



Slika 13 Ribolovne zone Jadranskog mora (31)

3.3. Priprema uzorka

Svaki, pojedini uzorak srdela sastojao se od oko 50 jedinki ulovljenih mrežama potegačama. Svaki uzorak srdele pripremljen je spajanjem fileta jedinki te homogeniziran što je ukupno 22 skupna uzorka (Tablica 8). Iz svakog skupnog uzorka analizirana su po 2 alikvota.

S	Datum prikupljanja	Lovna zona	Duljina uzorka (cm)	Prosječna duljina (cm) i standardna devijacija	Prosječna masa (g) i standardna devijacija
1	28.7.2016.	B2	13-16	14,28-0,61	21,58-3,11
2	06.05.2016.	B3	13,5-15,5	14,45-0,58	21,67-3,25
3	13.06.2016.	B2	12,5-16	13,83-0,82	30,31-3,97
4	13.06.2016.	F1	11,5-15	13,09-0,62	16,85-2,46
5	30.06.2016.	B2	12,5-15	13,71-0,77	18,96-3,59
6	30.04.2016.	B2	12-16	13,81-0,85	20,11-2,89
7	13.04.2016	F1	12-15,5	13,47-0,76	18,45-2,88
8	06.05.2016	B3	14-17,5	15,23-0,74	27,85-4,07
9	31.05.2016.	B2	13-16	14,75-0,73	26,19-3,96
10	04.07.2016.	B2	13,5-17	14,81-0,73	24,50-4,11
11	30.08.2016.	B2	11,5-15	13,30-0,70	17,89-2,69
12	30.08.2016.	F1	12,5-16,5	14,42-0,54	23,64-4,35
13	09.08.2016.	B3	14-16,5	14,94-0,58	25,37-2,99
14	17.03.2016.	F2	11-16	13,94-0,89	18,73-3,86
15	15.03.2016.	F1	11,5-16	13,73-0,86	17,58-3,02
16	04.07.2016.	B3	13-16,5	14,71 -0,72	24,45 -3,69
17	08.03.2016.	B3	12,5-15	13,66-0,68	18,76-2,69
18	30.06.2016.	B2	12,5-17	14,34-0,81	21,58-4,37
19	05.08.2016.	A1	12-15	12,80-0,45	15,68-1,71
20	28.07.2016.	B3	13,5-17	14,80-0,81	23,72-3,82
21	29.4.2016.	B3	12,5-17	14,43-1,10	21,62-7,28
22	20.11.2015	E7	12-16	14,5-0,97	22,56-4,87

Tablica 8 Biometrija i lovne zone uzoraka srdela

3.3.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija mućkanjem s odgovarajućim organskim otapalom je najjednostavnija metoda ekstrakcije PCB-a i OCP-a iz uzoraka mišićnog tkiva ribe. Ekstrakcija je višekratna te se nakon nje ekstrakti profiltriraju i koncentriraju. Kao organsko otapalo koristi se *n*-heksan.

U tarionik je odvagano po 5 *g* homogeniziranog mišićnog tkiva i dodano po 5 *g* natrijevog sulfata, žarenog 5 h na 500° C. Smjesi je dodano 40 *ml n*-heksana (Merck KGaA, Darmstadt) i ručno miješano 5 minuta. Pripremljena smjesa je kvantitativno prenesena na filter papir (Whatman No.1). Dobiveni ekstrakt je reduciran do masti na uparivaču sa strujom dušika (The Meyer N-EVAP, Organomation, Northborough, SAD) .

3.3.2. Pročišćavanje uzorka

Masni ekstrakt je otopljen u 5 *ml n*-heksana i prebačen u epruvetu za centrifugiranje. Zatim je dodano 4 *ml* 96 % sumporne kiseline (Merck) kako bi se uklonili interferirajući spojevi. Centrifugirano je 10 minuta na 2500 *rpm*. Supernatant je odvojen te je postupak čišćenja ponovljen 2 puta. Prije plinske kromatografije pročišćeni uzorak je uparavan na uparivaču sa strujom dušika do zadnjih par kapi i otopljen u 1 *ml n*-heksana.

3.4. Plinska kromatografija

Za kvantitativnu i kvalitativnu analizu poliklorbifenila i organoklorovih pesticida (Tablica 9) korišten je plinski kromatograf Clarus 500 (Restek, Bellefonte, PA, USA). Sastoji od dvije kapilarne kolone različite duljine: (1) 60m × 0.25mm, debljina filma Rtx-5 0.25μm, (2) 30m × 0.25mm, debljina filma Rtx-5 0.25μm. Temperatura kolone je programirana od 100°C do 110°C na 4°C m^{-1} (izotermalno 5 minuta na 110°C), zatim na 240°C 15 min^{-1}(50 minuta izotermalno na 240°C). Temperature injektora i detektora su bile 250°C i 270°C. Kao plin nosač korišten je dušik. Spojevi koji su identificirani na obje kolone su analizirani.

U kolone se injektira po 5 *μl* standarda i uzorka , redoslijedom 2 puta standard, uzorak, standard i na kraju uzorak.

Za identifikaciju kloriranih spojeva u uzorcima, uspoređuje se vrijeme zadržavanja spoja u kromatogramu uzorka s vremenom zadržavanja spojeva u kromatogranu standarda.

Iz dobivenih kromatograma standarda i uzorka određivana je visina pikova.

Masena koncentracije spoja u uzorku računa se kao umnožak koncentracije spoja u standardu i omjera visine pika u kromatogramu uzorka i visine pika u kromatogramu standarda.

Tablica 9 Analizirani spojevi

Kratica	Kemijsko ime
PCB-28	2,4,4' -triklorbifenil
PCB-52	2,2',5,5' -tetraklorbifenil
PCB-101	2.2',4,5,5'-pentaklorbifenil
PCB-138	2,2',3,4,4',5 -heksaklorbifenil
PCB-153	2,2',4,4',5,5' -heksaklorbifenil
PCB-180	2,2',3,4,4',5,5' -heptaklorbifenil
PCB-77	3,3',4,4' -tetraklorbifenil
PCB-123	2',3,4,4',5 -pentaklorbifenil
PCB-118	2,3',4,4',5 -pentaklorbifenil
PCB-114	2,3,4,4',5 - pentaklorbifenil
PCB-105	2,3,3'4,4'- pentaklorbifenil
PCB-126	3,3',4,4',5 – pentaklorbifenil
PCB-167	2,3',4,4',5,5' -heksaklorbifenil
PCB-157	2,3,3',4,4',5' – heksaklorbifenil
PCB-169	3,4,5,3',4',5' - heksaklorbifenil
PCB-170	2,2',3,3',4,4',5 - heptaklorbifenil
PCB-189	2,3,3',4,4',5,5' -heptaklorbifenil
PCB-156	2,3,3',4,4',5 -heksaklorbifenil
PCB-74	2,4,4',5 -tetraklorbifenil
PCB-60	2,3,4,4' -tetraklorbifenil
p,p'-DDE	1,1- diklor-2,2-di(4-klorfenil)eten
α-HCH	α- heksaklorcikloheksan
β-HCH	β - heksaklorcikloheksan
HCB	heksaklorbenzen
γ-HCH	γ -heksaklorcikloheksan
p,p'-DDD	1,1 -diklor-2,2-di(4-klorfenil)etan
p,p'-DDT	1,1,1 -triklor-2,2-di(4-klorfenil)etan

3.5. Određivanje djelotvornosti ekstrakcije

Više uzoraka mišićnog tkiva ribe homogenizirano je u jedan zajednički uzorak. Za analizu su upotrebljavani alikvoti. 2 alikovota su bez dodatka standarda i 5 uz dodatak standarda. Kako bi se ispitala djelotvornost ekstrakcije PCB-a i OCP-a iz srdele u 5 alikvota homogeniziranih uzoraka dodana je poznata količina svih analiziranih spojeva. Masena koncentracija OCP-a je bila u rasponu između 0.61 *ng* g^{-1} i 0.68 *ng* g^{-1} svježe mase, a PCB-a u rasponu od 0.42 *ng* g^{-1} do 0.7 *ng* g^{-1} svježe mase.

Iskorištenja PCB-a i OCP-a izračunati su oduzimanjem srednjih vrijednosti dva neutvrđena uzorka od utvrđenih. Stupanj iskorištenja za PCB bio je u rasponu od 59% do 89%, s relativnim standardnim odstupanjem od 3% do 14%. Za OCP stupanj iskorištenja bio je u rasponu od 59% do 88%, s relativnim standardnim odstupanjem od 4% do 15%.

Granica detekcije izračunata je kao prosjek svih određivanja na temelju omjera signal/šum i iskorištenja spojeva, a iznosila je 0.01 *ng* g^{-1} svježe mase.

Za iskazivanje laboratorijske kontaminacije upotrijebljena je slijepa proba, pri čemu je koncentracija analita u probi bila ispod razine granice detekcije instrumenta. Rezultati su preračunati za iskorištenje.

3.6. Statistička analiza podataka

Analiza podataka provedena je korištenjem besplatnog statističkog softvera R, verzija 3.4.1. Primjenjeni su neparametrijski statistički testovi kako bi se ispitala normalnost raspodjele podataka u skupinama s malim brojem opažanja. Shapiro-Wilksovim testom testirane su one koncentracije koje nisu pokazale normalnu raspodjelu. Sadržaj onečišćivača i sadržaj masti u uzorcima su opisani rasponima: donji kvartil, medijan i gornji kvartil. Značajne razlike u koncentracijama onečišćivača su testirane Kruskal-Wallisovim testom. Razina značajnosti je bila $p<0.05$.

4. REZULTATI

4.1. Razine poliklorbifenila i organoklorovih pesticida u srdeli iz Jadranskog mora

Svi analizirani spojevi su pronađeni u uzorcima srdela (Tablica 10). Raspon masenih udjela indikatorskih kongenera PCB-a je od 0.06 *ng* g^{-1} do 3.29 *ng* g^{-1}. Raspon toksikološki značajnih PCB-a je od 0.02 *ng* g^{-1} do 1.16 *ng* g^{-1}. Indikatorski PCB-153 je najzastupljeniji kongener PCB-a. Također su dominantni kongeneri PCB-138 i PCB-180.

Raspon masenih udjela OCP-a u srdeli je od 0.02 *ng* g^{-1} do 2.32 *ng* g^{-1}. Najdominantniji pesticid u uzrocima je *p,p'*-DDE.

Statističkom analizom podataka nisu pronađene značajne razlike u razinama onečišćenja između grupa uzoraka (Tablica 11). Također nisu pronađene ni značajne razlike u sadržaju masti između grupa. (33)

Spoj	Minimun	25-ti percentil	Medijan	75-ti percentil	Maksimum
alfa	0.02	0.04	0.05	0.06	0.07
HCB	0.04	0.06	0.09	0.11	0.16
beta	0.06	0.07	0.08	0.11	0.24
gama	0.05	0.07	0.10	0.11	0.14
PCB-28	0.11	0.23	0.27	0.52	0.96
PCB-52	0.06	0.08	0.10	0.15	0.27
PCB-74	0.11	0.18	0.24	0.51	0.75
PCB-60	0.02	0.07	0.08	0.14	0.21
PCB-101	0.07	0.09	0.13	0.17	0.33
DDE	0.35	0.66	0.80	1.30	2.32
PCB-123	0.09	0.15	0.20	0.20	0.40
PCB-118	0.12	0.18	0.20	0.28	0.55
DDD	0.07	0.10	0.13	0.18	0.32
PCB-114	0.04	0.08	0.11	0.15	1.16
PCB-153	0.32	1.01	1.24	1.42	3.29
PCB-105	0.08	0.09	0.14	0.19	0.40
DDT	0.08	0.12	0.16	0.19	0.76
PCB-138	0.20	0.63	0.72	0.99	1.98
PCB-167	0.05	0.08	0.10	0.13	0.22
PCB-156	0.05	0.07	0.10	0.12	0.38
PCB-157	0.02	0.05	0.06	0.08	0.48
PCB-180	0.15	0.37	0.43	0.58	1.29
PCB-170	0.07	0.14	0.19	0.26	0.54
PCB-189	0.03	0.05	0.06	0.08	0.25
Sadržaj masti (g)	0.01	0.06	0.12	0.13	0.21

Tablica 10 Masene koncentracije PCB-a i OCP-a (ng g^{-1} mokre mase) u srdeli; tablica prikazuje uređene podatke masene koncentracije spojeva izražene: minimumom, donjim kvartilom, medijanom, gornjim kvartilom i maksimumom.[33]

	B2 Medijan (min-max)	B3 Medijan (min-max)	F1 Medijan (min-max)	p B2, B3, F1	B Medijan (min-max)	F Medijan (min-max)	p B, F
alfa	0.06 (0.03-0.06)	0.04 (0.02-0.06)	0.04 (0.02-0.07)	0.207	0.04 (0.02-0.06)	0.05 (0.02-0.07)	0.934
HCB	0.09 (0.06-0.16)	0.08 (0.04-0.15)	0.08 (0.05-0.09)	0.164	0.09 (0.04-0.16)	0.08 (0.05-0.09)	0.117
beta	0.08 (0.06-0.17)	0.09 (0.06-0.16)	0.07 (0.07-0.11)	0.318	0.08 (0.06-0.17)	0.08 (0.07-0.24)	0.804
gama	0.09 (0.06-0.13)	0.10 (0.05-0.14)	0.06 (0.05-0.08)	0.110	0.10 (0.05-0.14)	0.07 (0.05-0.14)	0.248
PCB-28	0.25 (0.11-0.78)	0.39 (0.16-0.96)	0.24 (0.19-0.42)	0.354	0.32 (0.11-0.96)	0.24 (0.19-0.55)	0.741
PCB-52	0.09 (0.07-0.22)	0.13 (0.06-0.20)	0.10 (0.07-0.13)	0.845	0.10 (0.06-0.22)	0.11 (0.07-0.27)	0.620
PCB-74	0.23 (0.11-0.70)	0.30 (0.13-0.70)	0.21 (0.15-0.75)	0.612	0.26 (0.11-0.70)	0.23 (0.15-0.75)	0.869
PCB-60	0.12 (0.02-0.21)	0.07 (0.04-0.14)	0.08 (0.07-0.10)	0.399	0.08 (0.02-0.21)	0.09 (0.07-0.21)	0.563
PCB-101	0.13 (0.07-0.23)	0.15 (0.07 -0.20)	0.10 (0.07-0.14)	0.374	0.14 (0.07-0.23)	0.12 (0.07-0.33)	0.680
DDE	0.93 (0.55-1.90)	0.97 (0.35-1.56)	0.58 (0.47-0.75)	0.115	0.97 (0.35-1.90)	0.66 (0.47-2.32)	0.248
PCB-123	0.18 (0.12-0.39)	0.22 (0.09-0.26)	0.16 (0.13-0.20)	0.674	0.20 (0.09-0.39)	0.16 (0.13-0.40)	0.934
PCB-118	0.21 (0.14-0.52)	0.25 (0.12-0.34)	0.17 (0.15-0.20)	0.468	0.24 (0.12-0.52)	0.19 (0.15-0.55)	0.680
DDD	0.14 (0.07-0.32)	0.14 (0.08-0.19)	0.11 (0.10-0.15)	0.687	0.14 (0.07-0.32)	0.13 (0.10-0.30)	0.869
PCB-114	0.11 (0.04-0.31)	0.12 (0.09-0.19)	0.08 (0.05-0.20)	0.55	0.12 (0.04-0.31)	0.08 (0.05-1.16)	0.869
PCB-153	1.29 (0.85-2.93)	1.35 (0.32-1.94)	1.08 (1.00-1.26)	0.523	1.29 (0.32-2.93)	1.14 (1.00-3.29)	0.869
PCB-105	0.15 (0.09-0.22)	0.13 (0.08-0.20)	0.12 (0.09-0.14)	0.521	0.15 (0.08-0.22)	0.14 (0.09-0.40)	0.934
DDT	0.15 (0.10-0.30)	0.17 (0.11-0.26)	0.12 (0.08- 0.15)	0.103	0.16 (0.10-0.30)	0.12 (0.08-0.76)	0.248
PCB-138	0.77 (0.52-1.78)	0.81 (0.20-1.24)	0.64 (0.56 -0.76)	0.523	0.77 (0.20-1.78)	0.66 (0.56-1.98)	0.869
PCB-167	0.09 (0.05-0.19)	0.12 (0.06-0.15)	0.09 (0.07 -0.10)	0.238	0.11 (0.05-0.19)	0.09 (0.07-0.22)	0.620
PCB-156	0.10 (0.05-0.21)	0.11 (0.06-0.14)	0.08 (0.06 -0.10)	0.489	0.10 (0.05-0.21)	0.10 (0.06-0.38)	0.741
PCB-157	0.05 (0.02-0.11)	0.07 (0.04-0.10)	0.05 (0.04-0.07)	0.197	0.06 (0.02-0.11)	0.05 (0.04-0.48)	0.620
PCB-180	0.45 (0.30-1.08)	0.49 (0.15-0.66)	0.43 (0.30-0.45)	0.574	0.45 (0.15-1.08)	0.43 (0.30-1.29)	0.804
PCB-170	0.19 (0.11-0.49)	0.21 (0.07-0.30)	0.17 (0.13-0.19)	0.745	0.19 (0.07-0.49)	0.19 (0.13-0.54)	1
PCB-189	0.06 (0.05-0.11)	0.06 (0.03-0.08)	0.05 (0.03-0.09)	0.360	0.06 (0.03-0.11)	0.06 (0.03-0.25)	0.934
Sadržaj masti	0.13 (0.05-0.14)	0.12 (0.01-0.21)	0.09 (0.06-0.18)	0.768	0.12 (0.01-0.21)	0.06 (0.06-0.18)	0.457

Tablica 11 Razlike u razinama onečišćenja između grupa srdela; u tablici su prikazane razine onečišćenja po ribolovnim zonama u Jadranskom moru. Prikazani podatci su izraženi kao medijan (minimum-maksimum) i razina značajnosti[33]

4.2. Procjena rizika

	Minimum	Medijan	$\bar{x}$	Maksimum
ΣIndPCB-a (ng g^{-1} mokre mase)	1.04	3.21	3.72	9.63
ΣWHO-dioksinima slični PCB-i – TEQ	0.0132	0.0302	0.0363	0.1199

Tablica 12 Dobivene vrijednosti ekvivalentne toksičnosti indikatorskih PCB-a i dioksinima sličnih-PCB-a; podatci u tablici su rezultati mjerenja količine toksikoloških parametara u uzorcima srdele iskazani preko minimuma, medijana, aritmetičke sredine i maksimuma[33]

Maksimalna vrijednost ekvivalentne toksičnosti ∑Ind PCB-a iznosi 9.63 *ng* g^{-1} (Tablica 12), a ∑WHO dioksinima sličnih PCB-a-TEQ iznosi 0.1199 *ng* g^{-1}.(33)

5. RASPRAVA

Postojani organski spojevi se najviše akumuliraju u morskom okruženju zbog sporih mehanizama razgradnje. Ribe se koriste kao bioindikator onečišćenja vodenih sustava jer pohranjuju velike koncentracije spojeva u mišićnom tkivu i masti. Sporo izlučuju organoklorove spojeve te tako omogućavaju praćenje razine onečišćenja.(19)

U 22 uzorka srdele pronađeni su svi analizirani organoklorovi spojevi. Rezultati su pokazali raspon polikloriranih bifenila od 0.02 *ng* g^{-1} do 3.29 *ng* g^{-1}, a organoklorovih pesticida od 0.02 *ng* g^{-1} do 2.32 *ng* g^{-1}. U skupini PCB-a najdominantniji kongener bio je indikatorski PCB-153. Najdominantniji pesticid u uzorcima bio je *p,p'*-DDE. Redoslijed glavnih skupina organskih spojeva slijedi niz: PCB>DDT>HCH>HCB.

Najveće koncentracije analiziranih PCB-a pokazali su indikatorski PCB-153, PCB-138 i PCB-180. Mogući razlog većih masenih koncentracija tih spojeva je njihova rasprostranjenost u tehničkim smjesama, visoka lipofilnost, te stabilnost i velika postojanost u uslijed dužeg poluživota u morskom okruženju.(32) Dobiveni rezultati su u skladu s prijašnjim istraživanjima provedenim na španjolskoj i portugalskoj obali u kojima je PCB-153 također bio dominantan te talijanskoj obali Jadranskog mora u kojoj je najdominantniji kongener bio PCB-138. U skupini toksikološki značajnih PCB-a čiji je raspon bio od 0.02 *ng g-*$^{-1}$ do 1.16 *ng* g^{-1}, najveću koncentraciju imao je PCB-114.

Vrijednost masene koncentracije HCB-a u srdeli iznosila je 0.16 *ng* g^{-1} što je niža vrijednost u usporedbi s istraživanjem u Kataloniji gdje je koncentracija HCB-a bila 0.18 *ng* g^{-1}. U Portugalu srednja vrijednost HCB-a iznosila je 6.5 *ng* g^{-1} mokre mase što je daleko veća od dobivene vrijednosti u ovom radu.

Masene koncentracije ukupnog HCH bile su u rasponu od 0.2 *ng* g^{-1} do 0.24 *ng* g^{-1}. Najdominantniji u skupini je β −HCH zbog svoje postojanosti u vodenom okolišu u odnose na druge izomere HCH.

Ukupna koncentracija skupine izomera DDT-a bila je u rasponu od 0.5 *ng* g^{-1} do 3.4 *ng* g^{-1}. *p,p*'-DDE, glavni metabolit DDT-a sa visokom postojanošću u vodenom okolišu imao je koncentraciju 2.32 *ng* g^{-1}. Omjer DDE/DDD ispod 0.6 u morskim organizmima smatra se kao novi unos DDT-a u okoliš. U ovom istraživanju omjer DDE/DDT iznosio je 0.68, te se pretpostavlja da nema novog unosa, nego je posljedica prijašnje upotrebe ili prijenosa sa velikih udaljenosti. Razine DDT-a- su niže u odnosu na ranija istraživanja obalnih zona Atlantika i Jadranskog mora.

U usporedbi sa istraživanjem provedenim 2014. godine na 18 najčešće konzumiranih ribljih vrsta ulovljenih na istočnoj obali Jadranskog mora vidi se mali porast razina koncentracija nekih kongenera PCB-a, što govori da postoji kontinuirano obogaćivanje PCB-ima. Medijani masenih udjela PCB-101, PCB-180, PCB-114, PCB-157 i PCB-189 viši su u 2016. godini nego u 2014. godini. Koncentracije skupine izomera DDT-a su manje u odnosu na 2014. godinu, što znači da ne postoji novi unos DDT-a. Redoslijed glavnih skupina organskih spojeva PCB>DDT>HCH>HCB je u skladu s prethodnim istraživanjem.

U procjeni zdravstvenog rizika zbroj indikatorskih PCB-a u srdeli iznosio je 9.63 *ng* g^{-1} , što je 8 puta manje od najveće dopuštene količine propisane Uredbom Komisije. Dobivena vrijednost zbroja ∑WHO dioksinima sličnih PCB-a-TEQ iznosio je 0.1199 *ng* g^{-1}, te je manji od maksimalne propisane vrijednosti u iznosu od 6.5 *pg/g* mokre težine. Rezultati pokazuju da je srdela sigurna za prehranu.

6. ZAKLJUČAK

Ovaj rad daje osnovne podatke o razinama postojanih organskih spojeva reguliranih *Stockholmskom konvencijom* u mišićnom tkivu srdele iz Jadranskog mora. Raspon masenih udjela indikatorskih kongenera PCB-a je od 0.06 *ng* g^{-1} do 3.29 *ng* g^{-1}. Raspon toksikološki značajnih PCB-a je od 0.02 *ng* g^{-1} do 1.16 *ng* g^{-1}. Najzastupljeniji kongener PCB-a je indikatorski PCB-153. Također su dominantni kongeneri PCB-138 i PCB-180. Raspon masenih udjela OCP-a u srdeli je od 0.02 *ng* g^{-1} do 2.32 *ng* g^{-1}. Najdominantniji pesticid u uzrocima je *p,p'*-DDE.

Rezultati analize u uzorcima srdela iz Jadranskog mora prikazanih u ovom radu su na razini globalnog onečišćenja ovim spojevima.

Rezultati istraživanja su pokazali da su srdele sigurne za konzumaciju na temelju toksikološki relevantnih parametara koje regulira Europska komisija.

Rezultati ovog rada dio su preliminarnih istraživanja objavljenih u publikaciji "*Persistent organic pollutants (POPs) in edible fish species from different fishing zones of Croatian Adriatic*" objavljenoj u časopisu *Marine Pollution Bulletin* 137 (2018) 71–80. (IF=3,241; Q1), autora G. Vuković, **S. Herceg Romanić**, Ž. Babić, B. Mustać, **M. Štrbac**, I. Deljanin, D. Antanasijević. Daljnja istraživanja postojanih organskih spojeva usmjerena su prema tzv. sitnoj pelagičkoj (plava) ribi: srdela (*Sardina pilhardus*), inćun-brgljun (*Engraulis encrasicolus*), lokarda-plavica (*Scomber japonicas*), šarun-šnjur (*Trachurus trachurus*) i srdela golema (*Sardinella aurita*) koji su baza hranidbenog lanca u moru, čine preko 80% ukupnog ulova ribe u RH. Uzorci riba sakupljeni su tijekom komercijalnog izlova u definiranim ribolovnim zonama u trogodišnjem periodu, a rezultati se interpretiraju primjenom statističkog modeliranja.

7. LITERATURA

1 Hardell S, Tilander H, Welfinger-Smith G, Burger J, Carpenter DO. Levels of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Three Organochlorine Pesticides in Fish from the Aleutian Islands of Alaska. *PLoS ONE* 2010; **5**: 1932-6203.

2 sk.pdf. https://mzoe.gov.hr/UserDocsImages/NASLOVNE%20FOTOGRAFIJE%20I%20KORI%C5%A0TENI%20LOGOTIPOVI/doc/sk.pdf.

3 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.

4 Hens B, Hens L. Persistent Threats by Persistent Pollutants: Chemical Nature, Concerns and Future Policy Regarding PCBs—What Are We Heading For? *Toxics* 2017; **6**: 1.

5 Miniero R, Guandalini E, Dellatte E, Iacovella N, Abate V, Luca SD *et al.* Persistent organic pollutants (POPs) in fish collected from the urban tract of the river Tiber in Rome (Italy). *Ann DellIstituto Super Sanità* 2011; **47:** 310-315.

6 Perugini M, Giammarino A, Olivieri V, Di Nardo W, Amorena M. Assessment of Edible Marine Species in the Adriatic Sea for Contamination from Polychlorinated Biphenyls and Organochlorine Insecticides. *J Food Prot* 2006; **69**: 1144–1149.

7 Heceg Romanić S. Poliklorirani bifenili i organoklorovi pesticidi s posebnim osvrtom na njihovu prisustnost u iglicama crnogoričnog drveća. *Arh Hig Rada Toksikol 2002*; **53**: 21-30.

8 Mills III SA, Thal DI, Barney J. A summary of the 209 PCB congener nomenclature. Chemosphere, **68**(9), 1603–1612

9 DDT and its derivatives: environmental aspects (EHC 83, 1989). http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc83.htm.

10 World Health Organization, International Program on Chemical Safety, Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals (eds.). *DDT in indoor residual spraying: human health aspects*. World Health Organization: Geneva, 2011.

11 Hexachlorobenzene (EHC195,1997). http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc195.htm.

12 Lindane (EHC124,1991). http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc124.htm.

13 Geyer H, Freitag D, Korte F. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the marine environment, particularly in the mediterranean. Ecotoxicology and Environmental Safety, **8**(2): 129–151

14 Combi T, Miserocchi S, Langone L, Guerra R. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments from the western Adriatic Sea: Sources, historical trends and inventories. *Sci Total Environ* 2016; **562**: 580–587.

15 Bošnir J, Puntari D, Klari M, Šmit Z. POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN FRESHWATER FISH FROM THE ZAGREB AREA. *Arh Hig Rada Toksikol 2005*; **56**: 303-309.

16 Perugini M, Cavaliere M, Giammarino A, Mazzone P, Olivieri V, Amorena M. Levels of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in some edible marine organisms from the Central Adriatic Sea. *Chemosphere* 2004; **57**: 391–400.

17 Storelli MM, Zizzo N. Occurrence of organochlorine contaminants (PCBs, PCDDs and PCDFs) and pathologic findings in loggerhead sea turtles, Caretta caretta, from the Adriatic Sea (Mediterranean Sea). *Sci Total Environ* 2014; **472**: 855–861.

18 Predicting global killer whale population collapse from PCB pollution | Science. https://science.sciencemag.org/content/361/6409/1373

19 Coelhan M, Strohmeier J, Barlas H. Organochlorine levels in edible fish from the Marmara Sea, Turkey. *Environ Int* 2006; **32**: 775–780.

20 Campos A, Lino CM, Cardoso SM, Silveira MIN. Organochlorine pesticide residues in European sardine, horse mackerel and Atlantic mackerel from Portugal. *Food Addit Contam* 2005; **22**: 642–646.

21 Visciano P, Scortichini G, Suzzi G, Diletti G, Schirone M, Martino G. Concentrations of Contaminants with Regulatory Limits in Samples of Clam (Chamelea gallina) Collected along the Abruzzi Region Coast in Central Italy. *J Food Prot* 2015; **78**: 1719–1728.

22 Dvoršćak M. TRACE ANALYSIS OF PERSISTENT ORGANOCHLORINE COMPOUNDS IN SOIL AND ATMOSPHERIC PARTICLES. Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb 2015: 177.

23 Storelli MM, Giacominelli-Stuffler R, Storelli A,Marcotrigiano GO. Polychlorinated biphenyls in seafood: contamination levels and human dietary exposure. Food Chemistry, **82**(3), 491–496.

24 Kožul D, Herceg Romanić S. Analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in soil and sediment. Arh Hig Rada Toksikol 2009; **60**: 243-257.

25 Commission Regulation (EU) No 1259/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffsText with EEA relevance. Official Journal of the European Union 2011; **1259** : 6.

26 Bayarri S, Baldassarri LT, Iacovella N, Ferrara F, Domenico A di. PCDDs, PCDFs, PCBs and DDE in edible marine species from the Adriatic Sea. *Chemosphere* 2001; **43**: 601–610.

27 Falcó G, Llobet JM, Bocio A, Domingo JL. Exposure to hexachlorobenzene through fish and seafood consumption in Catalonia, Spain. *Sci Total Environ* 2008; **389**: 289–295.

28 Perelló G, Díaz-Ferrero J, Llobet JM, Castell V, Vicente E, Nadal M *et al.* Human exposure to PCDD/Fs and PCBs through consumption of fish and seafood in Catalonia (Spain): Temporal trend. *Food Chem Toxicol* 2015; **81**: 28–33.

29 Antunes P, Amado J, Vale C, Gil O. Influence of the chemical structure on mobility of PCB congeners in female and male sardine (Sardina pilchardus) from Portuguese coast. *Chemosphere* 2007; **69**: 395–402.

30 Kljaković-Gašpić Z, Herceg Romanić S, Klinčić D, Tičina V. Chlorinated compounds in the muscle tissue of fish from the Croatian Adriatic: preliminary data on contamination and the associated health risks. *Arh Hig Rada Toksikol* 2015; **66**: 299–308.

31 MPS Uprava ribarstvo > Prodaja dozvola za rekreacijski ribolov na moru. https://ribarstvo.mps.hr/default.aspx?id=4010.

32 Storelli MM, Losada S, Marcotrigiano GO, Roosens L, Barone G, Neels H *et al.* Polychlorinated biphenyl and organochlorine pesticide contamination signatures in deep-sea fish from the Mediterranean Sea. *Environ Res* 2009; **109**: 851–856.

33 Vuković G, Herceg Romanić S, Babić Ž, Mustać B, Štrbac M, Deljanin I, Antanasijević D. Persistent organic pollutants (POPs) in edible fish species from different fishing zones of Croatian Adriatic. Marine Pollution Bulletin 2018; **137**: 71–80.

8. ZAHVALA

Iskreno zahvaljujem mentorici Dr. sc. Snježani Herceg Romanić koja mi je strpljivo posvetila svoje vrijeme i trud te pomogla u izradi ovog diplomskog rada svojim znanstvenim i stručnim savjetima.

Hvala svim kolegama Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada na ugodnoj suradnji i podršci.

Najveće hvala mojoj obitelji na pruženoj ljubavi, podršci i strpljenju.

Hvala Vam svima!