

# Ekstrakcija organskih zagađivala iz uzorka tla raspršenjem tla kroz čvrstu fazu

---

Duić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:949853>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**STUDIJ PRIMJENJENE KEMIJE**

# **DIPLOMSKI RAD**

**KATARINA DUIĆ**

**Zagreb, rujan 2022.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
STUDIJ PRIMJENJENE KEMIJE

## **DIPLOMSKI RAD**

EKSTRAKCIJA ORGANSKIH ZAGAĐIVALA IZ UZORKA TLA  
RASPRŠENJEM TLA KROZ ČVRSTU FAZU

Katarina Duić

Mentorica rada: prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr.sc Dragana Mutavdžić Pavlović

prof. dr. sc. Sandra Babić

dr. sc. Lidija Furač, v. pred.

Zagreb, rujan 2022.

...

*Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović na mentorstvu te stručnoj pomoći, savjetima i podršci tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvale upućujem i doktorandici Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada mag. ing. cheming. Ivi Šimić na nesebičnoj pomoći i strpljenju tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada u laboratoriju kako i dr. sc. Gordani Mendaš Starčević na uloženom trudu i vremenu oko snimanja uzoraka i obrade rezultata.*

*Veliko hvala mojim kolegicama i prijateljima na svakoj podršci, izdvojenom vremenu, druženju i kavi tijekom ovog petogodišnjeg obrazovanja, a što ga je uvelike olakšalo i učinilo ljepšim, zanimljivijim i nezaboravnim.*

*Posebne zahvale mojim roditeljima i sestrama što su mi omogućili studiranje, na velikoj podršci i neizmjernom strpljenju tijekom svih pet godina.*

...

*Ovaj diplomski rad izrađen je u Jedinici za higijenu okoline Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada akademske godine 2021./2022. pod mentorstvom prof. dr. sc. Dragane Mutavdžić Pavlović.*

## SAŽETAK

### Ekstakcija organskih zagađivala iz uzorka tla raspršenjem tla kroz čvrstu fazu

U ovom radu razvijena je metoda ekstrakcije organskih zagađivala, policikličkih aromatskih ugljikovodika, polikloriranih bifenila te organoklorovih pesticida iz uzoraka tla raspršenjem tla kroz čvrstu fazu. Spojevi su to koji pokazuju izrazito negativne učinke na sve sastavnice okoliša što je posljedica njihove toksičnosti, dugotrajne postojanosti te lipofilne prirode koja uzrokuje njihovu migraciju iz vodenog medija u tlo. Iz tog razloga bitno je kvalitativno i kvantitativno odrediti navedene spojeve što je preduvjet za praćenje njihove prisutnosti i kretanja u okolišu. Metode kemijske analize koje se koriste u tu svrhu moraju biti izrazito osjetljive budući da se radi o nižim koncentracijama. Samim time i uzorci koji se analiziraju moraju biti visoko koncentrirani i čisti što zahtijeva dodatnu pripremu. U tu svrhu provedena je ekstrakcija raspršenjem tla kroz čvrstu fazu na kontrolnom uzorku tla. Parametri koji su se optimirali su: izbor čvrste faze (sorbensa), omjer tla i sorbensa te otapalo za eluiranje. Obzirom na dobivena iskorištenja, najboljim sorbensom pokazala se dijatomejska zemlja, najboljim omjerom tla i sorbensa omjer 1:4, a najboljim otapalom smjesa acetona i heksana u omjeru 1:1. Takva optimirana i validirana metoda primjenjena je na 10 realnih uzoraka tla iz okolice Zagreba. Dobivene vrijednosti koncentracija sve su redom niže od maksimalne dopuštene koncentracije koja je propisana Pravilnikom o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od onečišćenja (NN 9/2014).

**Ključne riječi:** *organska zagađivala, ekstrakcija, tlo*

## ABSTRACT

### **Extraction of organic pollutants from soil by soil solid-phase dispersion**

In this paper, the extraction of organic pollutants from soil samples by dispersing the soil with the solid phase was studied. Specifically, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides were extracted. These are compounds that have extremely negative effects on all components of the environment, due to their toxicity, long-term stability and lipophilic nature, which causes the migration of the above pollutants from the water medium to the soil. For this reason, it is important to qualitatively and quantitatively determine the mentioned compounds, which in turn is then a prerequisite for monitoring their presence and movement in the environment. The chemical analysis methods used for this purpose must be extremely sensitive, since low concentrations are involved. Therefore, the samples for analysis must be highly concentrated and pure, which requires additional preparation. For this purpose, extraction was performed by dispersing a control soil sample with soil through the solid phase. The parameters that were optimized are: solid phase (sorbent), ratio of soil to sorbent and solvent for elution. Considering the obtained yields, the best sorbent was diatomaceous earth, the best ratio of soil to sorbent was 1:4, and the best solvent was a mixture of acetone and hexane in the ratio 1:1. This optimized and validated method was applied to 10 real soil samples from the surroundings of Zagreb. The obtained concentration values are all below the maximum value required by law.

**Key words:** *organic pollutants, extraction, soil*

## Sadržaj:

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	3
2.1. Organska zagađivala .....	4
2.1.1. Policiklički aromatski ugljikovodici .....	5
2.1.1.1. Prisutnost policikličkih aromatskih ugljikovodika u tlu.....	2
2.1.1.2. Izvori policikličkih aromatskih ugljikovodika .....	4
2.1.1.3. Fizikalno kemijske karakteristike .....	4
2.1.1.4. Propisi u Republici Hrvatskoj .....	7
2.1.2. Postojana organska zagađivala.....	9
2.1.2.1. Postojana organska zagađivala u tlu.....	10
2.1.2.2. Izvori postojanih organskih zagađivala .....	11
2.1.2.3. Fizikalno kemijske karakteristike .....	12
2.1.2.4. Propisi u Republici Hrvatskoj .....	15
2.2. Tlo .....	15
2.3. Kemijska analiza organskih zagađivala u tlu .....	17
2.3.1. Uzorkovanje .....	17
2.3.2. Metode pripreve uzorka .....	18
2.3.2.1. Ekstrakcija iz čvrstih uzoraka.....	19
2.3.3. Ekstrakcija raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu .....	22
2.3.3.1. Princip.....	23
2.3.3.2. Optimiranje metode .....	24
2.3.4. Metode kemijske analize .....	25
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	27
3.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka tla za analizu .....	28
3.2. Materijali .....	30



3.2.1. Kemikalije .....	30
3.2.2. Certificirane referentne otopine i standardi PAU-a, PCB-a i OCP-a.....	31
3.2.3. Pribor .....	32
3.3. Instrumenti .....	33
3.3.2. Sustav za ekstrakciju kroz čvrstu fazu pod vakuumom .....	33
3.3.3. Uparivač u struji dušika.....	34
3.3.4. Ultrazvučna kupelj .....	35
3.3.5. Plinski kromatografi.....	36
3.4. Metode rada.....	37
3.4.1. Priprava standardnih i radnih otopina .....	37
3.4.2. Određivanje vlage u tlu gravimetrijskom metodom.....	38
3.4.3. Postupak ekstrakcije raspršenjem tla kroz čvrstu fazu.....	38
3.4.5. Određivanje učinkovitosti ekstrakcije raspršenjem tla kroz čvrstu fazu plinskim kromatografom .....	40
<i>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</i>	<i>46</i>
4.1. Sadržaj vlage u uzorcima tla .....	47
4.2. Ekstrakcija PAU-a, PCB-a i OCP-a iz uzoraka tla raspršenjem tla kroz čvrstu fazu....	47
4.3. Validacija metode za određivanje PAU-a, PCB-a i OCP-a u uzorcima tla.....	65
4.4. Primjena metode na realnim uzorcima.....	71
<i>5. ZAKLJUČAK.....</i>	<i>74</i>

## *1. UVOD*

Globalno gospodarstvo u posljednjih se pola stoljeća značajno širilo, kako u industrijskom tako i u poljoprivrednom sektoru što je rezultiralo visokom proizvodnjom i upotrebom industrijskih i agrokemikalija koje ulaze u sve sastavnice okoliša i konačno u ljudska bića kao toksini. Najviše pažnje pridaje se postojećim organskim zagađivačima, policikličkim aromatskim ugljikovodicima te raznim pesticidima budući da pokazuju niz negativnih svojstava od kojih se ističe dugotrajna postojanost u okolišu te mogućnost transformacije u produkte koji mogu pokazivati i veću toksičnost od polaznih molekula. Nadalje, većina spojeva ove vrste imaju lipofilni karakter što znači da se ne zadržavaju u vodenom okolišu već prelaze u tlo gdje se iz istog razloga vežu za organsku tvar i ostaju prisutni dugi niz godina.

Iz navedenih razloga kvantitativno određivanje i kontrola navedenih spojeva pokazala se nužnom zbog čega se pojavila potreba za razvojem novih i osjetljivih analitičkih metoda. Naime, spojevi su to koji se u okolišu ne nalaze u visokim koncentracijama, a u korist ne ide niti činjenica da su okolišne matice izrazito kompleksne i kao takve pružaju velike izazove u analizama. Upravo se u smjeru smanjivanja utjecaja matice i količine uzorka potrebnog za analizu, koncentriranja i pročišćavanja uzoraka razvijaju nove, uglavnom ekstrakcijske metode pripreme, a jedna od takvih metoda je i ekstrakcija raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu koja se pokazala učinkovitom posebno za tvari organskog porijekla.

U cilju utvrđivanja optimalnih uvjeta za provođenje ekstrakcije raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu na uzorcima tla za izoliranje 18 policikličkih aromatskih ugljikovodika, 20 polikloriranih bifenila te 7 organoklorovih pesticida, proveden je eksperiment u kojem se ispitala učinkovitost različitih čvrstih faza (sorbensa), omjera sorbensa i tla te otapala za eluiranje. Najbolji uvjeti odabrani su na temelju iskorištenja izraženih u postocima, a koji su onda definirali konačnu metodu. Nadalje, na istoj metodi provedena je i validacija, tj. određene su izvedbene značajke metode: linearnost, granica detekcije (GD), granica kvantifikacije (GK) i iskorištenje. Eksperiment je završio primjenom optimirane i validirane metode na 10 različitih uzoraka tla iz okolice Zagreba.

## *2. OPĆI DIO*

## 2.1. Organska zagađivala

U današnje vrijeme zemaljski ekosustav sustavno je kontaminiran različitim zagađivalima koja prijete zdravlju i okolišu na globalnoj razini. Od Drugog svjetskog rata posebnu opasnost predstavljaju organska zagađivala koja su izrazito toksična, a koja se dugo zadržavaju u okolišu, odnosno koja su otporna na kemijske, biološke i fotolitičke reakcije. Zbog tog se svojstva u literaturi najčešće upotrebljava naziv „postojana organska zagađivala“ (POPs)<sup>1</sup>. U njih se ubrajaju organoklorovi pesticidi, neke industrijske kemikalije (npr. poliklorirani bifenili, PCB) i nusprodukti industrijskih procesa (npr. dioksini i furani). Osim njih i policiklički aromatski ugljikovodici, PAU predstavljaju veliku opasnost za okoliš iako nisu uvršteni na popis postojanih organskih zagađivala.

Zagađivala organskog tipa poznata su već dugi niz godina, a predmet su raznih istraživanja upravo zbog svoje postojanosti u okolišu, a osim toga i tendencije da se zračnim masama prenose na velike udaljenosti pa su tako nađeni i na mjestima gdje se nikada nisu koristili, na polovima Zemlje. Konkretno, kasnih 1970-ih pronađeni su u masnom tkivu polarnog medvjeda na Arktiku nakon čega je uvelike porasla svijest o prisutnosti atmosferskih POPs-ova i njihovih negativnih učinaka na ljude i životinje. Ta pojava posljedica je njihove sposobnosti da se vežu za čestice prašine i aerosola. Posljedično, s lakoćom prelaze iz zraka i voda u tlo i biljke, a zatim na životinje i ljude. Osim toga, više su topljivi u lipidima, a manje u vodi zbog čega imaju tendenciju bioakumulacije u masnom tkivu. Budući da je metabolizam živih organizama relativno spor, zagađivala imaju veliku postojanost što im omogućava akumulaciju u hranidbenom lancu. Svojstvo koje, također, ne ide u korist je da ih karakterizira dugo vrijeme poluraspada koje može biti i nekoliko godina ili desetljeća u tlu/sedimentu te nekoliko dana u atmosferi [1–4].

Onečišćenje organskim zagađivalima narušava ekološku ravnotežu što podrazumijeva ugrožavanje okoliša i zdravlja svih organizama. Izloženost istim stvara razne ozbiljne zdravstvene probleme kao što su hormonalni poremećaji, rak, kardiovaskularne bolesti, pretilost, reproduktivne i neurološke bolesti te dijabetes. Kod životinja se negativan utjecaj dodatno manifestira i kao promjena omjera spolova, smanjena plodnost i slično [2].

---

<sup>1</sup> engl. *persistent organic pollutants*; POPs

### 2.1.1. Policiklički aromatski ugljikovodici

Policiklički aromatski ugljikovodici predstavljaju veliku skupinu organskih spojeva koji imaju jednu zajedničku karakteristiku; sastoje se od dva ili više povezanih aromatskih prstenova u različitim strukturnim konfiguracijama i pritom ne sadrže heteroatom niti nose supstituente. Razlog zbog kojeg su ovi spojevi predmet raznih istraživanja je saznanje da su mnoga oboljenja kod ljudi povezana upravo s toksičnom prirodom ovih organskih zagađivala [5–7]. Razne epidemiološke studije u kojima su se promatrali radnici zaposleni u industriji koksa i proizvodnji asfalta, u ljevaonicama, u proizvodnji aluminijske kao i ljudi koji su izloženi ispušnim plinovima dizelskih goriva dokazale su da određeni PAU-i imaju kancerogena i mutagena svojstva [8,9].

Iako je poznato oko 500 različitih PAU-a, istraživanja su usmjerena na one za koje se smatra da su najštetniji za okoliš i najtoksičniji za zdravlje ljudi i životinja. Američka Agencija za toksične spojeve i registar bolesti, ATSDR<sup>2</sup> proglasila je 1995. godine 17 takvih spojeva PAU-a „prioritetnima“. To su:

naftalen (Naf)	piren (Pir)
acenaften (Acenafta)	benzo[a]piren (BaP)
acenaftilen (Acenafti)	benzo[b]fluoranten (BbF)
antracen (Ant)	benzo[k]fluoranten (BkF)
fenantren (Fen)	benzo[j]fluoranten (BjF)
fluoren (Fl)	indeno[1,2,3-cd]piren (IP)
fluoranten (Flu)	benzo[ghi]perilen (BghiP)
benzo[a]antracen (BaA)	dibenzo[a,h]antracen (DahA)
krizen (Kri)	

---

<sup>2</sup> engl. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR*

Navedeni spojevi osim što se smatraju najtoksičnijima, nalaze se u višim koncentracijama u okolišu u odnosu na ostale PAU-e, prisutni su diljem svijeta, o njima je dostupno najviše podataka i dobro simuliraju općenitu izloženost PAU-ima. Najviše pažnje pridaje se BaP-u koji nije nužno najzastupljeniji, ali je uvijek prisutan ukoliko su prisutni PAU-i, te se stoga često koristi kao predstavnik skupine PAU-a. Zbog toga je bitno pri određivanju BaP razdvojiti benzo(e)piren (BeP) od BaP i identificirati ih u realnim uzorcima kako bi se točno provela procjena izloženosti i zdravstvenih učinaka istih na temelju izmjerenih koncentracija budući da se njihova toksičnost znatno razlikuje. Kod analitičkih metoda koje se fokusiraju samo na „prioritetne“ PAU-e, BeP se može pogrešno uzeti kao BaP budući da su to izomeri s istim  $m/z$  vrijednostima prekursora i produkt iona. Procijenjeni zdravstveni rizici mogu biti precijenjeni dvostruko što su pokazali Lung i Liu [10] u svojim istraživanjima. Svi navedeni spojevi PAU-a, osim B<sub>j</sub>F i BeP uvršteni su i na listu prioriternih spojeva Američke agencije za zaštitu okoliša, EPA<sup>3</sup>. Također, neki od njih klasificirani su i prema IARC<sup>4</sup> klasifikaciji kao vjerojatno karcinogeni [6, 11].

#### 2.1.1.1. Prisutnost policikličkih aromatskih ugljikovodika u tlu

Tlo je važna ekološka sastavnica koja izravno ili neizravno podržava život svih organizama. Predstavlja krajnje odredište za sve onečišćujuće tvari, ali usprkos tomu, dugo je bilo zanemareno što je negativno utjecalo na njegovu kvalitetu, a što se posebno odražava na poljoprivrednim djelatnostima. Konkretno, prisutnost organskih zagađivala rezultira promjenama u svojstvima tla poput promjene u veličini zrna, vodljivosti, poroznosti, sposobnosti zadržavanja vode i sl. Negativno utječu i na raznolikost, odnosno populaciju mikroba prisutnih u tlu. Posljedica toga može biti smanjenje samopročišćavanja tla kojeg provode upravo mikrobi [12].

Prema literaturnim podacima [13] koncentracija PAU-a u šumskom tlu kreće se od 5 do 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , u ruralnom od 10 do 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a u urbanom od 600 do 3000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  uglavnom zbog izgaranja fosilnih goriva. Sadržaj PAU-a u tlu uvelike je određen njihovim koncentracijama u atmosferi gdje se vežu za čestice ili se javljaju u plinovitoj fazi. Najčešće se iz izvora oslobađaju u plinovitoj fazi, a nakon ispuštanja u atmosferu podliježu izmjeni između plinovite i krute faze.

---

<sup>3</sup> engl. *U.S. Environmental Protection Agency*, EPA

<sup>4</sup> engl. *The International Agency for Research on Cancer*, IARC

U prijenosu PAU-a iz atmosfere u tlo važnu ulogu imaju biljke. Dostupni su podaci koji pokazuju da se samo mali dio PAU-a taloži izravno iz atmosfere na tlo, dok se čak polovica tih spojeva akumulira u biljkama i unosi u tlo nakon završetka vegetacijskog razdoblja [14].

Ponašanje PAU-a u tlima određeno je sljedećim procesima: sorpcija, razgradnja, evaporacija, fotodestrukcija i ispiranje. Nakon što PAU-i dospiju u tlo uglavnom se vežu za organsku tvar zahvaljujući svojoj hidrofobnoj prirodi zbog čega se ne ispiru u dublje slojeve tla. Vertikalna migracija u mineralnom tlu, dakle, ovisi o opsegu sorpcije organske tvari koja je opisana koeficijentom raspodjele organski ugljik/voda ( $K_{oc}$ ) koji je u korelaciji s koeficijentom raspodjele oktanol-voda ( $K_{ow}$ ). Unatoč tomu što se većinom akumuliraju u površinskom sloju tla bogatom organskom tvari, neki PAU-i se mogu pronaći i u nižim slojevima kao rezultat ispiranja otopljene tvari ili bioturbacije [15, 16]. Što se tiče fotorazgradnje, njoj mogu biti podvrgnuti samo u vrlo plitkom površinskom sloju (debljine oko 0,1 mm) stoga ovaj proces može djelovati samo u slučaju miješanja i periodičnog izdizanja različitih čestica tla na površinu. Isparavanje PAU-a odvija se s površine tla pri povišenoj temperaturi, a zatim se strujama zraka prenose u područja s nižom temperaturom te talože pri uvjetima koji pogoduju taloženju iz atmosfere. Međutim, isparavanje PAU-a općenito je niskog intenziteta zbog niske hlapljivosti većine ovih spojeva. Također, i ispiranje je od male važnosti zbog aktivne sorpcije i niske topljivosti [14].

Stupanj djelovanja PAU-a u tlima reguliran je određenim parametrima tla, a to su: veličina zrna čestica tla, organski ugljik i pH vrijednost. Brojna istraživanja potvrdila su da se vezanje PAU-a odvija prvenstveno na sitnijim/finijim česticama, tj. na mulju i glini. Čestice gline imaju veću površinu, samim time i više mjesta vezanja što rezultira intenzivnijom sorpcijom. Fine čestice podrazumijevaju manju poroznost, a time i manju migraciju adsorbiranih zagađivala tijekom vremenskog razdoblja što rezultira trajnom toksičnošću i dugotrajnim učincima. pH vrijednost tla, također, regulira stupanj zagađenja, ali u manjoj mjeri. Organski ugljik je komponenta za koju organska zagađivala imaju velik afinitet te su iz tog razloga tla s višim udjelom ugljika više zagađena. Kisela tla bogata huminskom i fulvinskom kiselinom predstavljaju bolji adsorbens od bazičnih budući da visok pH uzrokuje disocijaciju čestica tla i time onemogućuje vezivanje zagađivala. Iz navedenog se može zaključiti kako je kiselo tlo bogato organskim ugljikom s finim česticama najviše sklono zagađenju PAU-a i njihovim učincima te ga je teško sanirati [12, 17].



### 2.1.1.2. Izvori policikličkih aromatskih ugljikovodika

PAU-i mogu dospjeti u sastavnice okoliša, uključujući i tlo, iz prirodnih i antropogenih izvora, a potonji su uvelike važniji. Prirodni izvori uključuju kozmogene (kozmički objekti i prašina), petrogene (trošenje tvrdih stijena, izlivanje nafte, sinteza iz jednostavnih spojeva ugljika duboko u zemlji), biogene (stabla tropskih šuma) te pirogene izvore (šumski i prerijski požari te vulkani). Sve navedeno dovelo je do stvaranja ovih spojeva u raznim sedimentima, fosilima i fosilnim gorivima. Što se tiče antropogenih izvora, glavni su oni koji uključuju nepotpuno izgaranje organskog materijala kao što su drvo, fosilna goriva, naftni derivati i ugljen. Izvori PAU-a uključuju i proizvodnju koksa, kućna ložišta, plamenike na naftu i plin, ispušne plinove iz automobila te spalionice otpada. Manji izvor u smislu ukupne proizvodnje, ali od velike važnosti za ljudsko zdravlje je pušenje duhana [7, 18–20].

Sve do početka ovog stoljeća postojala je prirodna ravnoteža između proizvodnje i prirodne razgradnje PAU-a što je držalo pozadinsku koncentraciju niskom i relativno konstantnom. Međutim, s povećanjem industrijskog razvoja u cijelom svijetu, prirodna ravnoteža je narušena, a proizvodnja i stope akumulacije PAU-a su u stalnom porastu [21].

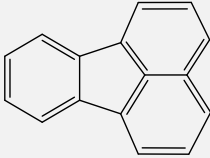
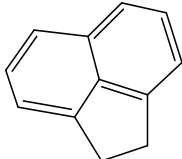
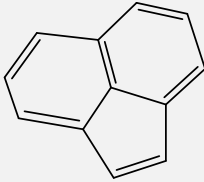
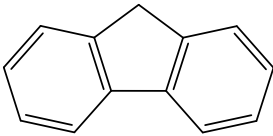
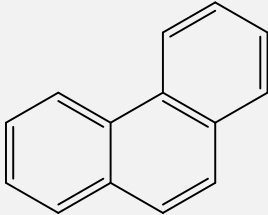
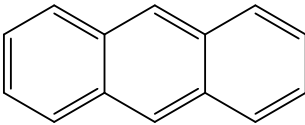
### 2.1.1.3. Fizikalno kemijske karakteristike

Policiklički aromatski ugljikovodici izrazito su postojani u okolišu, a to je posljedica više faktora. Prvenstveno, imaju visoku stabilnost zbog konjugiranih  $\pi$ -elektrona iz aromatskih prstenova. Nadalje, slabo su topljivi u vodi i izrazito hidrofobni. Općenito, povećanje veličine i kuta molekule PAU-a rezultira istodobnim povećanjem hidrofobnosti i elektrokemijske stabilnosti [6, 7].

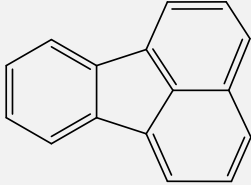
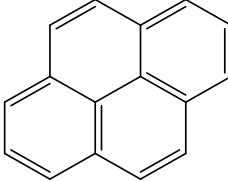
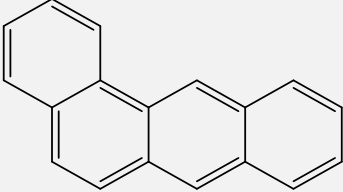
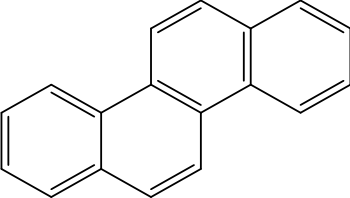
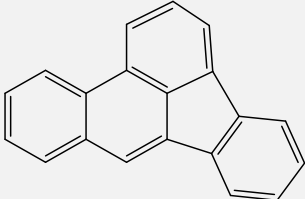
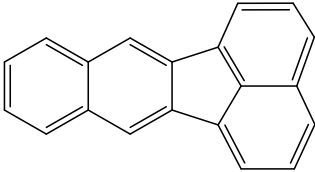
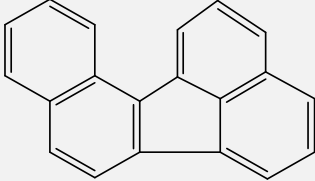
Opće karakteristike PAU-a su čvrsto stanje na sobnoj temperaturi (u plinovitom stanju su samo PAU niže molekulske mase), visoke točke tališta i vrelišta, izrazita lipofilnost, niski tlak para i slaba topljivost u vodi pri čemu posljednja dva opadaju porastom broja aromatskih prstenova. Zbog slabe topljivosti i velike hidrofobnosti brzo se vežu s organskim i anorganskim česticama u tlu što je razlog njihove veće prisutnosti u tlu (95 %) nego u zraku (0,2 %). Nadalje, pokazuju različita svojstva poput vodljivosti, osjetljivosti na svjetlost, otpornosti na toplinu, otpornosti na koroziju kao i različita fiziološka djelovanja. Posjeduju vrlo karakteristične UV apsorpcijske

spektre, tj. za svaku strukturu je jedinstven što je posebno korisno u njihovoj identifikaciji. Većina ih je fluorescentna, emitiraju karakteristične valne duljine svjetlosti kada su pobuđeni. Koeficijent raspodjele,  $K_{ow}$ , je relativno visok, iz čega proizlazi da se ovi spojevi dobro adsorbiraju na suspendirane krute čestice prisutne u vodenom stupcu te da su sklони bioakumulaciji u morskim/vodenim organizmima. U Tablici 1. prikazana su neka kemijska i fizikalna svojstva određivanih PAU-a [22–24].

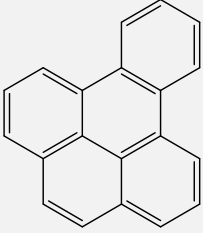
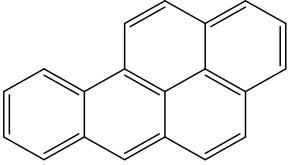
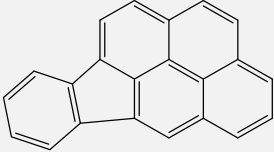
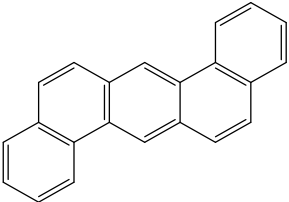
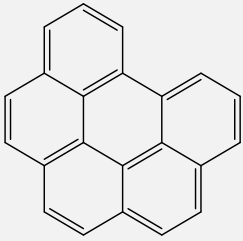
Tablica 1. Fizikalno kemijska svojstva policikličkih aromatskih ugljikovodika [25, 26]

PAU	Molekulska formula	Strukturna formula	Tlak pare/ Pa
Naftalen	$C_{10}H_8$		10,9
Acenaften	$C_{12}H_{10}$		$4,0 \times 10^{-1}$
Acenaftilen	$C_{12}H_8$		$1,3 \times 10^{-1}$
Fluoren	$C_{13}H_{10}$		$1,1 \times 10^{-1}$
Fenantren	$C_{14}H_{10}$		$2,6 \times 10^{-2}$
Antracen	$C_{14}H_{10}$		$1,2 \times 10^{-3}$

nastavak Tablice 1.

PAU	Molekulska formula	Strukturna formula	Tlak pare/ Pa
<b>Fluoranten</b>	$C_{16}H_{10}$		$1,6 \times 10^{-3}$
<b>Piren</b>	$C_{16}H_{10}$		$3,3 \times 10^{-4}$
<b>Benzo(a)antracen</b>	$C_{20}H_{12}$		$3,3 \times 10^{-4}$
<b>Krizen</b>	$C_{18}H_{10}$		$1,4 \times 10^{-6}$
<b>Benzo(b)fluoranten</b>	$C_{20}H_{12}$		$1,0 \times 10^{-6}$
<b>Benzo(k)fluoranten</b>	$C_{20}H_{12}$		$1,3 \times 10^{-8}$
<b>Benzo(j)fluoranten</b>	$C_{20}H_{12}$		/

nastavak Tablice 1.

PAU	Molekulska formula	Strukturna formula	Tlak pare/ Pa
<b>Benzo(e)piren</b>	$C_{20}H_{12}$		$7,9 \times 10^{-7}$
<b>Benzo(a)piren</b>	$C_{20}H_{12}$		$5,3 \times 10^{-8}$
<b>Indeno(1,2,3-cd)piren</b>	$C_{22}H_{12}$		/
<b>Dibenzo(a,h)antracen</b>	$C_{22}H_{14}$		$4,9 \times 10^{-9}$
<b>Benzo(ghi)perilen</b>	$C_{22}H_{12}$		$1,0 \times 10^{-8}$

#### 2.1.1.4. Propisi u Republici Hrvatskoj

U Republici Hrvatskoj maksimalno dopuštene koncentracije PAU-a u tlu određene su Pravilnikom o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od onečišćenja otisnutim u Narodnim novinama, NN 9/2014 [27]. U Tablici 2. prikazane su njihove vrijednosti za određene PAU-e.

Tablica 2. Maksimalno dopuštena koncentracija (MDK) za policikličke aromatske ugljikovodike u poljoprivrednom tlu u RH

PAU	MDK/ mg/kg suhog tla
Naftalen	0,1
Acenaftalen	0,1
Fluoren	0,1
Fenantren	0,2
Antracen	0,1
Fluoranten	0,2
Benzo(a)antracen	0,2
Benzo(a)piren	0,2
Benzo(b)fluoranten	0,2
Benzo(k)fluoranten	0,2
Benzo(g,h,i)perilen	0,2
Krizen	0,2
Dibenzo(a,h)antracen	0,1
Indeno(1,2,3,-c,d)piren	0,2
Piren	0,2
Suma PAU-a	
- za lakša i skeletna tla	1
- za teška tla	2

### 2.1.2. Postojana organska zagađivala

U postojana organska zagađivala ubraja se nekoliko tisuća organskih spojeva podijeljenih u više skupina kao što su: poliklorirani dibenzo-p-dioksini (PCDD), poliklorirani dibenzofurani (PCDF), poliklorirani bifenili (PCB), poliklorirani naftaleni (PCN), poliklorirani alkani (PCA), klorirani bornani (CHB), poliklorirani kamfeni (PCC), organoklorovi pesticidi (OCP), polibromirani difenil-eteri (PBDE) i heksabromciklododekani (HBCD) [5]. Budući da se će u ovom diplomskom radu iz ove skupine zagađivala obrađivati isključivo PCB-i i OCP-i, na njih će biti stavljen najveći naglasak. Kao i policikličke aromatske ugljikovodike, karakterizira ih otpornost na okolišne uvjete te izrazita toksičnost po žive organizme. Zbog toga je u svrhu smanjenja njihove koncentracije u okolišu ili čak njihovog iskorjenjivanja održana 2001. godine Stockholmska konvencija na kojoj su zakonodavna tijela iz 92 države formirala popis 12 spojeva nazvan „*dirty dozen*“ ili „*legacy POPs*“. U Republici Hrvatskoj je Zakon o potvrđivanju Stockholmske konvencije prihvaćen 2006. godine. Iako su kasnije identificirana i dodatna zagađivala ove vrste, ključna je briga za ovih jedinstvenih 12. Grupa uključuje 10 namjerno proizvedenih, industrijskih zagađivala: aldrin, endrin, klordan, DDT, dieldrin, heptaklor, mireks, toksafen, heksaklorobenzen (HCB), PCB-i i dva nenamjerno stvorena zagađivala, tj. ona koja se nisu proizvodila i primjenjivala: poliklorirani dibenzo-p-dioksini (PCDD) i poliklorirani dibenzofurani (PCDF) [2, 28].

PCB-i su prvi put proizvedeni 1930. godine u SAD-u, a zbog svoje opće kemijske inertnosti i toplinske stabilnosti koristili su se diljem svijeta kao rashladna sredstva i maziva u električnoj opremi (kondenzatori i transformatori). Osim toga, zbog nezapaljivosti, visoke točke vrelišta i električnih izolacijskih svojstava, PCB-i su korišteni u raznim industrijskim i komercijalnim djelatnostima. Nikad se nisu rabili kao pojedinačni spojevi nego kao smjese od 50 i više kongenera. Na tržište su dolazili pod raznim imenima, npr. Aroclor (SAD), Phenoclor (Francuska), Clophen (Njemačka), Sovol (Rusija) i Kanechlor (Japan). Proizvodili su se industrijski više od 50 godina i primjenjivali su se u gotovo svakoj zemlji svijeta. Međutim, već 1977. godine SAD su prepoznale negativan utjecaj ovih spojeva na okoliš te su zaustavile proizvodnju. Niti jedan poznati potrošački proizvod koji se trenutno proizvodi u SAD-u ne sadrži PCB, iako ih neki industrijski procesi još uvijek oslobađaju [29–31].

OCP-i su skupina kloriranih spojeva koji su se dugi niz desetljeća primjenjivali za iskorjenjivanje štetočina i posrednika bolesti u poljoprivredi, kućanstvu i javnom zdravstvu. Podijeljeni su u tri grupe, a to su: diklordifenil etani (npr. DDT, DDD i DDE), klorirani

ciklodieni (primjer: aldrin, dieldrin, heptaklor i endosulfan) i heksaklorocikloheksani (npr.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ -HCH). Pregledni statistički podaci o korištenju različitih pesticida pokazuju da 40 % svih korištenih pesticida pripada upravo klasi organoklorovih pesticida. Jedna od najčešćih primjena OCP-a bila je u azijskim zemljama u razvoju i to za suzbijanje malarije i tifusa. Najčešće korišteni bili su DDT, HCH, aldrin i dieldrin i to zbog visoke efikasnosti suzbijanja te niske cijene [32–34].

Nakon što je u svijetu korištenje ovih spojeva ograničeno ili potpuno zabranjeno njihova se koncentracija u okolišu počela postupno snižavati. Unatoč opasnostima koje imaju po okoliš, te se kemikalije i dalje proizvode, koriste i skladište u mnogim zemljama. Iako je većina zabranjena diljem svijeta, njihova postojanost, u kombinaciji s činjenicom da je još uvijek prisutna proizvodnja i puštanje u globalno okruženje, osigurava njihov put u svjetsku opskrbu hranom [35].

#### 2.1.2.1. Postojana organska zagađivala u tlu

Trenutne koncentracije organoklorovih spojeva u okolišu ponajprije su posljedica njihove nekadašnje upotrebe, iako čak i danas postoje primarni izvori njihove emisije u okoliš. U relativno nezagađenim područjima razine PCB-a i OCP-a su oko 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [31]. Činjenica je da se u tlu ne nalaze u visokim koncentracijama upravo zbog uvedenih ograničenja i zabrana, ali to nije manje zabrinjavajuće budući da zagađena tla predstavljaju jedan od glavnih rezervoara postojanih organoklorovih spojeva, odnosno u uzorcima tala detektirane su najviše koncentracije od svih okolišnih uzoraka. Shodno tome, značajni su sekundarni izvori onečišćenja okoliša ovim zagađivalima. Posljedica je to visokog afiniteta za tlo i vodene sedimente, kao što je bio slučaj i kod policikličkih aromatskih ugljikovodika. Također, afinitet je viši što je viši sadržaj organskog ugljika [28, 36].

PCB-i i OCP-i dospijevaju u tlo oborinama ili suhim taloženjem iz atmosfere u kojoj mogu biti u plinovitoj fazi ili adsorbirani na lebdeće čestice. U tlu dolazi do njihove raspodjele koja ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima tla i samog zagađivala, sadržaju vlage u tlu, okolišnim uvjetima, blizini izvora zagađivala te načinu i vremenu primjene [28]. Osim razdiobe, zagađivala podliježu i procesima isparavanja, kemijskoj ili biološkoj transformaciji te bioakumulaciji. Navedeni procesi mijenjaju njihovu strukturu i diktiraju njihovu sudbinu u okolišu. U slučaju PCB-a, intenzitet pojedinog procesa kojem podliježe ovisi o stupnju

kloriranosti molekule bifenila. Pritom se podrazumijeva da se više klorirani PCB kongeneri snažnije adsorbiraju na sediment i tlo u kojem ostaju s poluživotom od nekoliko mjeseci pa sve do nekoliko godina [29].

#### 2.1.2.2. Izvori postojanih organskih zagađivala

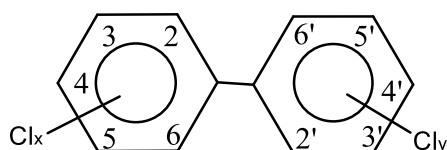
Široka upotreba PCB-a u različitim komercijalnim i industrijskim primjenama, zajedno s njihovim neodgovarajućim odlaganjem, uzrokovala je ozbiljno onečišćenje okoliša. Električne komponente (kondenzatori i transformatori) i drugi PCB otpad iz odlagališta ispuštaju ih u zrak budući da odlagališta nisu posebno dizajnirana za rukovanje opasnim PCB otpadom. Otprilike jedna trećina ukupnih PCB-a proizvedenih u SAD-u već je ušla u okoliš i njihova kontaminacija nastavlja rasti odlaganjem starih električnih uređaja. Spaljivanje komunalnog otpada moglo bi dodatno povećati njihovu kontaminaciju stvaranjem štetnih nusproizvoda uključujući dioksine i furane te klorovodik. Međutim, PCB-i također mogu ući u okoliš isparavanjem boja, premaza i plastike, izravnim curenjem u kanalizaciju i potoke, odlaganjem otpada na nesigurna odlagališta nakon čega slijede druge tehnike zbrinjavanja kao što je odlaganje u ocean. Unatoč propisima, nekoliko PCB-a se nezakonito baca na otpad zbog neznanja ili nemara. Osim navedenog, slučajna izlivanja i curenja sekundarni su izvori koji u manjoj mjeri doprinose globalnoj kontaminaciji PCB-ima [30, 36, 37].

Glavni izvor organoklorovih pesticida u okoliš je primjena pesticida u poljoprivrednim djelatnostima. Pokazano je da samo mali postotak (0,3 %) primijenjenih pesticida odlazi u ciljanoj skupinu nametnika, dok 99,7 % odlazi u okoliš [38]. U tlo dospjevaju putem vode koja je jedan od primarnih načina transporta iz područja primjene na druga mjesta u okolišu. Zagađenje podzemne vode pesticidima posebno je akutno u ruralnim poljoprivrednim područjima gdje se preko 95 % stanovništva koristi podzemnim vodama za piće. Osim toga, mogu dospjeti i iz kontaminiranog otpada odbačenog na odlagališta i ispuštanja iz industrijskih jedinica koje sintetiziraju te kemikalije [33, 34].



### 2.1.2.3. Fizikalno kemijske karakteristike

Poliklorirani bifenili su sintetski organski spojevi proizvedeni iz bifenila zamjenom vodika s atomima klora. Broj i položaj atoma klora (kojih može biti ukupno 10) na fenilnim prstenovima razlikuje PCB kongenere kojih postoji ukupno 209. Međutim, u okolišu je stvaran broj njihovih kongenera mnogo manji od teorijski mogućih. Opća kemijska formula je  $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ , a opća struktura prikazana je na Slici 1. Veza ugljik-klor vrlo je stabilna prema hidrolizi, a veći broj supstitucijskih i/ili funkcionalnih skupina klora dovodi do veće otpornosti na biološku i fotolitičku razgradnju. Fizikalno-kemijska svojstva ovise o stupnju kloriranosti. Visoko klorirani PCB kongeneri obično imaju relativno visoke koeficijente raspodjele  $K_{ow}$  pa se često nalaze u organskim tvarima kao što su tlo i sedimenti. Osim toga, lipofilniji su, imaju veću temperaturu tališta te manju topljivost u vodi i hlapljivost. Takav trend podataka vidljiv je iz vrijednosti prikazanih u Tablici 3. Za neke PCB-e prikazane su po dvije vrijednosti za određeno svojstvo, a razlog tomu je raznolikost dostupnih literaturnih podataka [2, 28, 36, 39, 40].



Slika 1. Opća struktura formula polikloriranih bifenila [41]

Tablica 3. Fizikalno kemijska svojstva polikloriranih bifenila [42]

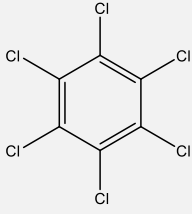
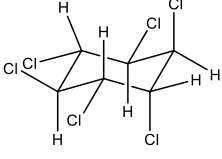
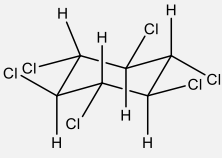
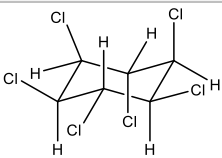
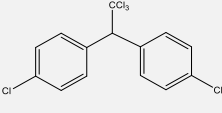
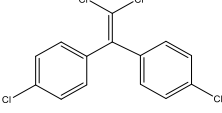
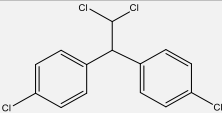
PCB	$\log K_{ow}$	TOPLJIVOST U VODI/ mol/m <sup>3</sup>	TLAK PARA (25°C)/ Pa	HENRYEVA KONSTANTA/ Pa m <sup>3</sup> /mol
PCB-28	5,5	7,9x10 <sup>-4</sup>	2,6x10 <sup>-2</sup>	33
		1,0x10 <sup>-3</sup>	3,4x10 <sup>-2</sup>	32
PCB-52	5,8	8,1x10 <sup>-5</sup>	1,3x10 <sup>-2</sup>	160
		1,4x10 <sup>-4</sup>	1,6x10 <sup>-2</sup>	34
PCB-101	6,4	1,2x10 <sup>-5</sup>	2,6x10 <sup>-3</sup>	217
		5,0x10 <sup>-5</sup>	3,3x10 <sup>-3</sup>	25
PCB-118	6,6	4,7x10 <sup>-4</sup>	8,4x10 <sup>-4</sup>	18
			1,2x10 <sup>-3</sup>	
PCB-138	6,7	4,8x10 <sup>-6</sup>	3,3x10 <sup>-4</sup>	69
			5,0x10 <sup>-4</sup>	
PCB-153	6,8	2,5x10 <sup>-6</sup>	5,6x10 <sup>-4</sup>	224
		7,7x10 <sup>-6</sup>	6,8x10 <sup>-4</sup>	13
PCB-180	7,2	7,9x10 <sup>-7</sup>	8,1x10 <sup>-5</sup>	102
			1,3x10 <sup>-4</sup>	

Zbog svojih svojstava, PCB-i mogu ući u sve sastavnice okoliša i održavati se godinama bez biološke razgradnje, oksidacije ili redukcije u bilo kojoj značajnoj mjeri. Otporni su na kiseline, baze i toplinu zbog svog hidrofobnog karaktera. PCB-i su izrazito lipofilni spojevi što dovodi do akumulacije u masnom tkivu ljudi i životinja i koncentriranju kroz prehrambeni lanac. Stoga je glavni način izloženosti ljudi PCB-ima putem hrane, posebice mesa, ribe i mliječnih proizvoda [30].

Organoklorovi pesticidi, kao što je već spomenuto, podijeljeni su u 3 grupe. Prvu grupu čine diklordifenil etani od kojih je najpoznatiji DDT. On je ujedno i najčešće korišteni insekticid i pesticid u poljoprivrednoj praksi, a karakteriziraju ga visoka postojanost i poluživot od dvije do čak petnaest godina. Nadalje, klorirani ciklodieni su derivati heksaklorociklopentadiena, također korišteni za suzbijanje insekata. Posljednji, heksaklorocikloheksani postoje kao 5 izomera ( $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH,  $\delta$ -HCH,  $\varepsilon$ -HCH) od kojih samo  $\gamma$ -HCH ima insekticidna

svojstva [32, 33]. U Tablici 4. prikazane su strukture i fizikalno-kemijska svojstva OCP-a koji su analizirani.

Tablica 4. Strukture i fizikalno kemijska svojstva organoklorovih pesticida [28, 32]

OCP	STRUKTURNA FORMULA	$\log K_{ow}$	TOPLJIVOST U VODI/ $\text{mol/m}^3$	TLAK PARA (25°C)/ Pa	HENRYEVA KONSTANTA/ $\text{Pa m}^3/\text{mol}$
HCB		5,64	0,0014	0,094	65
$\alpha$ -HCH		3,94	0,333	0,245	0,735
$\beta$ -HCH		3,91	1,44	0,0529	0,037
$\gamma$ -HCH		3,83	0,247	0,0757	0,306
<i>p,p'</i> -DDT		6,93	0,00079	0,0034	4,2
<i>p,p'</i> -DDE		6,33	0,0023	0,0012	0,50
<i>p,p'</i> -DDD		6,39	0,00042	0,00048	1,1

#### 2.1.2.4. Propisi u Republici Hrvatskoj

Pravilnik o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od onečišćenja (NN 9/2014) ne daje maksimalno dopuštene koncentracije za svaki pojedinačni PCB i OCP spoj, već postoje vrijednosti za smjese, tj. ukupna maksimalna dopuštena koncentracija [27]. U Tablici 5. prikazane su te vrijednosti za pojedinu skupinu spojeva.

*Tablica 5. Maksimalno dopuštena koncentracija za smjese PCB-a i OCP-a u poljoprivrednom tlu u RH*

<b>SMJESA</b>	<b>SPOJEVI</b>	<b>MDK/ mg/kg suhog tla</b>
<b>PCB</b>	PCB28+PCB52+PCB101+ PCB118+PCB138+ PCB153+PCB180	0,2
<b>DDT/DDD/DDE</b>	DDT+DDD+DDE	0,1

## 2.2. Tlo

Tlo je jedna od sastavnica biosfere i jedan od najvažnijih prirodnih resursa te kao takvo uvjetuje i osigurava biljnu proizvodnju koja je preduvjet postojanja života na Zemlji, regulira kemijski sastav atmosfere (u nižim slojevima) i hidrosfere te kruženje tvari. Osim toga regulira raspodjelu i brojnost živih organizama u ekosustavu, djeluje kao filter i pufer u fizikalnim, kemijskim i biokemijskim procesima u tlu. Nosač je svih objekata ljudskoga rada, a može biti i izvor sirovina (treset, pijesak i dr.). Međutim, razne prirodne i antropogene aktivnosti uzrokuju narušavanje njegove kvalitete. Primjeri aktivnosti su; unos zagađivala iz atmosfere (sumporov dioksid, dušikovi oksidi, teški metali), pad humizacije, razaranje strukture oraničnih tala, erozija tla vodom i vjetrom, neprovjereni intenzitet sječe u šumi, štetni utjecaj šumskih požara te unos organskih zagađivala u poljodjelsko tlo. Iz tog je razloga potrebno ulagati velike napore u prevenciju štete i mjere zaštite ove sastavnice okoliša, odnosno voditi računa o sljedećim indikatorima: promjeni sadržaja organske tvari tla, zbijanju tla i poremećaju strukture, zakiseljavanju i eutrofikaciji.

Tlo je rastresiti, površinski dio Zemljine kore koji se sastoji od mineralnih čestica, organskih tvari, vode, zraka i živih organizama. Čvrsta mineralna faza čini 30-60 % sadržaja tla, a u njoj se ističu čestice pijeska, sitnog pijeska, praha, gline te koloidne čestice. Sve one povezane su u veće ili manje nakupine koje se nazivaju agregati, a između kojih se nalaze pore. Tekuća faza tla sastoji se uglavnom od vode u kojoj su koloidno dispergirane različite organske i anorganske tvari. Upravo su količine vode i zraka te koje utječu na razne procese koji se odvijaju u tlu, a mijenjaju se ovisno o količini oborina, dotjecanju vode sa strane i evaporaciji/transpiraciji. Nadalje, humus je, uz glinu, najdinamičnija komponenta tla i u stalnim je transformacijama ovisno o hidrotermičkim uvjetima, mikroorganizmima i čovjekovu utjecaju. Iz tog razloga sadržaj organske tvari varira između 2 i 10 %. Izrazito je bitna sastavnica tla budući da njegova količina i kvaliteta utječu na strukturu tla, konzistenciju, gustoću, kapacitet i propusnost za vodu. Također, humus je komponenta za koju se veže čak 50 % opasnih zagađivala koji dopijaju u tlo [5, 43, 44].

Fizikalno-kemijske karakteristike tala razlikuju se u prostoru i vremenu zbog varijacija u topografiji, klimi, fizičkim procesima trošenja, vegetacijskom pokrovu, mikrobnim aktivnostima i nekoliko drugih biotičkih i abiotičkih varijabli. To rezultira različitim profilima tla, tj. različitom bojom, sastavom, kvalitetom i sl. [45, 46].

Karakterizacija tla podrazumijeva fizikalna ispitivanja i kemijsku analizu. Fizikalne karakteristike uključuju strukturu, teksturu, gustoću, poroznost, higroskopsnost i raspodjelu veličina čestica, dok se kemijske karakteristike odnose na specifičnu provodnost, pH, puferski i sorpcijski kapacitet, stanje zasićenosti adsorpcijskog kompleksa, udio karbonata, humusa, aluminija, fosfora, kalija, dvovalentnih kationa ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) i pristupačnih mikroelemenata (Cu, Fe, Mn, Zn) [47].

## 2.3. Kemijska analiza organskih zagađivala u tlu

### 2.3.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje je proces odabira dijela materijala za predstavljanje ili pružanje informacija o većem dijelu materijala. Prvi je i najkritičniji korak kemijske analize budući da mora rezultirati reprezentativnim uzorkom, tj. uzorkom koji će predstavljati cjelinu iz koje je uzet, a osim toga mora zadržati sve bitne značajke te cjeline. Jedan od preduvjeta kvalitetnog uzorkovanja je identifikacija te cjeline koja se naziva i populacijom. Identifikacija podrazumijeva poznavanje kemijskog sastava, razdiobu veličina čestica, agregatno stanje i sl. Osim toga, bitan preduvjet je i homogenost populacije što je otežavajući faktor u slučaju uzorkovanja tla budući da je tlo izrazito heterogenog sastava [5, 48].

Prije provedbe samog postupka uzorkovanja potrebno je definirati jasan i ostvariv cilj, svrhu istog te željenu kemijsku informaciju. Sve to sadržano je upravo u planu uzorkovanja koji se razlikuje ovisno o tome određuju li se tragovi nekog analita ili makrosastojak. Međutim, da bi se plan mogao uopće sastaviti potrebno je poznavati prirodu i svojstva materijala. Nakon toga slijedi definiranje postupka uzorkovanja, odnosno hoće li se izvoditi *in situ* ili u laboratoriju. Nadalje, potrebno je odrediti mjesto i vrijeme uzorkovanja te broj i količinu uzoraka koji pak ovise o zahtijevanoj točnosti i preciznosti metode. Konkretno, uzorci tla mogu biti određeni geografskom širinom i dužinom ili u odnosu prema nekom objektu. Navedeni faktori ujedno su i ograničavajući budući da broj uzoraka ovisi o broju analiza koje je moguće provesti, količina je uvjetovana ograničenošću korištene tehnike, a mjesto ograničenom dostupnošću. Uz to, plan sadrži i način kojim će se postići reprezentativnost uzorka, njegovu dostupnost i stabilnost te transport i skladištenje. Posljednji, ali ne manje važan faktor prilikom planiranja uzorkovanja je cijena [5, 49].

Prilikom uzorkovanja čvrstih uzoraka, konkretno tla, potrebno je obratiti pažnju na klimatske uvjete na mjestu uzorkovanja, dubinu prodiranja zagađivala u tlo, vrstu tla te intenzivnost njegove obrade i vegetacije. Uzorkovanje se vrši sondama u obliku cilindričnih i stožastih svrdla od materijala koji neće onečistiti uzorak tla. U slučaju kada ova sredstva nedostaju, uzorkovanje se može provesti i priručnim sredstvima, npr. lopatama. Uzima se najmanje 1 kg tla te se sprema u dobro zatvorene plastične vreće koje onemogućuju kontaminaciju različitim spojevima iz atmosfere. Dubina uzorkovanja ovisi ponajprije o svojstvima zagađivala, ali i o

vrsti tla i vremenu koje je prošlo od trenutka ispuštanja. Tako uzorkovano tlo prenosi se u hermetički zatvorenim metalnim spremnicima do laboratorija gdje slijedi sušenje, usitnjavanje, smanjivanje uzorka te daljnja analiza. Sušenje se odvija u kontroliranim uvjetima kako bi se izbjegla promjena kemijskog sastava [5, 48, 50].

### 2.3.2. Metode pripreme uzorka

Priprava uzorka je najčešće nužna jer su čak i najjednostavniji uzorci uglavnom neprikladni za izravnu analizu zbog pretjeranog razrjeđenja ili koncentracije ciljanih analita ili nekompatibilnosti s postupcima rada instrumenta.

Priprava uzorka podrazumijeva proces prevođenja realnog uzorka u uzorak pogodan za analizu. Svrha pripreme je ukloniti interferencije i time povećati selektivnost metode, zatim povećati koncentraciju analita da bi se dosegla granica kvantifikacije, prevesti analit u oblik najpogodniji za odjeljivanje i određivanje te osigurati otpornost i ponovljivost metode. Korak je to u kemijskoj analizi koji je posebno bitan za okolišne uzorke budući da su oni vrlo složeni i kao takvi se ne mogu izravno analizirati. U većini slučajeva, predstavlja glavni izvor pogreške i ostaje jedan od koraka koji zahtijevaju najviše vremena [5, 51].

Moderne metode pripreme uzoraka, koje se uglavnom i koriste u praksi, zasnivaju se na ekstrakciji koja obuhvaća metode koje zadržavaju analit te one koje omogućuju prijelaz analita u manji volumen drugog otapala. Ono što je zajedničko svim ekstrakcijskim metodama jest da se koriste principom selektivnog koncentriranja analita u jednoj fazi, a selektivnost se postiže promjenom radnih uvjeta [5].

Priprava plinovitih i tekućih uzoraka jednostavna je budući da se oni homogeniziraju miješanjem i mućkanjem. To nije slučaj sa čvrstim uzorcima, konkretno tlom, budući da ono zahtijeva usitnjavanje, homogeniziranje i ostale fizikalne procese koji onda mogu unijeti dodatnu pogrešku u sustav. Prije usitnjavanja, tlo je potrebno i osušiti što se odvija u kontroliranim uvjetima kako bi se izbjegla promjena kemijskog sastava. Slijedi postupak smanjivanja veličine zrnatih i praškastih uzoraka i za to se koristi metoda „konus i četvrtina“. Uzorak se postavlja na ravnu površinu u obliku stožaste hrpe koja se zatim raširi i spljošti u kružni kolač. Kolač se podijeli na približno jednake četvrtine te se uklanja jedan par suprotnih četvrtina. Taj par se sjedinjuje i oblikuje u novi konus da bi se postupak ponovio, dok se ostale

dvije četvrtine odbacuju. Postupak se ponavlja onoliko puta koliko je potrebno da se dobije uzorak potrebne veličine [5, 48].

### 2.3.2.1. Ekstrakcija iz čvrstih uzoraka

Ekstrakcija analita iz čvrstih uzoraka podrazumijeva proces desorpcije analita iz matice uzorka te njegovo otapanje u odgovarajućem otapalu. Koliko će izdvajanje analita u otapalo biti učinkovito ovisi o topljivosti samog analita u tom otapalu, prijenosu mase i matici uzorka. Topljiivost analita određena je prirodom otapala, temperaturom i tlakom. Prijenos mase uključuje prodiranje otapala u maticu uzorka i uklanjanje analita s adsorbirane površine pa shodno tomu topljivost ovisi o difuzijskom koeficijentu, veličini čestica uzorka i strukturi matice. Općenito, prijenos analita iz uzorka u otapalo vjerojatniji je na višim temperaturama i tlakovima, pri nižim viskoznostima otapala i manjim veličinama čestica.

Ekstrakcijske metode dijele se prema primijenjenim temperaturama i tlakovima i to na one koje se provode pri atmosferskom tlaku, uz grijanje i ultrazvučnu ekstrakciju te na one koje se provode pri povišenim tlakovima i temperaturama. U prvu skupinu ubrajaju se Soxhlet/automatizirani Soxhlet te ultrazvučna ekstrakcija, a u drugu ekstrakcija superkritičnim fluidom, ekstrakcija pregrijanom vodom, tlačna ekstrakcija otapalom te mikrovalna ekstrakcija pri povišenom tlaku i temperaturi. U nastavku će biti ukratko opisana svaka od navedenih ekstrakcija, a posebno ekstrakcija raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu budući da je to metoda na kojoj se temelji ovaj diplomski rad [5, 52].

- Soxhlet/automatizirani Soxhlet

Soxhlet ekstrakcija klasična je metoda pripreme već više od jednog stoljeća, a podrazumijeva kontinuirani prolazak kondenziranog otapala kroz čvrsti uzorak. To je ujedno i prednost metode budući da se na taj način uzorak više puta dovodi u kontakt s otapalom. Osim toga, nakon ispiranja nije potrebna filtracija, a protok uzorka može se povećati izvođenjem nekoliko istovremenih ekstrakcija paralelno, što je olakšano niskim troškovima osnovne opreme. Štoviše, Soxhlet ekstrakcija vrlo je jednostavna metodologija koja zahtijeva malo obuke, a može izvući više mase uzorka od većine najnovijih alternativa. Međutim, metoda ima i niz nedostataka, a to su dugo vrijeme potrebno za ekstrakciju i velika količina otpadnog ekstrakta, čije je odlaganje ne samo skupo, već je i izvor dodatnih ekoloških problema. Uzorci se obično



ekstrahiraju na točki vrelišta otapala što može rezultirati toplinskom razgradnjom termolabilnih analita. Također, konvencionalni Soxhlet uređaj ne osigurava miješanje, što bi ubrzalo sami postupak. Velike količine ekstrakta zahtijevaju korak isparavanja i koncentriranja nakon ekstrakcije. U svrhu optimiranja postojeće Soxhlet metode, razvijen je automatizirani Soxhlet/Soxtec. Ovaj aparat koristi kombinaciju refluksnog vrenja i Soxhletove ekstrakcije (oboje potpomognuto električnim grijanjem) za izvođenje dva koraka ekstrakcije (vrenje i ispiranje), nakon čega slijedi obnavljanje ekstrakta. Automatizacija je omogućila uštede u vremenu i količini otapala [52, 53].

- Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija (USE)<sup>5</sup> temelji se na fenomenu akustične kavitacije koji podrazumijeva stvaranje, širenje i implozivni raspad mjehurića u tekućini. Mjehurići nastaju zbog naizmjeničnih promjena tlaka prilikom prolaska ultrazvuka kroz medij. Ultrazvuk je relativno jednostavan za korištenje, svestran i fleksibilan te zahtijeva niska ulaganja u usporedbi s drugim novim tehnikama ekstrakcije. Nudi ekološki prihvatljivu, čistu pripremu uzorka s nekoliko prednosti, a najvažnije su smanjenje vremena pripreme (10-45 min), mogućnost ekstrahiranja relativno velike mase uzorka (2-30 g) i smanjenje količine korištenog otapala (do 100 mL). Međutim, ograničavajući faktor je djelotvornost koja je manja nego kod nekih drugih metoda, a uz to je ekstrakt potrebno naknadno uparivati, pročišćavati i filtrirati [5, 54].

- Ekstrakcija superkritičnim fluidom

Ekstrakcija superkritičnim fluidom (SFE)<sup>6</sup>, kao što i sami naziv kaže, koristi superkritične fluide kao sredstvo za odvajanje analita iz matice. Najpoznatiji i najkorišteniji superkritični fluid je ugljikov dioksid, a uvjeti na kojima postiže ta svojstva su 31°C i 74 bar. Osim relativno blagih uvjeta na kojim se postižu superkritični uvjeti, CO<sub>2</sub> je netoksičan, nezapaljiv, bez mirisa, okusa, inertan i jeftin. Svojstvo zbog kojeg se koristi kao ekstrakcijsko otapalo je bolja topljivost analita što je posljedica višeg difuzijskog koeficijenta i niže viskoznosti. Ovom ekstrakcijskom metodom znatno se smanjio volumen korištenih otapala, metoda ne zahtijeva naknadno uklanjanje otapala budući da se CO<sub>2</sub> uklanja jednostavnim smanjenjem tlaka, ne traje dugo (10-60 min) i prihvatljiva je za okoliš [55, 56].

---

<sup>5</sup> engl. *ultrasonic extraction*, USE

<sup>6</sup> engl. *supercritical fluid extraction*, SFE

- Ekstrakcija pregrijanom vodom

Voda je jedinstveno otapalo koje na sobnoj temperaturi ima izrazito visoko vrelište obzirom na masu molekule, visoku dielektričnu konstantu i polarnost. Međutim, povišenjem temperature dolazi do promjene u svojstvima upravo zbog narušavanja vodikovih veza što onda rezultira značajnim i sustavnim smanjenjem permitivnosti, povećanjem brzine difuzije te smanjenjem viskoznosti i površinske napetosti. S takvim svojstvima, voda može otapati i velik broj različitih analita, konkretno slabo polarne analite što ju čini dobrom zamjenom za organska otapala. Najveća primjena ekstrakcije pregrijanom vodom (SHWE)<sup>7</sup> bila je u analizama PAU-a, PCB-a i pesticida u okolišnim uzorcima, koja daje usporedive rezultate sa Soxhlet ekstrakcijom, ali je brža i bez upotrebe značajnih količina organskih otapala [57].

- Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalna ekstrakcija (MAE)<sup>8</sup> temelji se na izdvajanju analita iz uzorka u otapalo pod utjecajem mikrovalova. Otapalo prodire u čvrstu maticu uzorka difuzijom, a analit se otapa dok ne postigne ravnotežnu koncentraciju. Otapalo s analitom zatim difundira na površinu matice te se prirodnom ili prisilnom konvekcijom vraća u otopinu. Ova metoda razlikuje se od konvencionalnih po tome što do ekstrakcije dolazi zbog promjena u strukturi matice uzorka koje su uzrokovane mikrovalovima. Prednost metode je u kraćem vremenu trajanja (10-20 min), malom volumenu utrošenog otapala (10-30 mL) te mogućnosti istovremene ekstrakcije više uzoraka. Nedostatak je ograničenost otapalima budući da nemaju sva otapala mogućnost interakcije s mikrovalovima. Kao i prethodna ekstrakcija, koristi se za pripremu uzoraka različitih organskih zagađivala u uzorcima okoliša [5, 58].

- Tlačna ekstrakcija otapalom

Tlačna ekstrakcija otapalom (PSE)<sup>9</sup> uključuje korištenje otapala pri povišenim temperaturama (40-200°C) i tlakovima (3,3–20,3 MPa) što rezultira visokom učinkovitošću zbog poboljšanih karakteristika u smislu prijenosa mase i svojstava otapala. Primjenom visokih temperatura smanjuje se viskoznost otapala, poboljšava se difuzivnost otapala kroz maticu uzorka i posljedično se ubrzava kinetika ekstrakcije. Štoviše, visoki tlak tjera otapalo u pore matice što bi trebalo olakšati ekstrakciju ciljanih spojeva. Nedostatak metode nalazi se u potrebnim koracima pročišćavanja i uklanjanja otapala nakon ekstrakcije te smanjenoj selektivnosti [59].

---

<sup>7</sup> engl. *superheated water extraction*, SHWE

<sup>8</sup> engl. *microwave-assisted extraction*, MAE

<sup>9</sup> engl. *pressurized solvent extraction*, PSE

### 2.3.3. Ekstrakcija raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu

Ekstrakcija raspršenjem matrice uzorka kroz čvrstu fazu, MSPD<sup>10</sup> patentirani je proces kojeg su 1989. godine prvi put predstavili Barker i suradnici za ekstrakciju ostataka lijeka iz životinjskog tkiva. Od tada izaziva sve veći interes znanstvenika što se može vidjeti po brojnim istraživanjima na tu temu. Ukratko, u Barkerovom temeljnom radu, ekstrakcija je izvedena miješanjem goveđeg tkiva s odgovarajućom čvrstom fazom/sorbensom C18 da se dobije polusuhi, homogeni materijal. Zatim je dobiveni prah upakiran u kolonu iz koje su ciljani spojevi izolirani prikladnim otapalom za eluiranje [60, 61].

Interes za MSPD uvelike raste zbog nekoliko prednosti koje nudi, a njena jednostavnost i fleksibilnost pridonijele su većoj popularnosti u odnosu na klasične metode pripreme uzoraka. Za razliku od klasičnih ekstrakcijskih metoda koje zahtijevaju česte korake čišćenja, velike količine uzoraka, sorbensa i organskih otapala te su stoga skupe i dugotrajne, MSPD je brza, omogućava ekstrakciju i čišćenje u jednom koraku, koristi manje uzorka i otapala, lakša je za obradu i ekološki prihvatljivija. Dodatno čišćenje nakon ekstrakcije potrebno je samo u nekim slučajevima, ovisno o ciljanim analitima i instrumentaciji koja se koristi za njihovu detekciju [60, 62]. Zbog svega navedenog, MSPD ekstrakcija smatra se valjanom alternativom za Soxhlet i MAE, kao i za SFE i PLE. Nadalje, prednost ove metode nad drugima leži i u blagim uvjetima ekstrakcije (sobna temperatura i atmosferski tlak) koji osiguravaju prihvatljivo iskorištenje i selektivnost [60, 63, 64].

MSPD se primjenjuje u analizi velikog broja organskih tvari; egzogenih (lijekovi, zagađivala, pesticidi) i endogenih (komponente hrane i bakterija, itd.) iz čvrstih, polukrutih i viskoznih matica (životinjska tkiva, krv, mlijeko, bakterije, voće, povrće, itd.) uz neke modifikacije [60, 65].

---

<sup>10</sup> engl. *matrix solid-phase dispersion extraction*, MSPD

### 2.3.3.1. Princip

Postupak ekstrakcije raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu može se sažeti u nekoliko koraka:

1. uzorak se miješa s materijalom za dispergiranje u tarioniku s tučkom,
2. homogenizirani prah prenosi se u praznu kolonu koju predstavlja prazna cijev štrcaljke na čije je dno postavljena jedna fritra od polipropilena. Slijedi kompresija praha pomoću klipa štrcaljke te zatvaranje kolone drugom fritom.
3. eluiranje s prikladnim otapalom ili smjesom otapala uz pomoć vakuum pumpe. Što se tiče eluiranja, postoje dvije mogućnosti:
  - ciljani analiti se zadržavaju na koloni, a interferirajući spojevi se eluiraju u koraku ispiranja,
  - interferirajuće komponente matice uzorka selektivno se zadržavaju na koloni, dok se ciljani analiti izravno eluiraju [58, 60].

Eluati dobiveni u MSPD-u mogu se izravno analizirati na instrumentu budući da su adekvatno "čisti" za injektiranje. Međutim, u nekim slučajevima potrebni su dodatni koraci za uklanjanje komponenti matice uzorka koji koeluiraju. To može uključivati klasičnu ekstrakciju čvrstom fazom korištenjem materijala druge čvrste faze, ko-kolone ili tehnike zasebne kolone. Na primjer, vezana faza ili drugi potporni materijali različitog karaktera mogu biti pakirani na dnu MSPD stupca (ko-stupac) [66].

Miješanjem uzorka s čvrstom fazom dolazi do abrazije samog uzorka, narušava se njegova struktura pri čemu se uzorak raspršuje po površini čvrste faze stvarajući, kroz hidrofilne i hidrofobne interakcije različitih komponenti, jedinstvenu fazu miješanog karaktera koja olakšava proces ekstrakcije analita. Miješani karakter može se dokazati snimanjem na skenirajućem elektronskom mikroskopu (SEM) i upravo to je učinjeno u literaturnom radu [66]. SEM mikrografija jasno pokazuje poremećenu strukturu analiziranog uzorka te njegovu ravnomjernu raspodjelu po površini sorbensa koja nalikuje micelama ili membranskim dvoslojima [66, 68].

### 2.3.3.2. Optimiranje metode

Niz je parametara koji mogu utjecati na djelotvornost ekstrakcije, tj. izdvajanje analita iz strukture čvrste faze, a to su: priroda čvrste faze, priroda i volumen otapala za eluiranje, omjer mase uzorka i čvrste faze, dimenzije i materijal MSPD kolone [63, 69–71].

- Priroda čvrste faze/sorbensa

Općenito, sorbensi u ovom kontekstu mogu se svrstati u 3 kategorije: sorbensi reverzne faze (npr. C18 i C8), sorbensi normalne faze (npr. florisil i silikagel) te inertni sorbensi (dijatomejska zemlja). Ovi materijali mogu se koristiti i u razne druge svrhe, ali svoju primjenu našli su upravo u ekstrakciji organskih zagađivala iz okoliša vjerojatno zato što u dovoljnoj mjeri narušavaju strukturu matice što omogućava migraciju organskog spoja na površinu sorbensa [60].

Osim prirode važno je naglasiti i veličinu čestica sorbensa budući da vrlo male veličine čestica (3-10  $\mu\text{m}$ ) dovode do produljenog vremena eluiranja otapala i potrebe za prekomjernim vakuumom za postizanje odgovarajućeg protoka [66].

- Omjer mase uzorka i čvrste faze

Ovaj omjer ovisi o primjeni i mora se ispitati kao glavna varijabla tijekom razvoja metode [66]. U literaturi se najčešće spominje postupak u kojem je 0,5 g uzorka dispergirano s čvrstom fazom u omjerima u rasponu od 1:1 do 1:4, uz neke iznimke. Iako se najčešće susreće omjer 1:4, on se ipak mora optimizirati ovisno o složenosti fizikalno-kemijskih značajki uzorka [60].

- Vrsta otapala

Priroda otapala izrazito je važna budući da bi se ciljani analiti trebali učinkovito desorbirati dok bi većina preostalih komponenti matice uzorka trebala biti zadržana na koloni. U literaturi su dostupni podaci o ispitanim kombinacijama različitih sorbensa i otapala, od alkana preko toluena, diklormetana i alkohola do vode na povišenim temperaturama. Za lijekove i spojeve koji se pojavljuju u prirodi koriste se polarna otapala kao što su: diklormetan, aceton, cikloheksan, acetonitril te različite kombinacije otapala. Općenito, priroda preferirane kombinacije sorbens/otapalo određena je prvenstveno polarnošću ciljanih analita i prirodom matice uzorka. Drugim riječima, kod ovog parametra važno je proučiti jačinu interakcije analit-matica budući da su one jače u čvrstim uzorcima, a osim toga postoje i veće interferencije nego u tekućim uzorcima. Snažne interakcije između analita i matice čvrstih uzoraka rezultiraju

većim poteškoćama u pronalasku odgovarajućeg otapala za koje analit mora imati veći afinitet u odnosu na maticu [60, 62].

- Volumen otapala

Volumen potrebnog otapala razlikuje se za svaku primjenu i treba ga ispitati kako bi se smanjila njegova upotreba i nenamjerno koeluiranje potencijalnih interferencija [66].

#### 2.3.4. Metode kemijske analize

Budući da su koncentracije organskih zagađivala koje su prisutne u tlu relativno niske, nužna je upotreba osjetljivijih i selektivnijih metoda kao bi se one mogle detektirati, a kromatografija je upravo jedna od njih. Naime, kromatografija je fizikalno-kemijska separacijska metoda u kojoj se ispitivana tvar, tj. analit raspodjeljuje između dviju faza; pokretne i nepokretne, odnosno nalazi se u dinamičkoj ravnoteži između njih. Prema sastavu pokretne faze dijeli se na: plinsku, tekućinsku i fluidnu kromatografiju, pri čemu se u praksi, nakon MSPD pripreve, najčešće koriste plinska i tekućinska [58,70]. Tekućinska kromatografija (LC<sup>11</sup>) je metoda u kojoj se odvajanje analita zasniva na razdjeljivanju između dvije faze sustava, pokretne i nepokretne, pri čemu je pokretna faza tekućina i ona putuje kroz nepokretnu fazu u koloni pomoću pumpe. Plinska kromatografija (GC<sup>12</sup>) je metoda koja svoj mehanizam zasniva na razlikama u hlapljivosti i polarnosti komponenata. Koristi se za analizu plinova i lako hlapljivih tvari budući da je jedan od uvjeta za ovu metodu mogućnost prevođenja uzorka u plinovito stanje. U ovom slučaju pokretna je faza plin, a nepokretna faza je tekućina ili kruta tvar [5].

Za određivanje PAU-a koriste se i plinska i tekućinska kromatografija, pri čemu GC ima veću moć razlučivanja, a LC veću selektivnost. Iz tog razloga se GC češće koristi u analizi složenih smjesa, a LC prilikom razdvajanja izomera. Međutim, GC pokazuje visoku djelotvornost kapilarnih kolona i za određivanje velikog broja PAU-a i za razdvajanje pojedinih kritičnih parova i izomera PAU-a, stoga se češće koristi i spominje u literaturi. Za detekciju se koristi uglavnom spektrometar masa (MS), odnosno kvadripolni analizator masa kojeg karakterizira visoka osjetljivost i selektivnost. Za analizu polikloriranih bifenila i organoklorovih pesticida, također, najučinkovitija metoda je plinska kromatografija budući da omogućuje postizanje nižih

---

<sup>11</sup> engl. *liquid chromatography*, LC

<sup>12</sup> engl. *gas chromatography*, GC

granica detekcije i bolje razdvajanje što je posebno važno u slučaju pojedinih PCB kongenera čije je potpuno razdvajanje u koloni i dalje nedostižno te je predmet raznih istraživanja. U ovom slučaju se često u svrhu detekcije, uz spektrometar masa, koristi detektor zahvata elektrona, ECD<sup>13</sup> koji osigurava granice detekcije na razini ng/L. Iz tog razloga je GC-ECD metoda najpouzdanija za kvantitativnu analizu, dok GC-MS za kvalitativnu, posebice u izrazito kontaminiranim uzorcima [73, 74].

---

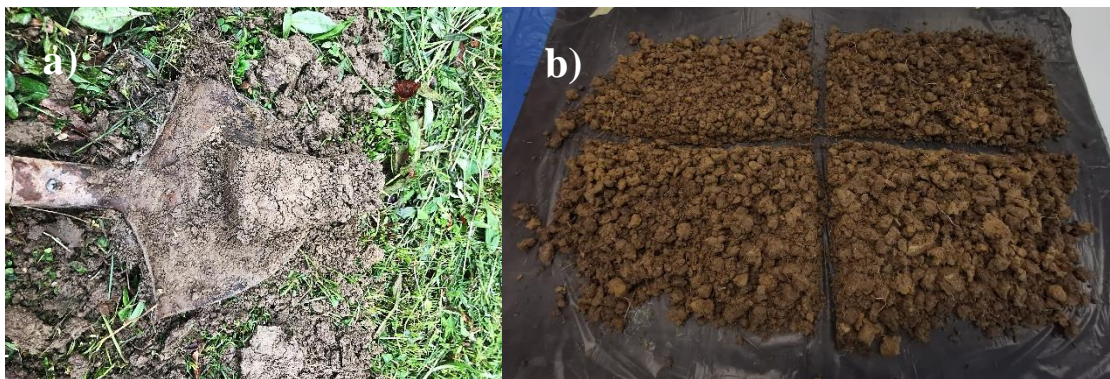
<sup>13</sup> engl. *electron capture detector*, ECD

### *3. EKSPERIMENTALNI DIO*



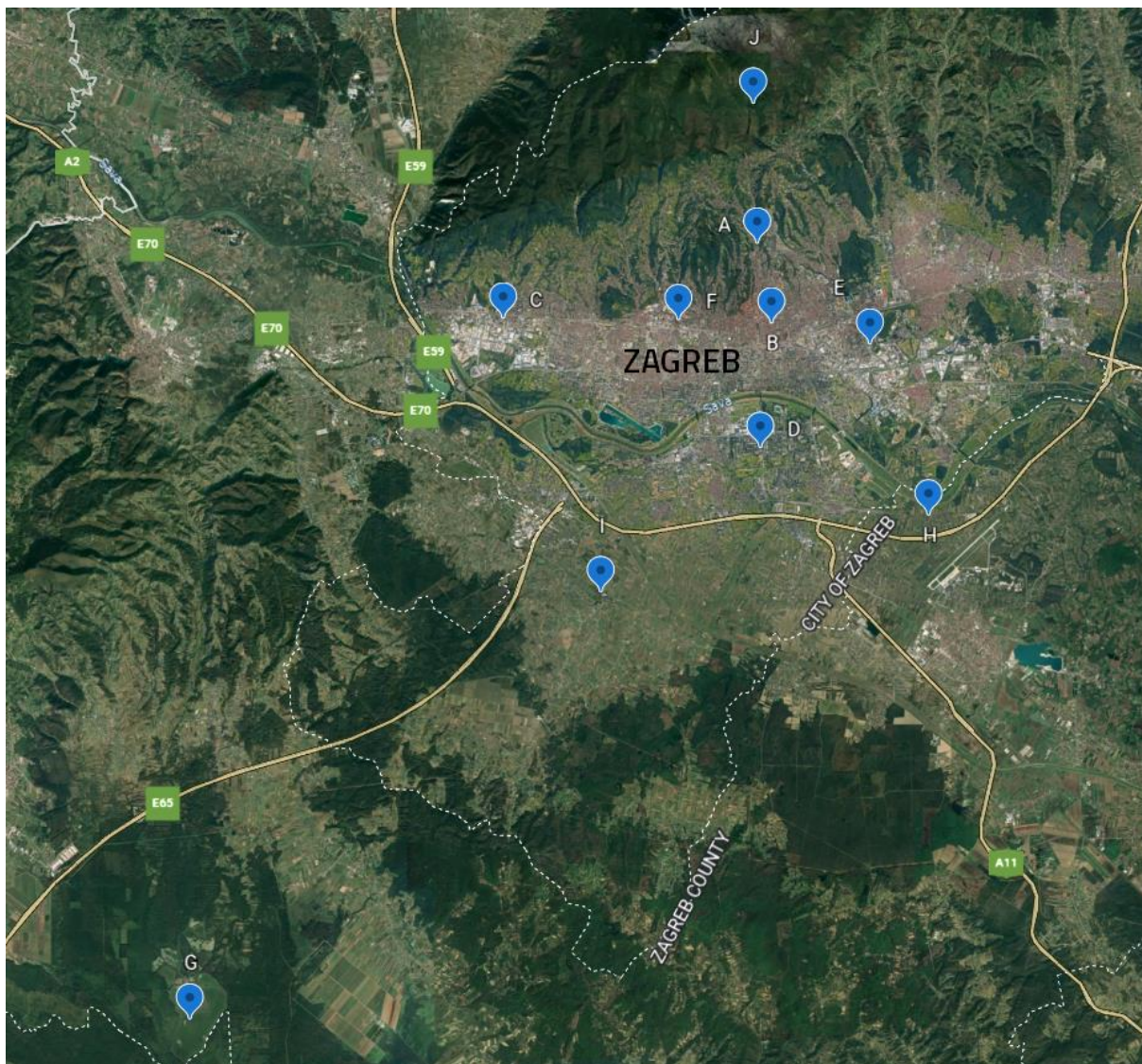
### 3.1. Uzorkovanje i priprava uzoraka tla za analizu

Uzorkovanje uzoraka urbanih tala provedeno je u ožujku 2022. godine, a uzorkovalo se štihačom na dubini od 20 cm pri čemu se nožem odsijecao pokrovni dio te dio tla širine 3-5 cm sa svake strane štihače tako da uzorak čini samo dio tla sa sredine štihače (Slika 2a). Prosječni uzorak tla sastojao se od dobro izmiješanih pojedinačnih uzoraka tla koji su se uzeli ravnomjerno s 5 nasumično odabranih točaka. Ukoliko je, miješanjem pojedinačnih uzoraka tala, dobiven prevelik prosječni uzorak, potrebno ga je bilo smanjiti četvrtanjem pri čemu se dvije nasuprotne četvrtine odbacuju, a preostale dvije ponovno dobro izmiješaju. Postupak se ponavlja dok se masa uzorka ne smanji na težinu od 0,5-1 kg koja je dovoljna za potrebne kemijske analize u analitičkom laboratoriju (Slika 2b).



*Slika 2. Uzorkovanje tla štihačom (a) i smanjivanje prosječnog uzorka tla četvrtanjem (b)*

Za optimiranje parametara metode ekstrakcije raspršenjem uzorka tla kroz čvrstu fazu i validaciju iste korišteno je kontrolno tlo iz Gospića budući da ono sadrži nisku koncentraciju ciljanih analita. Optimirana i validirana metoda primjenjena je na 10 realnih uzoraka urbanih tala različitog karaktera uzorkovanih na području županije Grad Zagreb, Zagrebačke te Karlovačke županije prikazane na Slici 3.



*Slika 3. Lokacije uzorkovanja tla*

Nakon uzorkovanja, uzorci tla dopremljeni su u analitički laboratorij te su sušeni na sobnoj temperaturi. Prosijani su kroz sito veličine pora 2 mm u staklenke u kojima su čuvani na sobnoj temperaturi tijekom provođenja eksperimenta do analize. Također, u realnim uzorcima tla određen je i udio vlage. Na Slici 4. prikazani su svi pripremljeni realni uzorci tla za analizu.



*Slika 4. Realni uzorci tla pripremljeni za MSPD*

## 3.2. Materijali

### 3.2.1. Kemikalije

Sve kemikalije (otapala i sorbensi) korištene tijekom provedbe eksperimenta prikazane su u Tablici 6.

*Tablica 6. Popis kemikalija korištenih tijekom provedbe eksperimenta*

<b>Naziv kemikalije</b>	<b>Čistoća</b>	<b>Proizvođač</b>
n-heksan	GC grade	Merck, Njemačka
Toluen	za analizu	Supelco, Njemačka
Aceton	za analizu	Supelco, Njemačka
Cikloheksan	LC grade	Merck, Njemačka
Diklormetan (DKM)	LC grade	Supelco, Njemačka
Florisil	PR grade	Supelco, Njemačka
C18	HPLC grade	Agilent Technologies, SAD
Silikagel	high-purity grade	Sigma-Aldrich, SAD
Dijatomejska zemlja (DZ)	/	Sigma-Aldrich, SAD



Za ekstrakciju PAU-a u ovom istraživanju korišteni su florisil, dijatomejska zemlja, C18 i silikagel. Silikagel je klasični sintetski sorbens s nanoporoznom strukturom izrađen od silicijevog dioksida, dok je C18, također, silicijev materijal, ali s vezanom alkilnom skupinom. Korišteni su za čišćenje uzoraka i predkoncentriranje PAU-a nakon Soxhlet ekstrakcije, ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima [73]. Florisil, čija je kemijska formula  $MgO_3Si$ , pokazao se dobrim za ekstrakciju PCB-a i OCP-a. [67,68] Dijatomejska zemlja, kao jedini interni sorbens od navedenih, ali, također, na bazi silicijeva dioksida, najčešće se spominje kao sorbens za OCP-e te pesticide [74].

### 3.2.2. Certificirane referentne otopine i standardi PAU-a, PCB-a i OCP-a

Certificirana referentna smjesa deuteriranih PAU-a (čistoća spojeva: acenaften D10 (acenaften-d10) 97,93 %, acenaften D8 (acenaften-d8) 98,6 %, antracen D10 (Ant-d10) 98,6 %, benzo(a)antracen D12 (BaA-d12) 97,7 %, benzo(b)fluoranten D12 (BbF-d12) 99,9 %, benzo(k)fluoranten D12 (BkF-d12) 99,9 %, benzo(g,h,i)perilen D12 (BghiP-d12) 99,1 %, benzo(a)piren D12 (BaP-d12) 98,9 %, krizen D12 (Kri-d12) 97,70 %, dibenzo(a,h)antracen D14 (DahA-d14) 99,7 %, fluoranten D10 (Flu-d10) 99,5 %, fluoren D10 (Fl-d10) 92,2 %, indeno(1,2,3-c,d)piren D12 (IP-d12) 97,6 %, naftalen D8 (Naf-d8) 99,7 %, fenantren D10 (Fen-d10) 99,9 % i piren D10 (Pir-d10) 98,9 %) proizvođača CPA chem, Bugarska predstavlja surogat standard koji se dodaje na samom početku MSPD ekstrakcije kako bi se vrednovao analitički postupak.

Certificirana otopina perilena D12 (Per-d12) proizvođača Supelco, SAD (čistoća 99,9 %) korištena je kao unutarnji standard u analizi PAU-a gdje je primjenjena metoda unutarnjeg standarda u kojoj se signal analita mjeri zajedno sa signalom unutarnjeg standarda, a koncentracija unutarnjeg standarda u svim uzorcima je ista i poznata.

U ovome radu za pripravu standardnih i radnih otopina korištene su sljedeće smjese:

- Certificirana referentna smjesa PAU-a (čistoća spojeva: acenaften 99,3 %, acenaften 99,2 %, antracen 99,0 %, benzo(a)antracen 98,5 %, benzo(b)fluoranten 97,3 %, benzo(k)fluoranten 99,5 %, benzo(g,h,i)perilen 99,4 %, benzo(a)piren 95,0 %, krizen 97,4 %, dibenzo(a,h)antracen 99,0 %, fluoranten 99,5 %, fluoren 98,2 %, indeno(1,2,3-c,d)piren 99,7 %, naftalen 99,3 %, fenantren 97,6 % i piren 98,9 %) proizvođača Supelco, SAD.

- Certificirana otopina benzo(e)pirena proizvođača Sigma-Aldrich, SAD (čistoća 99,7 %).
- Certificirana otopina benzo(j)fluorantena proizvođača Supelco, SAD (čistoća 99 %).
- Standardi organoklorovih pesticida (čistoća spojeva:  $\alpha$ -HCH 99,7 %,  $\beta$ -HCH 98,1 %,  $\gamma$ -HCH 99,8 %, p,p'-DDE 99,5 %, p,p'-DDD 99,2 %, p,p'-DDT 99,8 %,) proizvođača PESTANAL Riedel-de Haën, Seelze, Njemačka.
- Standardi pojedinačnih kongenera PCB-a (čistoća spojeva: PCB-28 99,9 %, PCB-60 99 %, PCB-77 99,7 %, PCB-105 98,9 %, PCB-114 99,8 %, PCB-118 99,8 %, PCB-123 99,84 %, PCB-126 99,1 %, PCB-138 99,6 %, PCB-153 99,9 %, PCB-156 99,2 %, PCB-157 99,5 %, PCB-167 99,2 %, PCB-170 99,7 %, PCB-189 99,4 % (svi LGC Promochem, Wesel, Njemačka), PCB-52 99,8 %, PCB-180 99 % (svi Riedel-de Haën, Seelze, Njemačka), PCB-74 97 %, PCB-101 98,3 %, PCB-169 99,7 %) proizvođača ULTRA Scientific, North Kingstown, RI, SAD.

### 3.2.3. Pribor

Popis pribora potrebnog za provođenje MSPD prikazan je u Tablici 7.

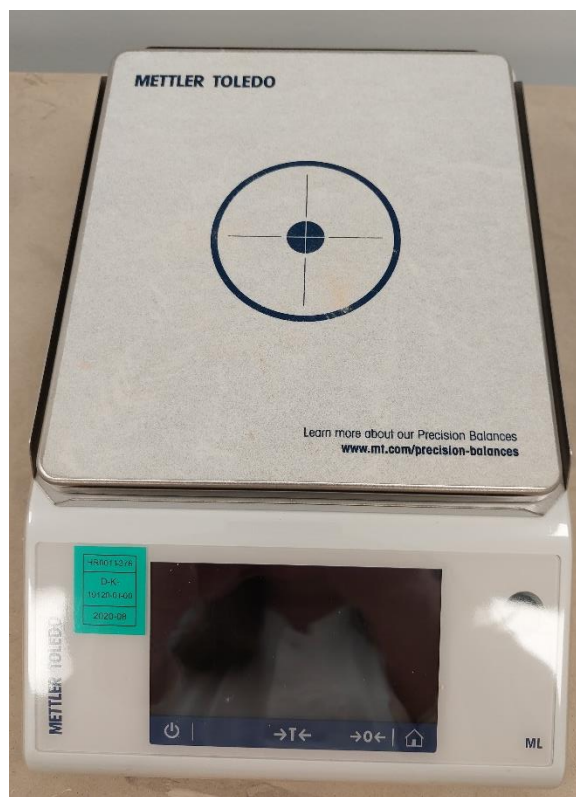
*Tablica 7. Popis pribora za provedbu MSPD*

<b>Pribor</b>	<b>Proizvođač</b>
Prazne kolone od polipropilena volumena 12, 20 i 60 mL	Phenomenex, SAD
Frite od polietilena (20 $\mu$ m)	Phenomenex, SAD
Adapter za SPE kolonu	Agilent, SAD
Staklena vuna	Merck, Njemačka

### 3.3. Instrumenti

#### 3.3.1. Analitička vaga

Za precizno određivanje mase uzorka tla i sorbensa tijekom izrade ovog eksperimenta korištena je analitička vaga Metler Toledo, Švicarska, model ML1602T/MOO. Maksimalan kapacitet vage je 1620 g, a mogućnost očitavanja iznosi 0,01 g. Vaga je prikazana na Slici 5.

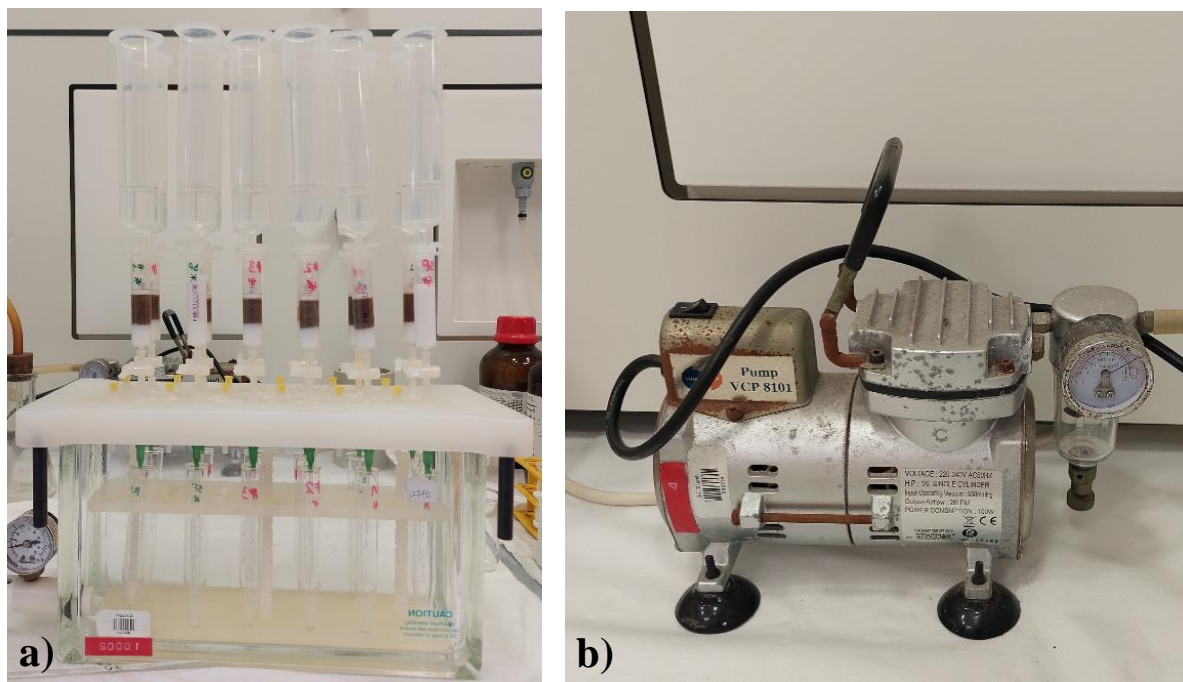


*Slika 5. Analitička vaga Metler Toledo*

#### 3.3.2. Sustav za ekstrakciju kroz čvrstu fazu pod vakuumom

Sustav za ekstrakciju kroz čvrstu fazu pod vakuumom sastoji se od staklene posude s poklopcem proizvođača Supelco na koju se mogu postaviti kolonice ispunjene sorbansom i matriksom te Harmony pumpe, model Pump VCP 8101, kojom se postiže vakuum. Na poklopcu

su smješteni ventili s navojem koji osiguravaju preciznu kontrolu protoka kroz svaku kolonu, dok vakuum ventil s navojem omogućava bolju kontrolu vakuuma. Staklena posuda s poklopcem je prikazana na Slici 6a, a pumpa na Slici 6b.



*Slika 6. Supelco uređaj za ekstrakciju uzorka kroz čvrstu fazu (a) i Harmony vakuum pumpa (b)*

### 3.3.3. Uparivač u struji dušika

Za uparavanje otapala i koncentriranje ekstrakta korišten je uparivač u struji dušika Organomation Associates, USA, model N-EVAP™M1. Uređaj se sastoji od dovoda dušika, vodene kupelji za održavanje podešene temperature te 12 položaja za uparavanje. Uparivač u struji dušika prikazan je na Slici 7.



*Slika 7. Uparivač u struji dušika Organomation Associates, USA*

### 3.3.4. Ultrazvučna kupelj

Korištena je ultrazvučna kupelj, Elmasonic, prikazana na Slici 8.



*Slika 8. Ultrazvučna kupelj Elma*



### 3.3.5. Plinski kromatografi

Za određivanje PAU-a u uzorcima tla korišten je plinski kromatograf (7890B, Agilent) vezan na trostruki kvadrupolni spektrometar masa (7000C, Agilent) s uređajem za automatsko dodavanje uzoraka (PAL RTC 120) – GC-MS/MS, a za određivanje PCB-a i OCP-a u uzorcima tla plinski kromatograf (7890B, Agilent) s dva detektora zahvata elektrona – GC- $\mu$ ECD. Uređaji su prikazani na Slici 9. i Slici 10.



*Slika 9. Plinski kromatograf (7890B, Agilent) s trostrukim kvadrupolnim spektrometrom masa (7000C, Agilent)*



*Slika 10. Plinski kromatograf (7890B, Agilent) s dvije kolone i dva detektora zahvata elektrona*

### 3.4. Metode rada

#### 3.4.1. Priprava standardnih i radnih otopina

- PAU

Izvorna standardna otopina smjese PAU-a pripravljena je pipetiranjem alikvota certificirane referentne smjese PAU-a (CRM48905) i pojedinačnih otopina BjF i BeP u odmjernu tikvicu od

100 mL i nadopunjavanjem heksanom ili acetonom do oznake prema potrebi. Izvorna standardna otopina surogata pripravljena je pipetiranjem alikvota certificirane referentne smjese deuteriranih PAU-a u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjavanjem heksanom ili acetonom do oznake prema potrebi. Izvorna standardna otopina unutarnjeg standarda pripravljena je pipetiranjem alikvota certificirane otopine Per-d12 u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjavanjem heksanom do oznake.

Radne otopine smjese PAU-a i surogata potrebne za optimizaciju postupka ekstrakcije i validacije metode pripremljene su razrijeđenjem izvornih standardnih otopina.

- PCB/OCP

Izvorne standardne otopine pojedinačnih OCP-a i kongenera PCB-a pripravljene su otapanjem točno odvaganih masa spojeva u *n*-heksanu. Standardne smjese OCP-a i kongenera PCB-a u *n*-heksanu ili acetonu pripravljene su iz izvornih otopina pojedinačnih spojeva. Prema potrebama analize standardne su smjese OCP-a i PCB-a razrjeđivane *n*-heksanom ili acetonom do odgovarajuće koncentracije. Za određivanje analitičkog iskorištenja, određeni volumen standardne smjese u acetonu dodavan je uzorcima tla.

### 3.4.2. Određivanje vlage u tlu gravimetrijskom metodom

Gravimetrijskom metodom odnosno vaganjem svježeg i suhog uzorka tla te računanjem postotnog udjela vlage određena je vlaga u realnim uzorcima tla. Prvo su se izvagale prazne poklopljene staklene posude za vaganje na analitičkoj vagi, a zatim se u njih dodalo 2 g tla i sušilo u sušioniku na 105 °C tijekom 6 sati. Nakon sušenja, poklopljena posuda s uzorkom ponovno se vagala te se iz razlike odvaga masa izračunao postotni udio vlage.

### 3.4.3. Postupak ekstrakcije raspršenjem tla kroz čvrstu fazu

Postupak je započeo vaganjem 0,5 g uzorka tla u malene staklene laboratorijske čaše na koji se dodalo 100 µL radne otopine smjese PAU-a masene koncentracije 100 ng/mL u acetonu, 100 µL radne otopine smjese PCB-a i OCP-a masene koncentracije 100 ng/mL u acetonu te 100 µL radne otopine surogata masene koncentracije 100 ng/mL u acetonu. Tako pripremljen

uzorak pokrio se celuloznim papirom i ostavio u digestoru da stoji u kontaktu sa standardima 1 sat, a nakon toga se u njega vagala određena količina sorbensa (florisil, C18, silikagel ili dijatomejska zemlja). Uzorak tla i sorbensa miješao se staklenim štapićem otprilike 3 minute nakon čega se prebacio u polietilensku kolonu u koju je prethodno na dno bila dodana staklena vuna ili polietilenska fritta te 1 g florisila koji je predstavljao sloj za dodatno pročišćavanje ekstrakta. Na vrh kolone dodala se polietilenska fritta te se sa 2 mL otapala isprala staklena laboratorijska čaša kako bi se kvantitativno prebacio cijeli uzorak u kolonu. Zatim se dodalo 18 mL otapala, uključila se vakuum pumpa i propustilo se otapalo kroz kolonu kako bi otapalo i smjesa sorbensa i tla bili 20 minuta u kontaktu prije same ekstrakcije. Nakon toga je slijedila ekstrakcija, pri čemu se ventilima s navojem regulirao protok otapala kroz kolonu koji je trebao biti kap po kap. Ekstrakt se sakupljao u kivetu nakon čega je slijedilo uparavanje istog u struji dušika pri temperaturi vodene kupelji do 35 °C do zadnje kapi te otapanje u 2 mL heksana pri čemu se 1 mL prebacio u vijalu za analizu PAU-a na GC-MS/MS-u, a preostalih 1 mL u vijalu za analizu PCB-a i OCP-a na GC- $\mu$ ECD-u. Prije same analize na GC-MS/MS-u u vijalu se dodalo 100  $\mu$ L izvorne standardne otopine unutarnjeg standarda.

Svaki se eksperiment radio u tri paralelne serije (tri uzorka kontrolnog tla koji sadrže dodane poznate koncentracije PAU-a, PCB-a, OCP-a i surogat standarda) uz prisutnost laboratorijske slijepa probe, tj. uzorka kontrolnog tla koji sadrži samo surogat standard.

U svrhu optimizacije MSPD metode s ciljem istovremenog određivanja PAU-a, PCB-a i OCP-a u realnim uzorcima urbanih tala proveden je niz eksperimenata u kojima je ispitana učinkovitost MSPD ekstrakcije smjese organskih zagađivala primjenom različitih sorbensa (florisil, C18, dijatomejska zemlja i silikagel), različitih omjera mase tla i sorbensa (1:2 i 1:4) te različitih smjesa organskih otapala (heksan, heksan:aceton=1:1, heksan:diklormetan=1:1, heksan:diklormetan=3:7, toluen:cikloheksan=7:3).

Nakon niza provedenih eksperimenata, odabrani su optimalni parametri MSPD ekstrakcije za sve tri ciljane grupe organskih spojeva i metoda je validirana te primjenjena na 10 realnih uzoraka sa Slike 2.

### 3.4.5. Određivanje učinkovitosti ekstrakcije raspršenjem tla kroz čvrstu fazu plinskim kromatografom

Standardne otopine ciljanih analita i ekstrakti dobiveni nizom eksperimenata analizirani su na dva uređaja: GC-MS/MS za određivanje PAU u uzorcima tla te GC- $\mu$ ECD za određivanje PCB-a i OCP-a u uzorcima tla.

Kao nepokretna faza za GC-MS/MS korištena je Agilent kolona, DB-EUPAH, dimenzija 20 m x 180  $\mu$ m x 0,14  $\mu$ m, dok su za GC- $\mu$ ECD korištene dvije kolone: SPB-5 (dimenzije: 30 m x 0,25 x 0,25  $\mu$ m) i 1701 (dimenzije: 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m).

U nastavku su prikazani radni uvjeti za oba uređaja.

- **Plinski kromatograf GC-MS/MS:**

Tablica 8. Uvjeti rada za GC-MS/MS

<b>Način injektiranja</b>	<i>Pulsed Splitless</i>	
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu$ L	
<b>Temperatura injektiranja</b>	450 $^{\circ}$ C	
<b>Protok helija kroz kolonu</b>	1,3 mL/min	
<b>Temperaturni profil pećnice</b>		
<b>Brzina, <math>^{\circ}</math>C/min</b>	<b>Temperatura, <math>^{\circ}</math>C</b>	<b>Vrijeme zadržavanja, min</b>
	58	2
25	150	0
5	200	0
8	270	0
2	280	0
1,5	290	1
<b>Vrsta izvora</b>	ionizacija elektronima <sup>14</sup>	
<b>Temperatura izvora</b>	340 $^{\circ}$ C	
<b>Temperatura kvadrupola</b>	180 $^{\circ}$ C	
<b>Temperatura međuspoja<sup>15</sup> plinskog kromatografa i spektrometra masa</b>	340 $^{\circ}$ C	
<b>Protok plina na MS-u</b>	N <sub>2</sub>	1,5 mL/min
	He	2,25 mL/min
<b>Vrijeme analize</b>	37,097 min	

Kvantitativna analiza izvršena je u MRM<sup>16</sup> modu kojem je moguće pratiti više različitih specifičnih reakcija istovremeno. Za svaki pojedini PAU određena su dva prijelaza pri čemu je onaj s najvećim odzivom prema detektoru odabran kao kvantitativni prijelaz, a drugi je korišten kao kvalitativni ili potvrdni. Najvažniji parametri za prikupljanje podataka u MRM modu prikazani su u Tablici 9.

<sup>14</sup> engl. *electron ionization*, EI

<sup>15</sup> engl. *transfer line*

<sup>16</sup> engl. *multiple reaction monitoring*, MRM

Tablica 9. Parametri odabranih komponenata PAU-a analiziranih na GC-MS/MS-u

Vrijeme segmenta, min	PAU	Ion prekursor	Ion produkt	Vrijeme praćenja iona <sup>17</sup> , ms	Energija sraza, eV
<b>4,50</b>	Naf-d8	136	134	5	40
		136	108	5	40
	Naf	128	127	5	40
		128	102	5	40
<b>7,50</b>	Acenafti-d8	160	156	5	40
		160	132	5	40
	Acenafti	128	150	5	45
		128	126	5	45
<b>8,03</b>	Acenafte-d10	164	162	5	30
		164	160	5	30
	Acenafte	154	153	5	25
		154	152	5	25
<b>8,80</b>	Fl-d10	176	174	5	30
		176	172	5	30
	Fl	166	165	5	30
		166	164	5	30
<b>11,00</b>	Ant-d10	188	184	5	40
		188	158	5	40
	Fen-d10	188	184	5	40
		188	158	5	40
	Ant	178	176	5	45
		178	151	5	45
	Fen	178	176	5	45
		178	151	5	45
<b>15,00</b>	Flu-d10	212	210	5	50
		212	208	5	50

<sup>17</sup> engl. dwell time

nastavak Tablice 9.

<b>Vrijeme segmenta, min</b>	<b>PAU</b>	<b>Ion prekursor</b>	<b>Ion produkt</b>	<b>Vrijeme praćenja iona, ms</b>	<b>Energija sraza, eV</b>
	Flu	202	201	5	42
		202	200	5	42
<b>18,20</b>	Pir-d10	212	210	5	50
		212	208	5	50
	Pir	202	201	5	42
		202	200	5	42
<b>21,00</b>	BaA-d12	240	236	5	45
		240	212	5	45
	Kri-d12	240	236	5	45
		240	212	5	45
	BaA	228	226	5	40
		228	202	5	40
	Kri	228	226	5	40
		228	202	5	40
<b>24,40</b>	BbF-d12	264	260	5	50
		264	232	5	50
	BkF-d12	264	260	5	50
		264	232	5	50
	BbF	252	250	5	50
		252	224	5	50
	BkF	252	250	5	50
		252	224	5	50
	BjF	252	250	5	50
		252	224	5	50
<b>27,90</b>	BaP-d12	264	260	5	50
		264	236	5	50



nastavak Tablice 9.

<b>Vrijeme segmenta, min</b>	<b>PAU</b>	<b>Ion prekursor</b>	<b>Ion produkt</b>	<b>Vrijeme praćenja iona, ms</b>	<b>Energija sraza, eV</b>
	BeP	252	250	5	50
		252	2224	5	50
	Bap	252	250	5	50
		252	224	5	50
<b>28,90</b>	Per-d12	264	260	5	50
		260	256	5	50
<b>32,00</b>	IP-d12	292	288	5	50
		288	286	5	50
	DahA-d14	292	288	5	50
	DahA	278	276	5	50
	DahA	278	276	5	50
	IP	276	274	5	52
	IP	274	272	5	52
<b>35,20</b>	BghiP-d12	288	286	5	55
		288	284	5	55
	BghiP	276	274	5	52
		274	272	5	52

- **Plinski kromatograf GC-ECD:**

Uzorci su injektirani na kolonu pri 90 °C; kolona je nakon jedne minute zagrijana do 210 °C brzinom od 30 °C/min; nakon jedne minute izotermno kolona je zagrijana do 240 °C brzinom od 1,5 °C/min; na konačnoj temperaturi kolona je ostala 15 minuta, i konačno kolona je zagrijana na 260 °C brzinom od 5 °C/min i na toj je temperaturi ostala jednu minutu.

Temperatura injektora: 270 °C, injektiranje bez cijepanja protoka plina nosioca (0,75 min)

Temperatura detektora: 300 °C

Plin nosilac: Helij

Protok plina nosioca: 1,2 mL/min

Protok na detektoru (N<sub>2</sub>): 30 mL/min

Volumen injektiranog uzorka: 1 µL

## *4. REZULTATI I RASPRAVA*

#### 4.1. Sadržaj vlage u uzorcima tla

Sadržaj vlage određen je prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.2. Rezultati, odnosno udio vlage u postocima, prikazani su u Tablici 10. Primjenom sušenja određen je raspon sadržaja vlage u realnim uzorcima tla te se kretao između 0,50 % i 7,50 %.

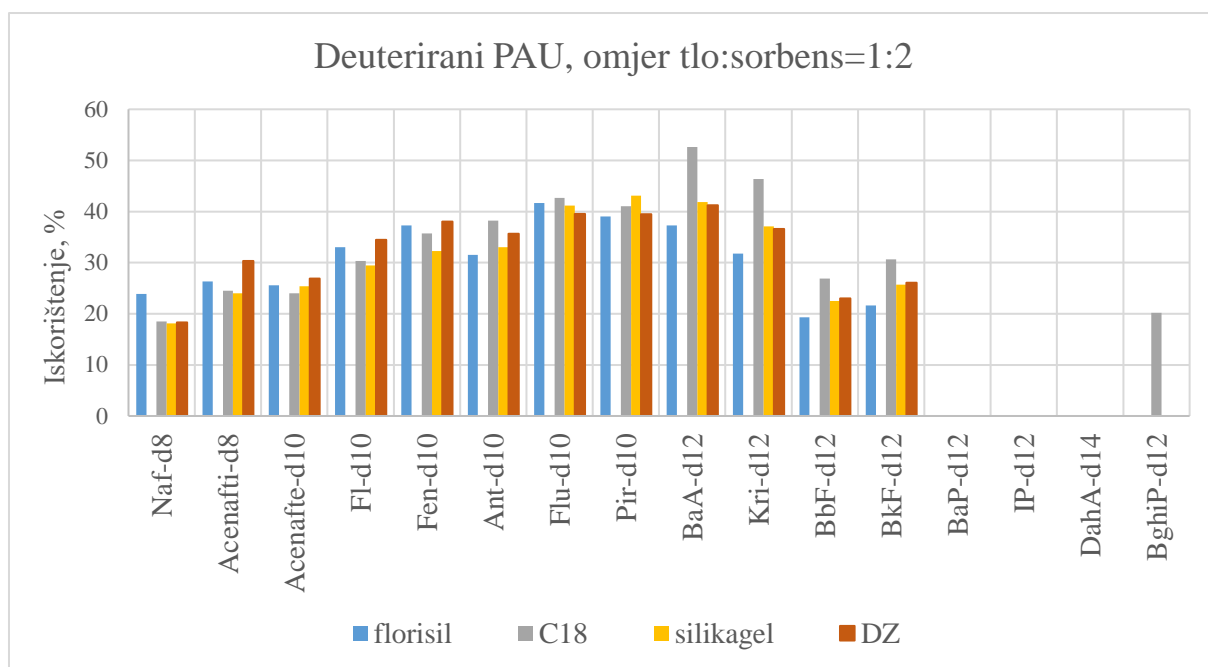
*Tablica 10. Udio vlage u tlima korištenim u eksperimentu izražen u postocima*

<b>Uzorak</b>	<b>Udio vlage, %</b>
<b>kontrolno tlo</b>	3,00
<b>A</b>	2,50
<b>B</b>	1,00
<b>C</b>	2,50
<b>D</b>	2,00
<b>E</b>	2,50
<b>F</b>	1,00
<b>G</b>	7,50
<b>H</b>	2,50
<b>I</b>	1,50
<b>J</b>	0,50

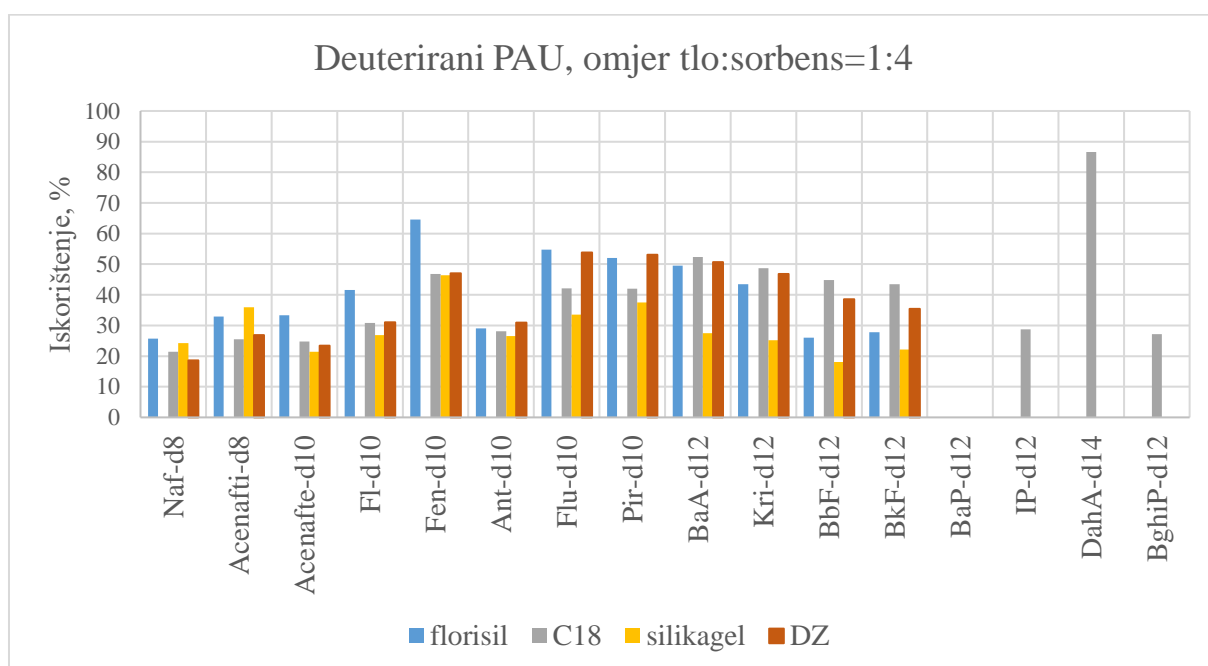
#### 4.2. Ekstrakcija PAU-a, PCB-a i OCP-a iz uzoraka tla raspršenjem tla kroz čvrstu fazu

Kao što je već spomenuto, priprava uzoraka najkritičniji je korak kemijske analize zbog složenosti matice, stoga je nužan detaljan odabir svih parametara kako bi se smanjio utjecaj iste te spriječio gubitak analita. U tu svrhu provedena je optimizacija MSPD tehnike za izdvajanje PAU-a, PCB-a i OCP-a iz uzoraka tla, što podrazumijeva 3 eksperimenta: odabir sorbensa, omjera tla i sorbensa te otapala za eluiranje. Budući da se metoda primjenjuje na jako velik broj spojeva različitih fizikalno-kemijskih svojstava, izrazito je teško pronaći uvjete koji podjednako odgovaraju svakom od njih. Iz tog razloga, odabrana metoda bit će ona koja najbolje odgovara za većinu ispitivanih spojeva.

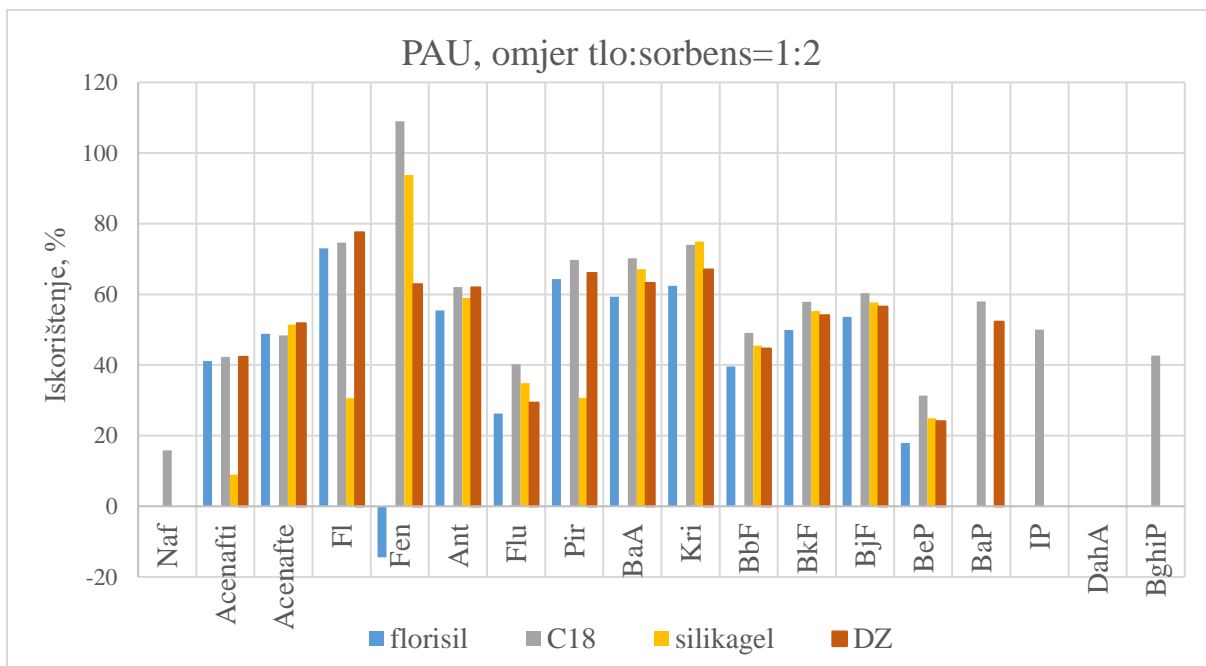
Na Slikama 11.-14. nalaze se dijagrami učinkovitosti ekstrakcije za PAU-e, PCB-e i OCP-e kada je korištena staklena vuna, heksan kao otapalo te 1 g florisila za dodatno pročišćavanje.



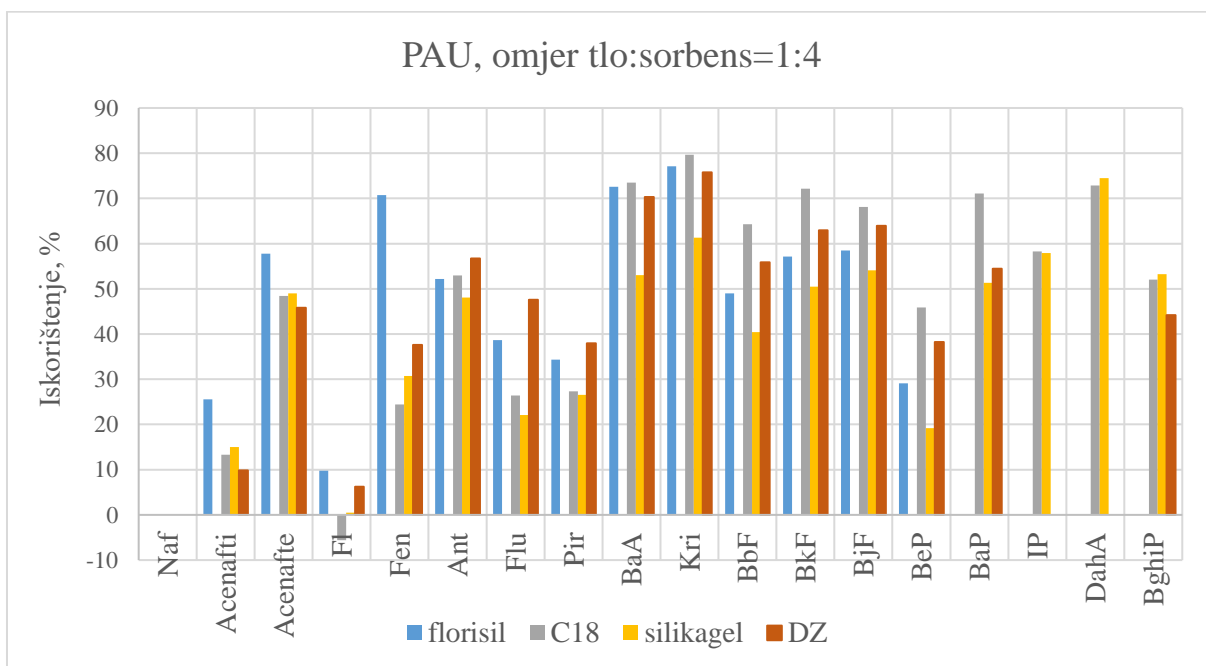
Slika 11. Utjecaj vrste sorbensa na učinkovitost ekstrakcije deuteriranih PAU-a kada je omjer tlo:sorbens=1:2



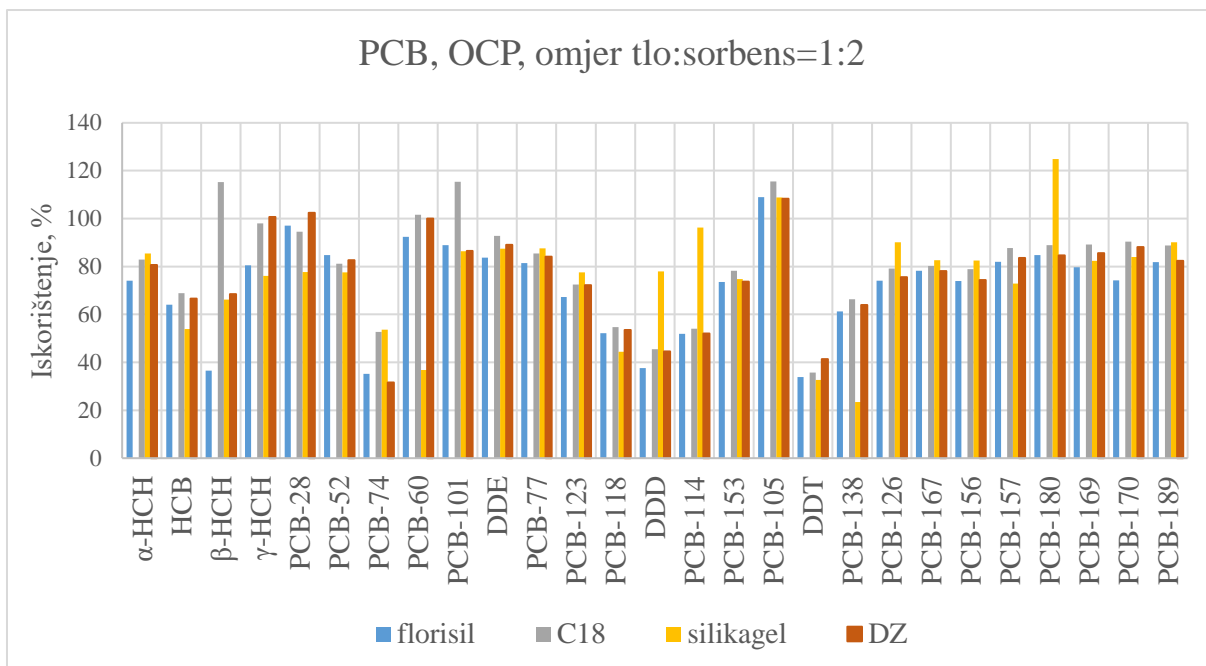
Slika 12. Utjecaj vrste sorbensa na učinkovitost ekstrakcije deuteriranih PAU-a kada je omjer tlo:sorbens=1:4



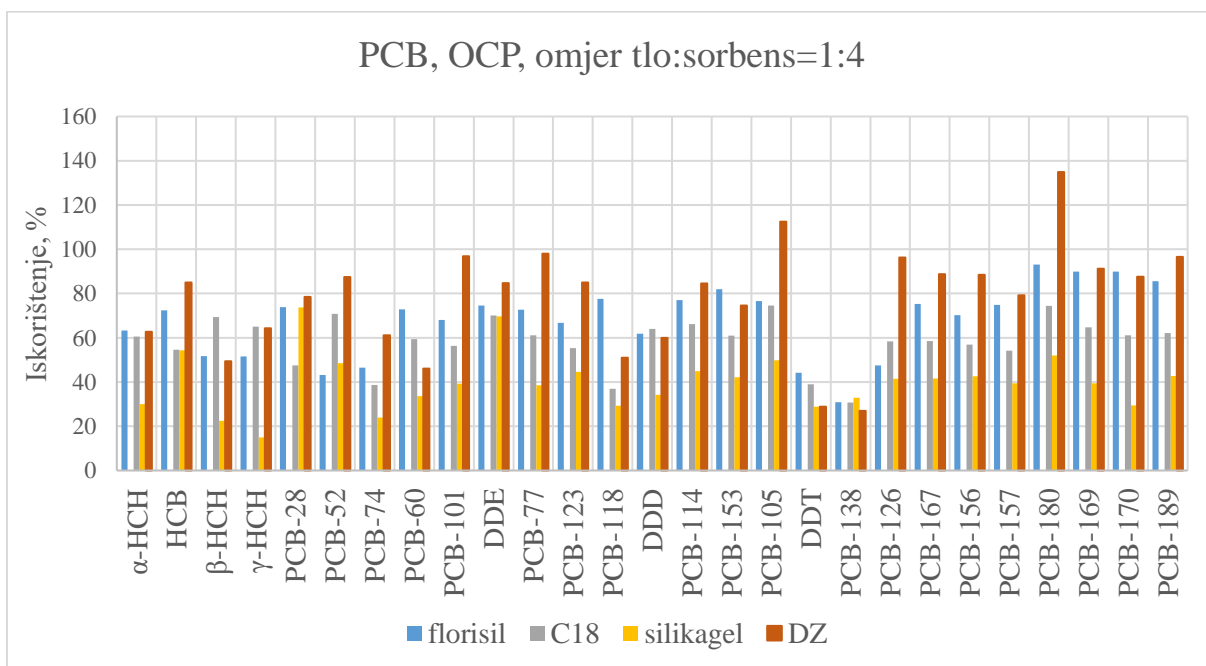
Slika 13. Utjecaj vrste sorbensa na učinkovitost ekstrakcije PAU-a kada je omjer tlo:sorbens=1:2



Slika 14. Utjecaj vrste sorbensa na učinkovitost ekstrakcije PAU-a kada je omjer tlo:sorbens=1:4



Slika 15. Utjecaj vrste sorbensa na učinkovitost ekstrakcije PCB-a i OCP-a kada je omjer tlo:sorbens=1:2



Slika 16. Utjecaj vrste sorbensa na učinkovitost ekstrakcije PCB-a i OCP-a kada je omjer tlo:sorbens=1:4

Na Slici 11. prikazana su iskorištenja deuteriranih PAU-a za omjer tla i sorbensa 1:2 koji ukazuju na učinkovitost same priprave uzorka. Iskorištenja se kreću u rasponu od 18 % (za Naf-d8) do 53 % (za BaA-d12). U slučaju omjera tla i sorbensa 1:4, što je prikazano na Slici 12., iskorištenja se kreću u rasponu od 18 % ( za BbF-d12) do 65 % (za Fen-d10).

Slika 13. ukazuje na raznoliku učinkovitost ekstrakcije ispitivanih spojeva prilikom korištenja različitih sorbensa kada je omjer tla i sorbensa bio 1:2. Florisil, C18 i dijatomejska zemlja pokazuju uglavnom slična iskorištenja za pojedini spoj, osim u slučaju Fen gdje se prilikom korištenja florisila pojavljuju čak i negativne vrijednosti. Osim što su za sorbens C18 ostvarena najviša iskorištenja, on se istovremeno pokazao kao jedini sorbens koji je učinkovit za iduće PAU-e: Naf, IP i BghiP. Silikagel je sorbens čija učinkovitost najviše oslicira ovisno o pojedinom spoju, iako za većinu spojeva pokazuje učinkovitost sličnu kao dijatomejska zemlja. Ipak, budući da za neke PAU-e (poput Acenafti, Fl, Pir) silikagel pokazuje znatno lošiju učinkovitost od dijatomejske zemlje, smatra se najlošijim sorbensom. Od svih ispitivanih komponenti, najviša iskorištenja dobivena su za PAU-e srednje molekulske mase, poput Fen, Ant, Pir, BaA i Kri, isključujući Flu.

Iz Slike 14. vidljivo je da florisil, C18 i dijatomejska zemlja ponovo pokazuju slična iskorištenja, pogotovo za PAU-e srednje molekulske mase. Silikagel u tom slučaju pokazuje najniža iskorištenja, ali je učinkovit za pojedine PAU-e niže (Acenafti, Ant) i više (BaP, IP, DahA i BghiP) molekulske mase. Unatoč tomu, smatra se najlošijim sorbensom jer za većinu PAU-a pokazuje najmanja iskorištenja u odnosu na ostale sorbense. Florisil se pokazao dobrim sorbensom za pojedine PAU-e niže molekulske mase (Acenafti, Fen), dok za one više (BaP, IP, DahA i BghiP) uopće ne odgovara.

Uspoređujući iskorištenja za parametar omjera tlo:sorbens na prethodnim dijagramima, vidljivo je kako su veća iskorištenja dobivena u slučaju omjera 1:4 uz određene iznimke kao što su Acenafti i Fl.

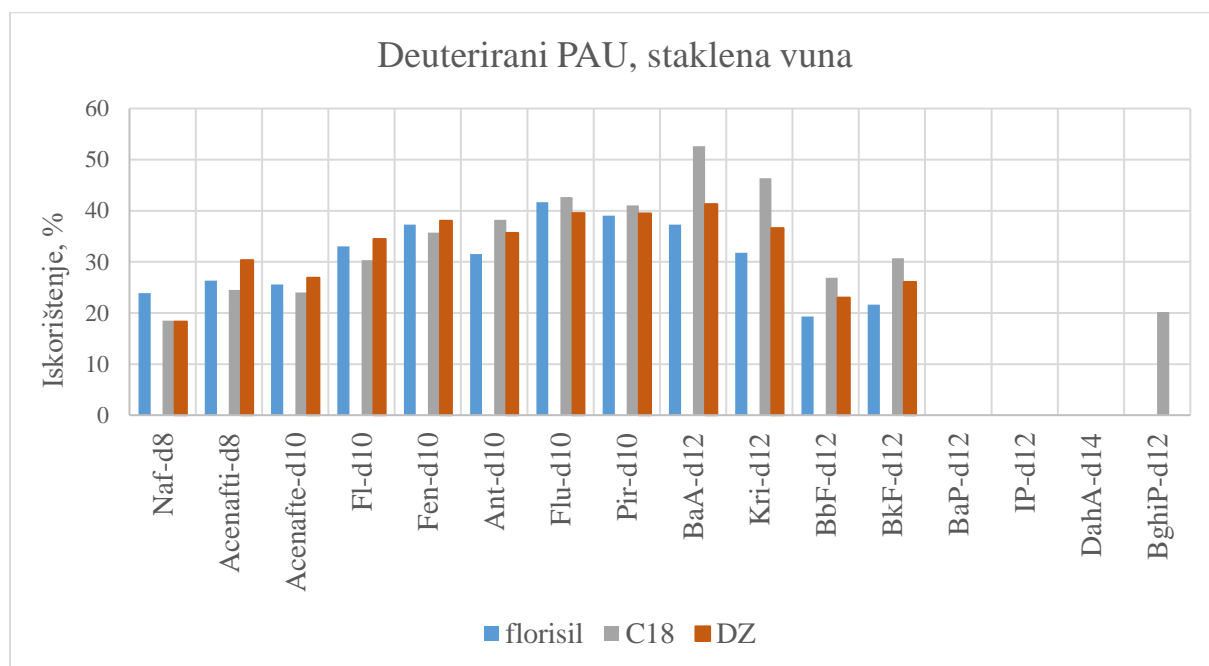
Što se tiče ekstrakcije PCB-a i OCP-a u kojoj je omjer tla i sorbensa 1:2, slična iskorištenja za pojedini spoj daju sva 4 sorbensa uz određene iznimke kada je u pitanju silikagel. On daje nešto bolja iskorištenja za DDD, PCB-114 i PCB-180, ali općenito daje lošija iskorištenja u odnosu na ostale sorbense pa se može smatrati najlošijim. U slučaju omjera tla i sorbensa 1:4, silikagel daje vidno najlošija iskorištenja, nakon čega slijedi C18 pa florisil. Najbolje rezultate za obje vrste spojeva pokazuje dijatomejska zemlja. Uspoređujući omjere tla i sorbensa, vidljivo je kako su za većinu spojeva dobivene veće vrijednosti (sve veće od 60 %, osim PCB-74 i DDT)



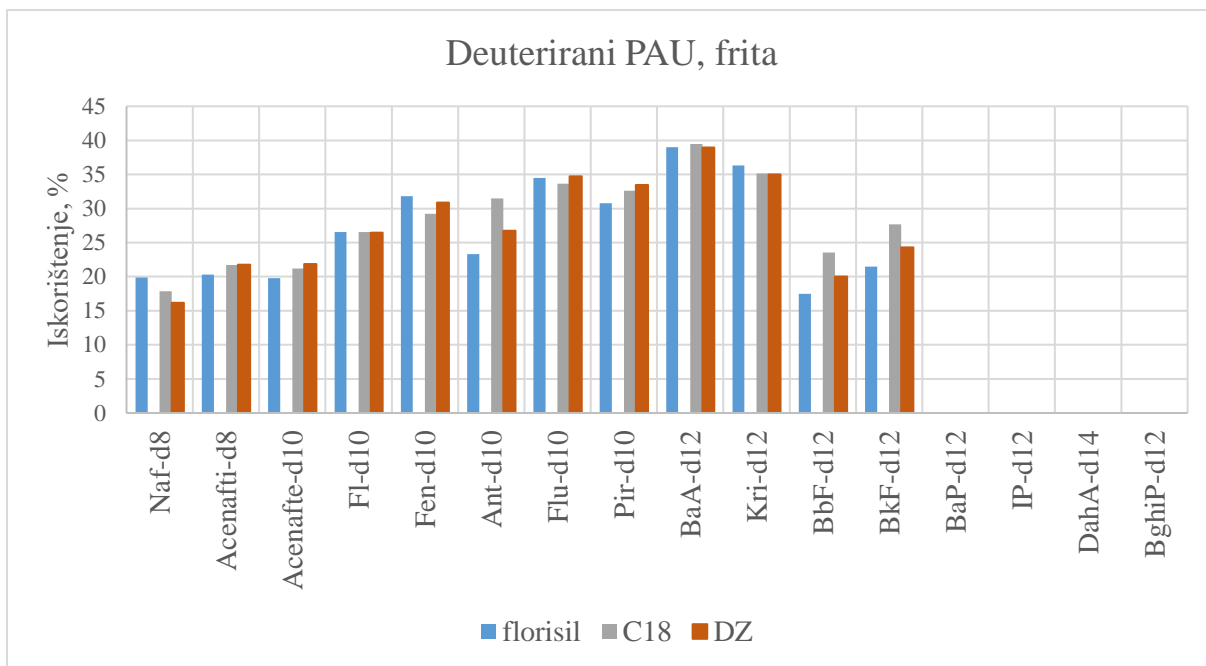
za sve sorbense u slučaju omjera tlo:sorbens=1:2 u odnosu na omjer tlo:sorbens=1:4. Razlika nije značajna, ali će biti korisna u odabiru ovog parametra.

Budući da je silikagel kao sorbens pokazao uglavnom najniža iskorištenja, isključen je iz daljnjih eksperimenata. Omjer tla i sorbensa koji se pokazao boljim i koji će kao takav biti konstantan u idućim eksperimentima je 1:2. Za PAU-e taj omjer ne pokazuje znatno bolja iskorištenja od omjera 1:4, štoviše za neke komponente je i lošiji. Međutim, odabran je zbog nešto boljih iskorištenja u slučaju ekstrakcije PCB-a i OCP-a te zbog ekonomskog aspekta koji, također, treba uzeti u obzir prilikom optimizacije metode.

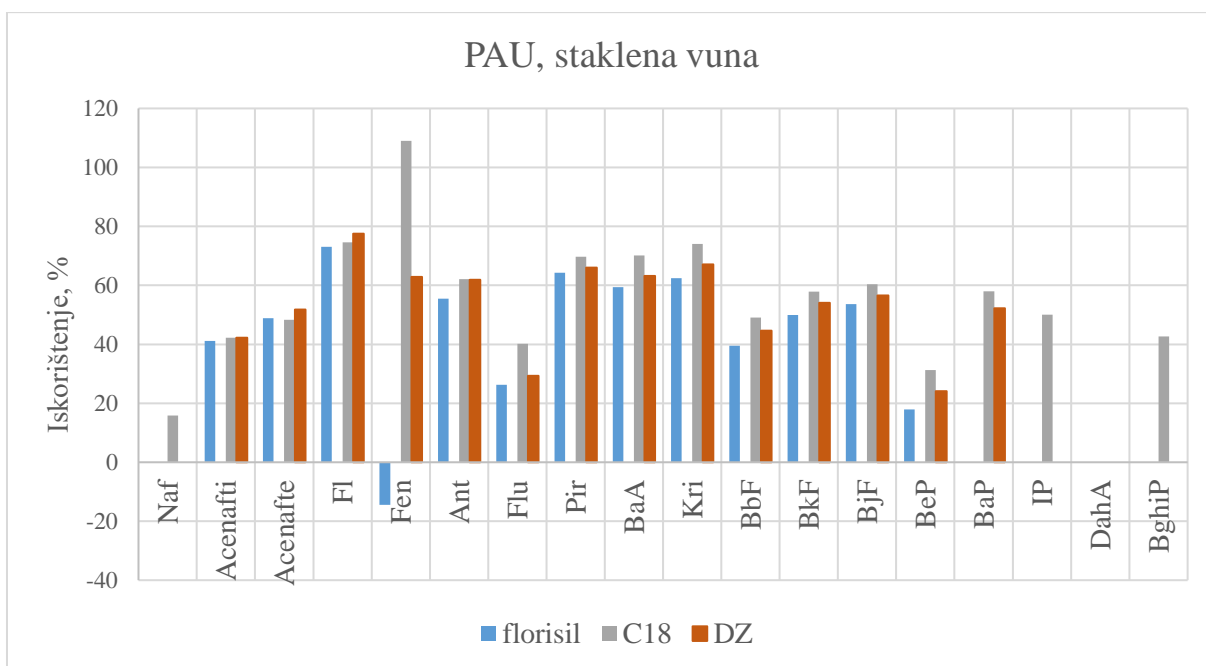
Ono što također treba sagledati s ekonomskog aspekta je izbor između staklene vune i frite. To su materijali koji se često spominju u literaturi i kao takvi su izabrani za eksperiment. Na Slikama 17.-22. prikazani su rezultati ekstrakcije deuteriranih PAU-a, PAU-a, PCB-a i OCP-a kada se koristi jedan i drugi materijal.



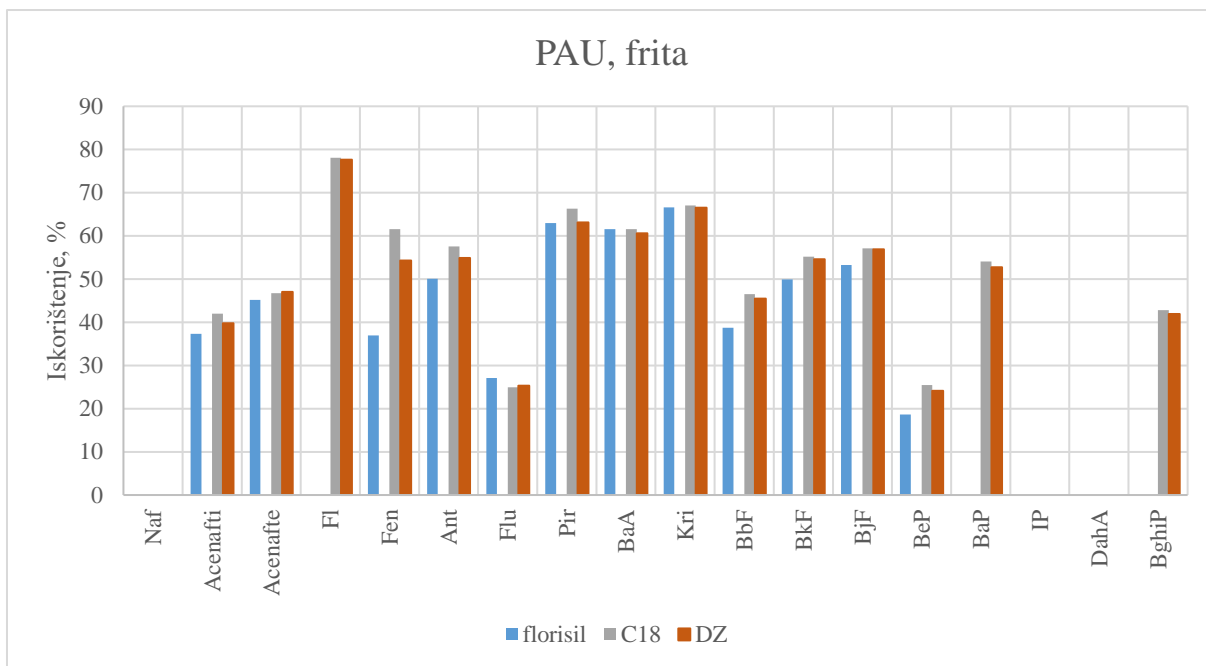
Slika 17. Učinkovitost ekstrakcije deuteriranih PAU-a prilikom korištenja staklene vune



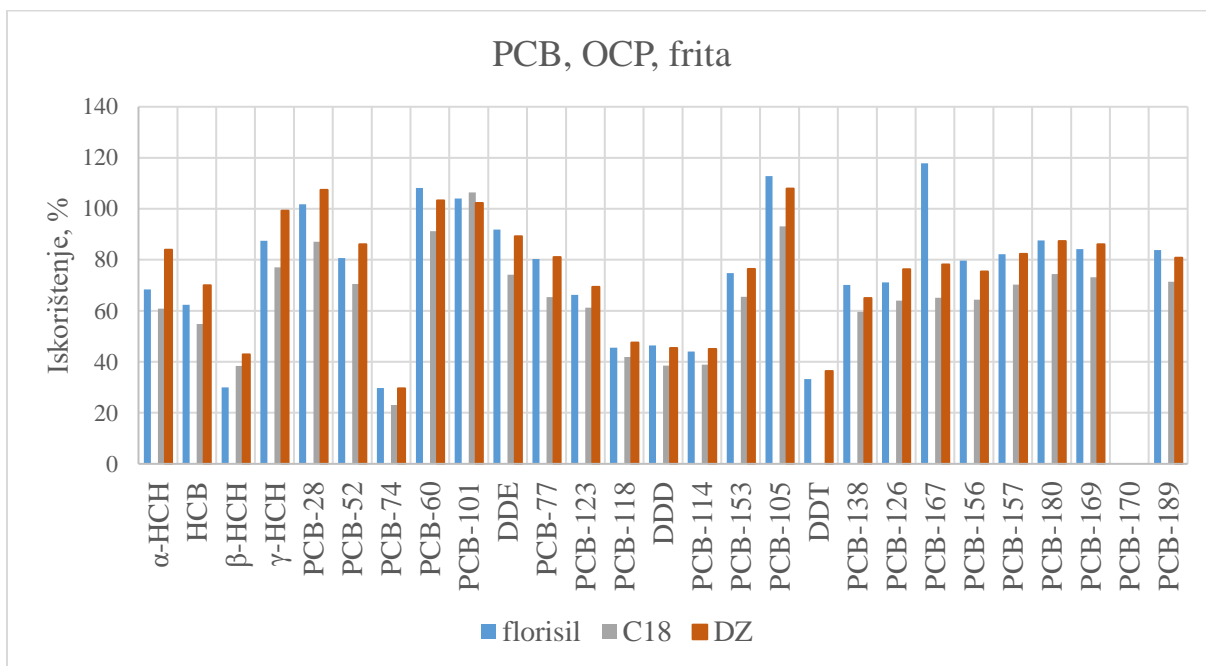
Slika 18. Učinkovitost ekstrakcije deuteriranih PAU-a prilikom korištenja fritre



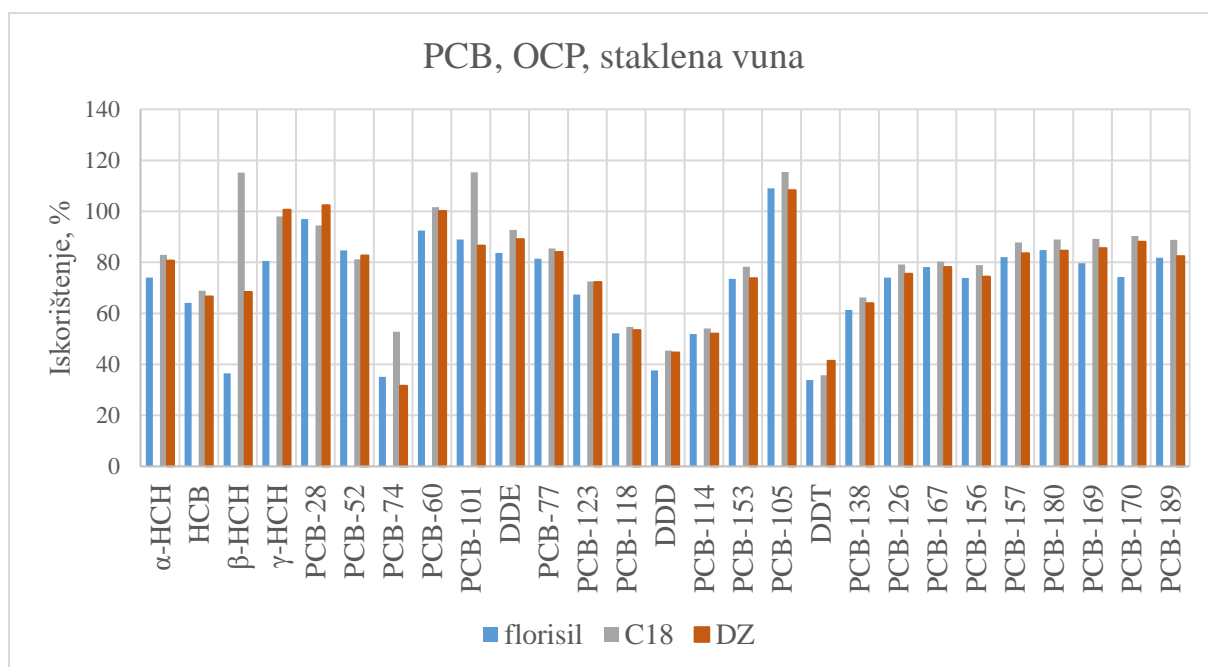
Slika 19. Učinkovitost ekstrakcije PAU-a prilikom korištenja staklene vune



Slika 20. Učinkovitost ekstrakcije PAU-a prilikom korištenja fritе



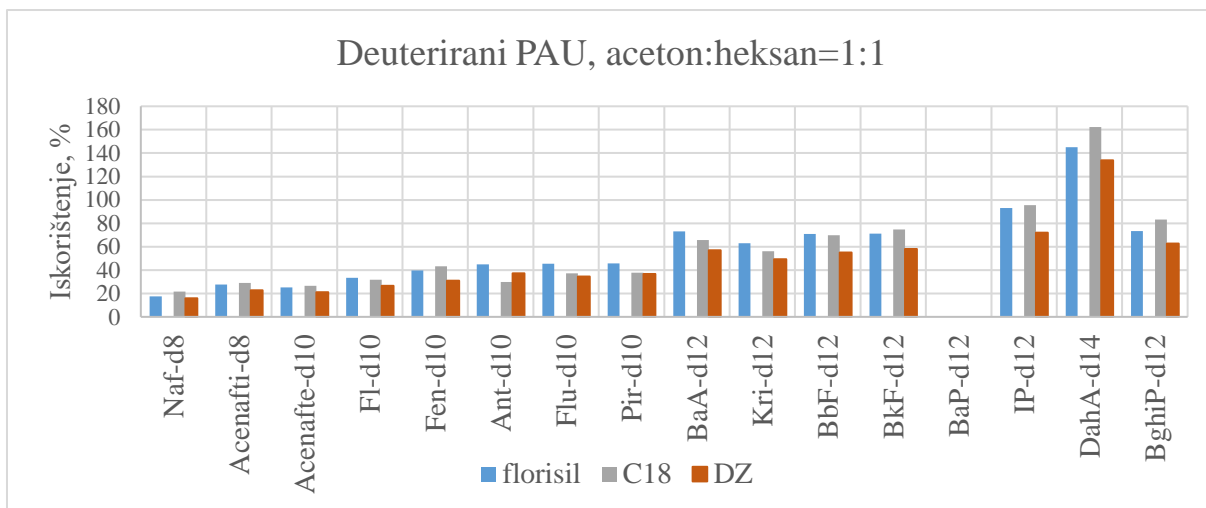
Slika 21. Učinkovitost ekstrakcije PCB-a i OCP-a prilikom korištenja fritе



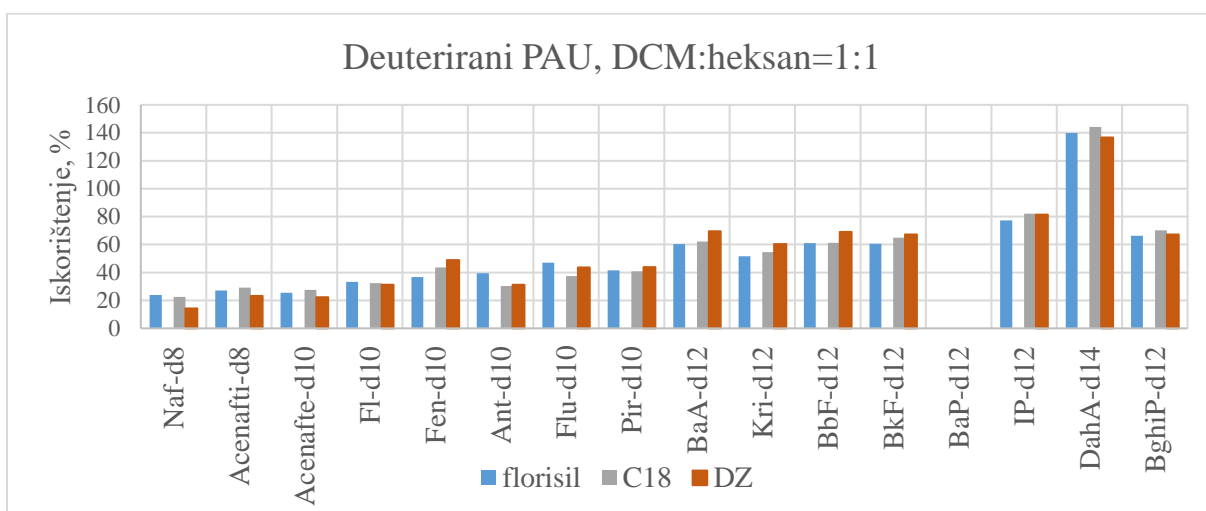
*Slika 22. Učinkovitost ekstrakcije PCB-a i OCP-a prilikom korištenja staklene vune*

Na Slikama 17. i 18. prikazana su iskorištenja deuteriranih PAU-a koja ukazuju na nešto veću učinkovitost staklene vune nego frite. Razlike u iskorištenjima nisu velike, ali idu u korist budući da je staklena vuna i ekonomski prihvatljivija. Isti trend dobiven je i za ekstrakciju PAU-a, PCB-a i OCP-a čiji su dijagrami iskorištenja prikazani na Slikama 19.-22. Za većinu spojeva staklena vuna pokazuje veća iskorištenja nego frita. Iz tog razloga se u idućim eksperimentima kao materijal za punjenje kolona koristila staklena vuna.

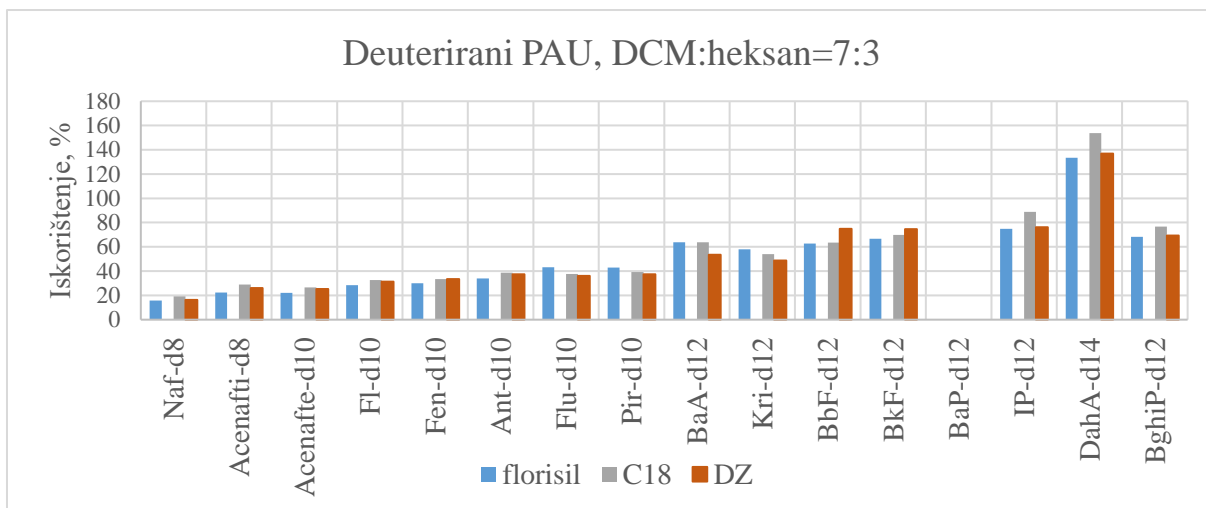
Cilj idućeg eksperimenta bio je odabrati najpogodnije otapalo za eluiranje. Pregled literature omogućio je odabir nekoliko vrsta otapala, tj. njihovih smjesa, a to su redom: heksan, aceton:heksan=1:1, DCM:heksan=1:1, DCM:heksan=7:3, toluen:cikloheksan=7:3. Na Slikama 23.-27. prikazani su rezultati provedenih ekstrakcija za deuterirane PAU-e kada je korištena staklena vuna te 1 g florisila za dodatno pročišćavanje.



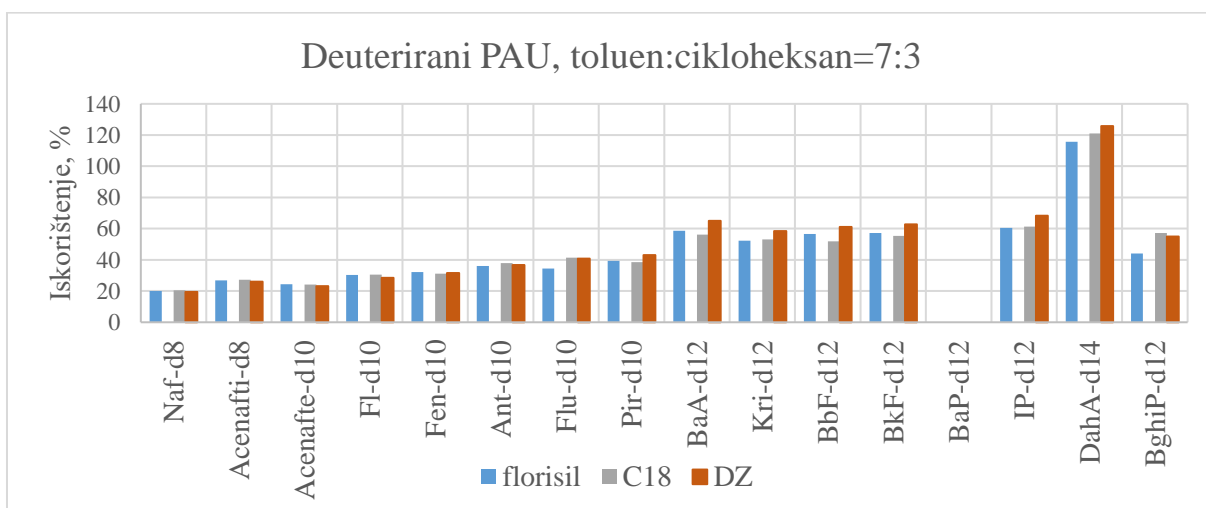
*Slika 23. Utjecaj vrste otapala na učinkovitost ekstrakcije deuteriranih PAU-a kada je kao otapalo korištena smjesa acetona i heksana u omjeru 1:1*



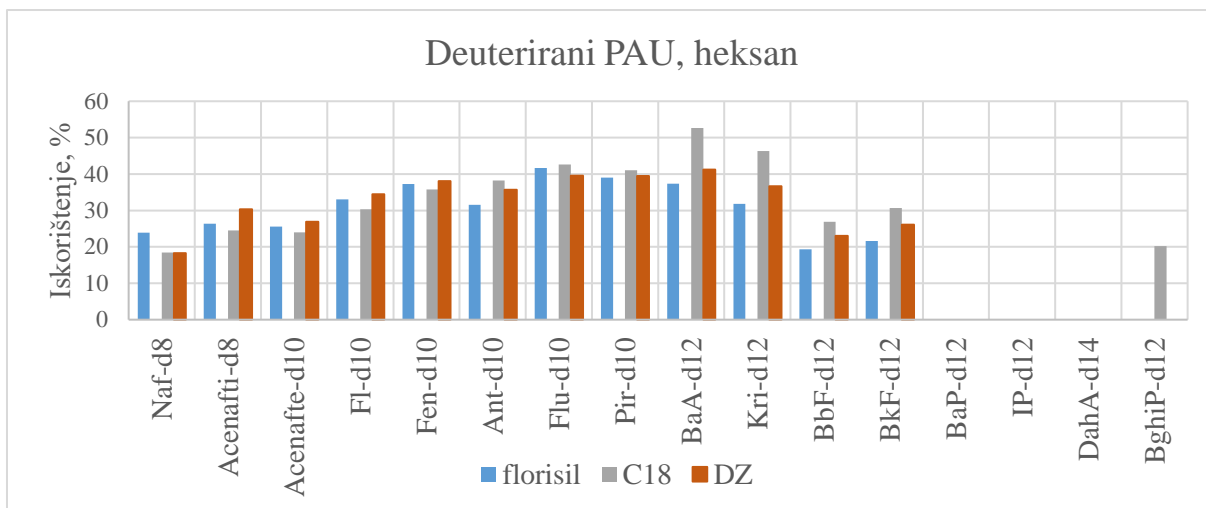
*Slika 24. Utjecaj vrste otapala na učinkovitost ekstrakcije deuteriranih PAU-a kada je kao otapalo korištena smjesa diklormetana i heksana u omjeru 1:1*



*Slika 25. Utjecaj vrste otapala na učinkovitost ekstrakcije deuteriranih PAU-a kada je kao otapalo korištena smjesa acetona i heksana u omjeru 7:3*

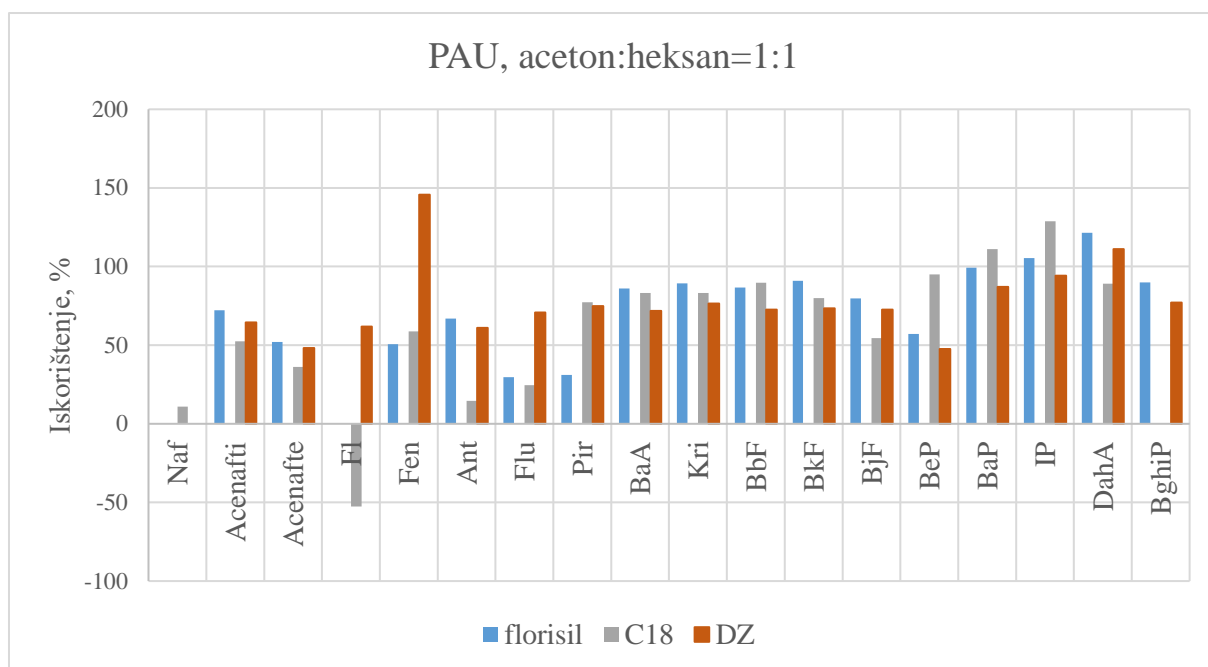


*Slika 26. Utjecaj vrste otapala na učinkovitost ekstrakcije deuteriranih PAU-a kada je kao otapalo korištena smjesa toluena i cikloheksana u omjeru 7:3*

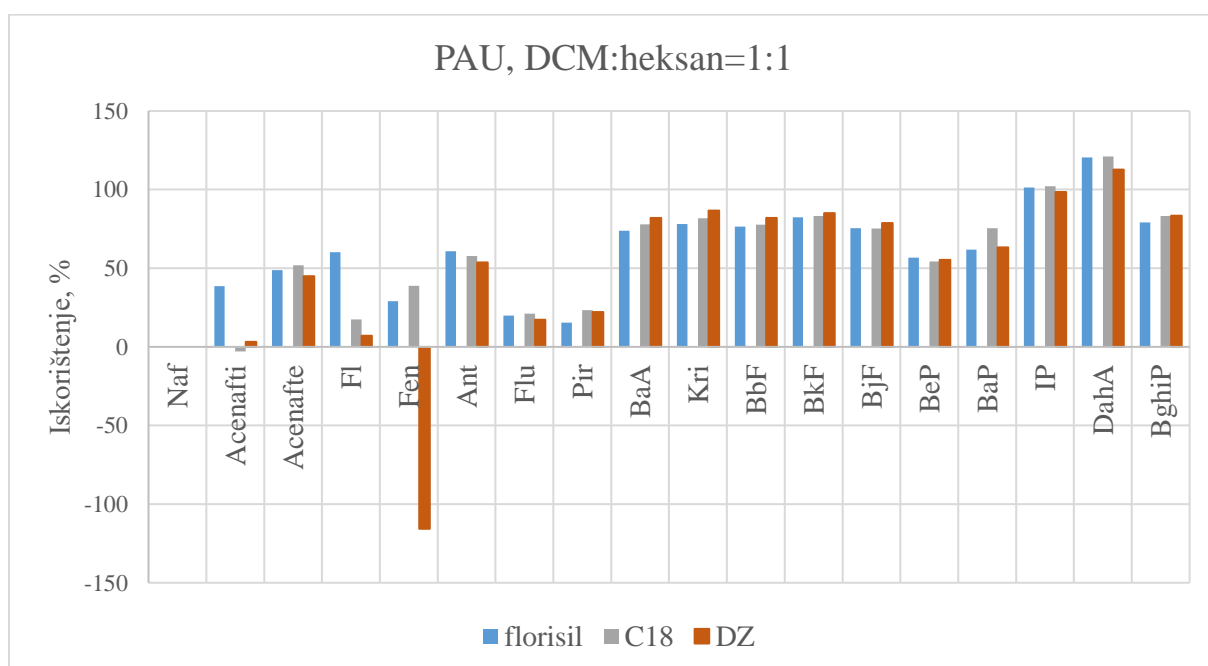


*Slika 27. Utjecaj vrste otapala na učinkovitost ekstrakcije deuteriranih PAU-a kada je kao otapalo korišten heksan*

Na prethodnim slikama prikazana je učinkovitost postupka pripreve za svako otapalo, tj. smjesu otapala. Na Slici 23. prikazana su iskorištenja za slučaj kada je kao otapalo korištena smjesa acetona u heksana u omjeru 1:1. Iz dijagrama je vidljivo kako iskorištenja rastu porastom molekulske mase PAU-a te su stoga najveća iskorištenja (60-80 %) dobivena za IP-d12 te BghiP-d12, a iznimku čini BaP-d12 koji se uopće nije ekstrahirao te DahA-d14 čije je iskorištenje preko 100 % što je posljedica utjecaja matice. Iskorištenja za PAU-e niže molekulske mase osciliraju oko 20 %, dok se za one srednje kreću u rasponu od 40 % (za Fl) do 60 % (za Ant). Takav trend podataka prisutan je i prilikom korištenja ostalih smjesa otapala što se može vidjeti na Slikama 24., 25. i 26. To se ne može reći za slučaj kada je kao otapalo korišten heksan budući da su tada dobivena slična iskorištenja za PAU-e niže i srednje molekulske mase, uz nešto veća iskorištenja za one srednje molekulske mase. PAU-i veće molekulske mase nisu se uspješno ekstrahirali heksanom. Na Slikama 28.-32. prikazani su rezultati provedenih ekstrakcija za PAU-e kada je korištena staklena vuna te 1 g florisila za dodatno pročišćavanje.

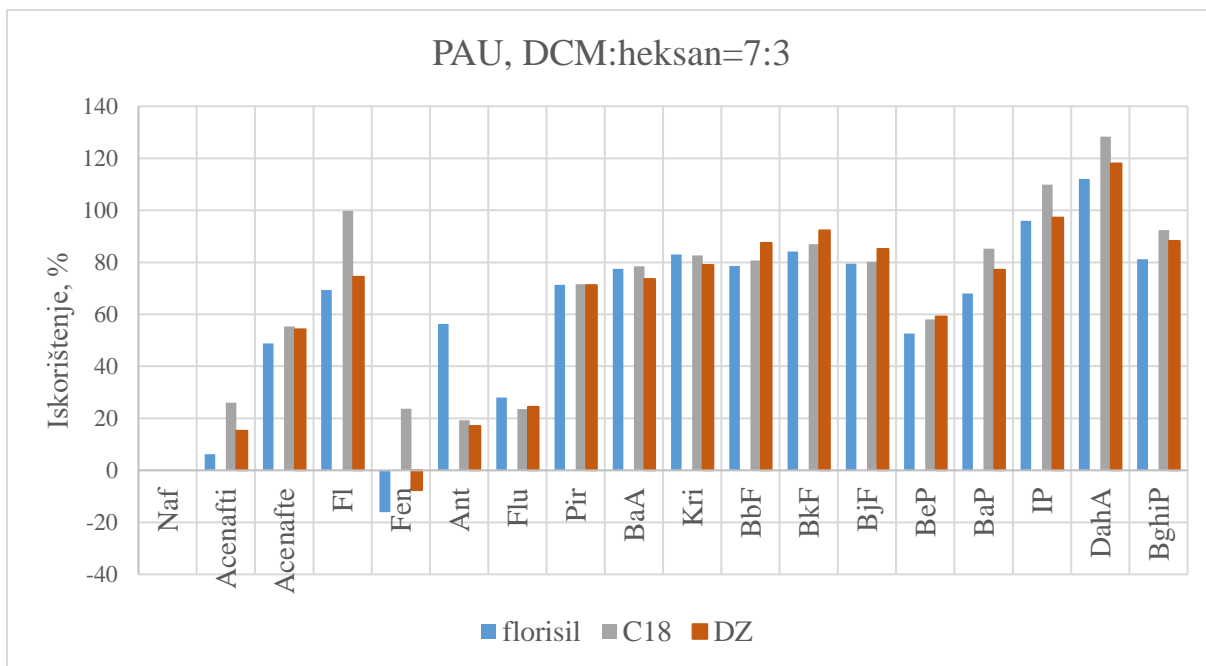


Slika 28. Utjecaj vrste otapala na učinkovitost ekstrakcije PAU-a kada je kao otapalo korištena smjesa acetona i heksana u omjeru 1:1

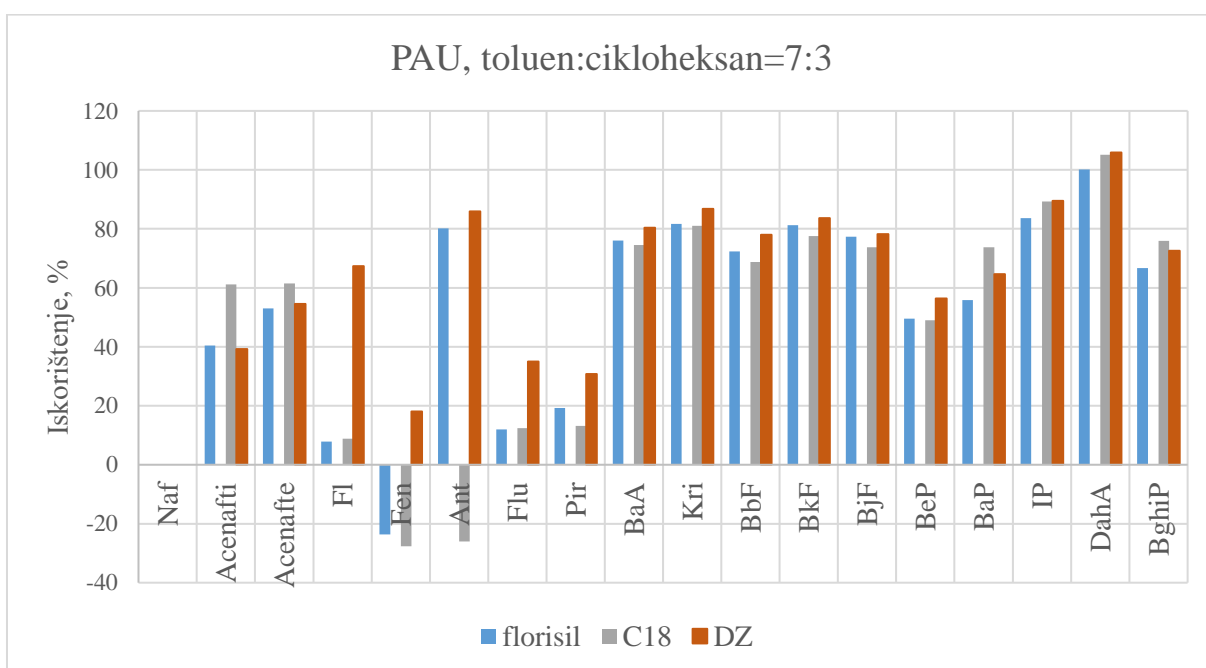


Slika 29. Utjecaj vrste otapala na učinkovitost ekstrakcije PAU-a kada je kao otapalo korištena smjesa diklormetana i heksana u omjeru 1:1

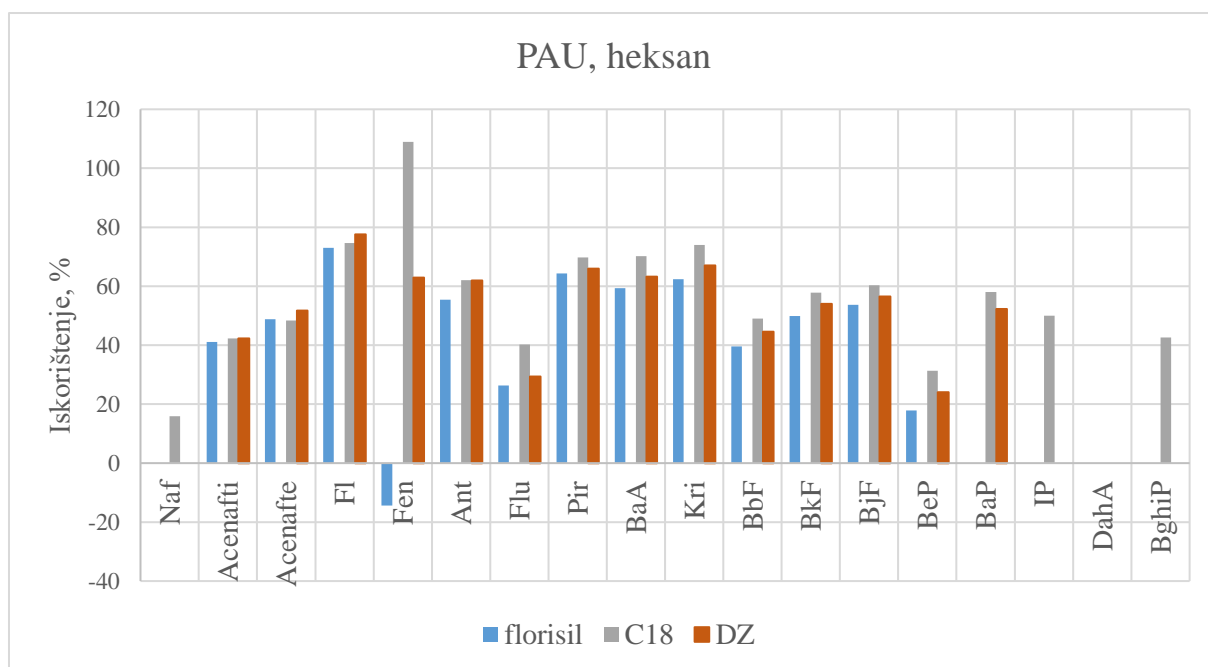




Slika 30. Utjecaj vrste otapala na učinkovitost ekstrakcije PAU-a kada je kao otapalo korištena smjesa diklormetana i heksana u omjeru 7:3

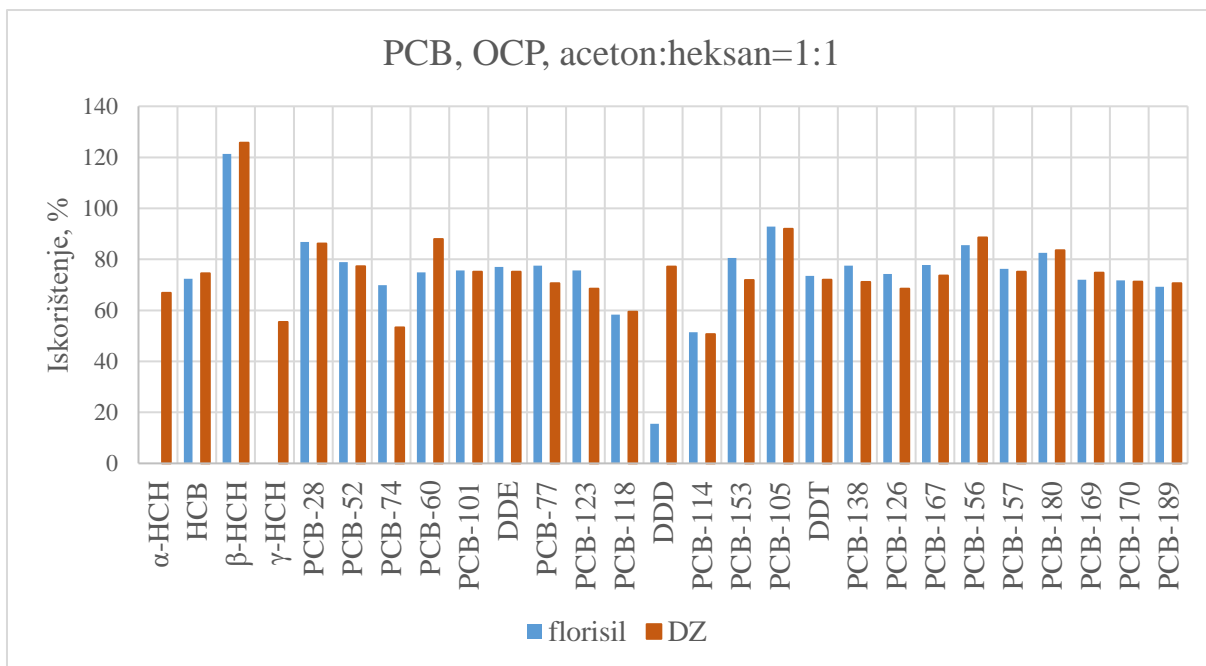


Slika 31. Utjecaj vrste otapala na učinkovitost ekstrakcije PAU-a kada je kao otapalo korištena smjesa toluena i cikloheksana u omjeru 7:3

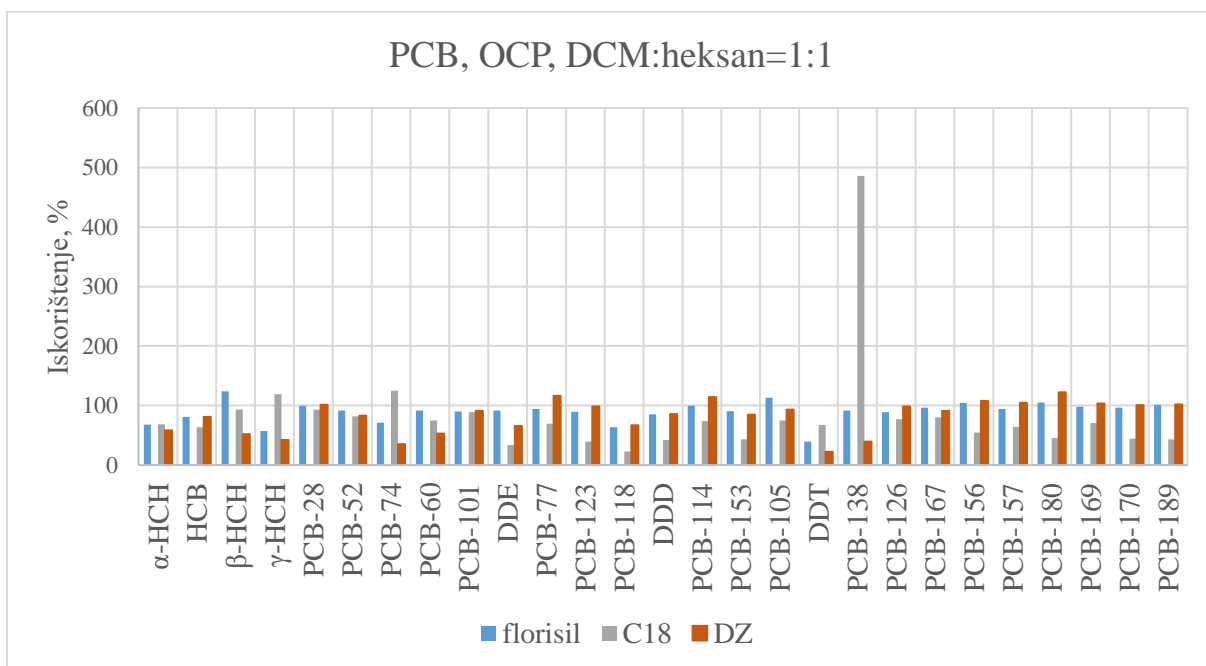


Slika 32. Utjecaj vrste otapala na učinkovitost ekstrakcije PAU-a kada je kao otapalo korišten heksan

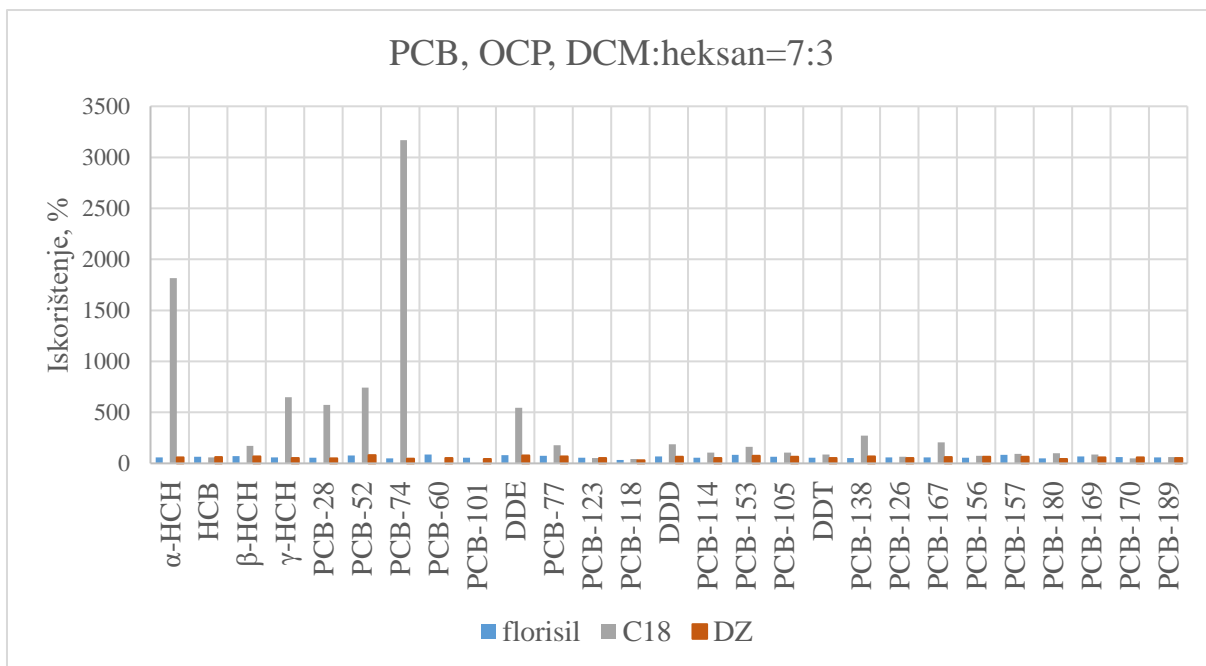
Slike 28.-32. prikazuju iskorištenja za ekstrakcije PAU-a prilikom korištenja različitih otapala. Općenito, najlošija iskorištenja dobivena su za čisti heksan, što je prikazano na Slici 32. i to pogotovo za PAU-e manje i veće molekulske mase. Nadalje, smjesa acetona i heksana daje zadovoljavajuća iskorištenja skoro za sve PAU-e i to kada se kao sorbens koristi dijatomejska zemlja. Za iskorištenja veća od 100 %, također, je zaslužan utjecaj matice. Smjesa diklormetana i heksana u omjeru 1:1 pokazuje nešto lošija iskorištenja od prethodnog otapala i to za PAU-e manje molekulske mase kao što su Acenafti, Fl, Fen, Flu i Pir. Ista smjesa diklormetana i heksana, ali u omjeru 3:7 daje slična iskorištenja kao i smjesa acetona i heksana i to za PAU-e srednje i veće molekulske mase. Ipak, za PAU-e manje molekulske mase iskorištenja su i dalje lošija od smjese acetona i heksana, primjerice za Acenafti, Fen, Ant. Konačno, zadnja ispitana smjesa otapala toluena i cikloheksana, također, daje lošija iskorištenja za PAU-e manje molekulske mase od smjese acetona i heksana, osim u slučaju Ant. Za PAU-e srednje i veće molekulske mase trend podataka je uglavnom sličan. Što se tiče sorbensa, najboljim su se pokazali C18 i dijatomejska zemlja, a budući da su vrijednosti iskorištenja uglavnom slične, u daljnje razmatranje će se uzeti oba. Na Slikama 33.-37. prikazani su rezultati provedenih ekstrakcija za PCB-e i OCP-e kada je korištena staklena vuna te 1 g florisila za dodatno pročišćavanje.



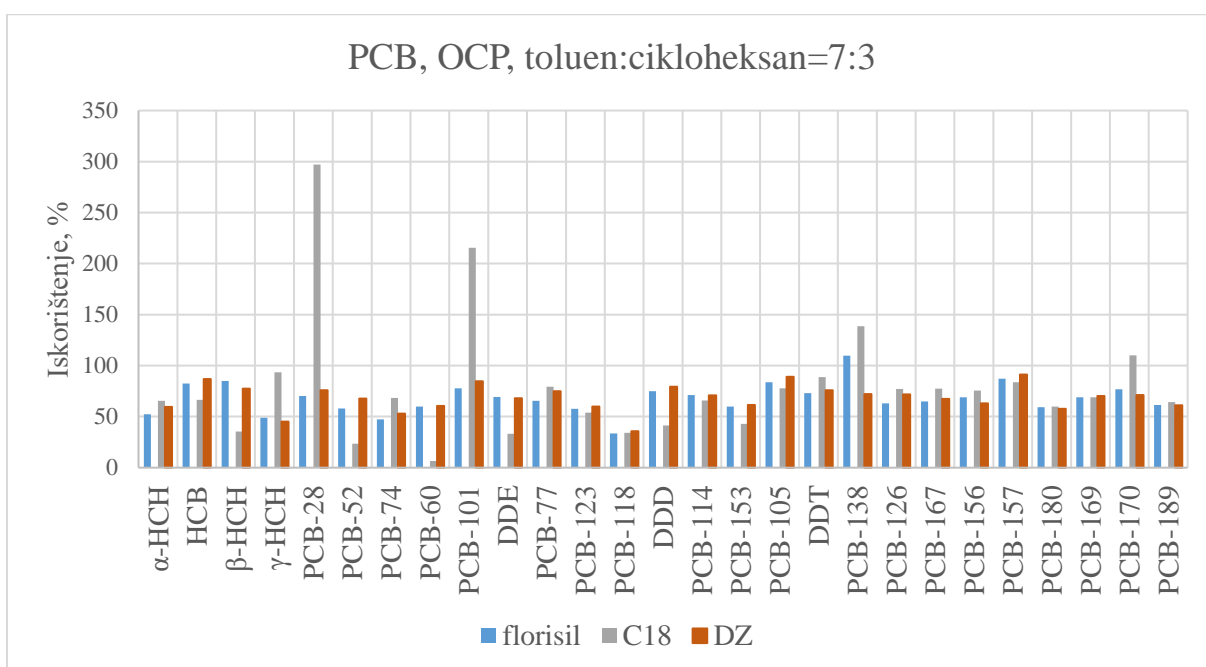
Slika 33. Utjecaj vrste otapala na učinkovitost ekstrakcije PCB-a i OCP-a kada je kao otapalo korištena smjesa acetona i heksana u omjeru 1:1



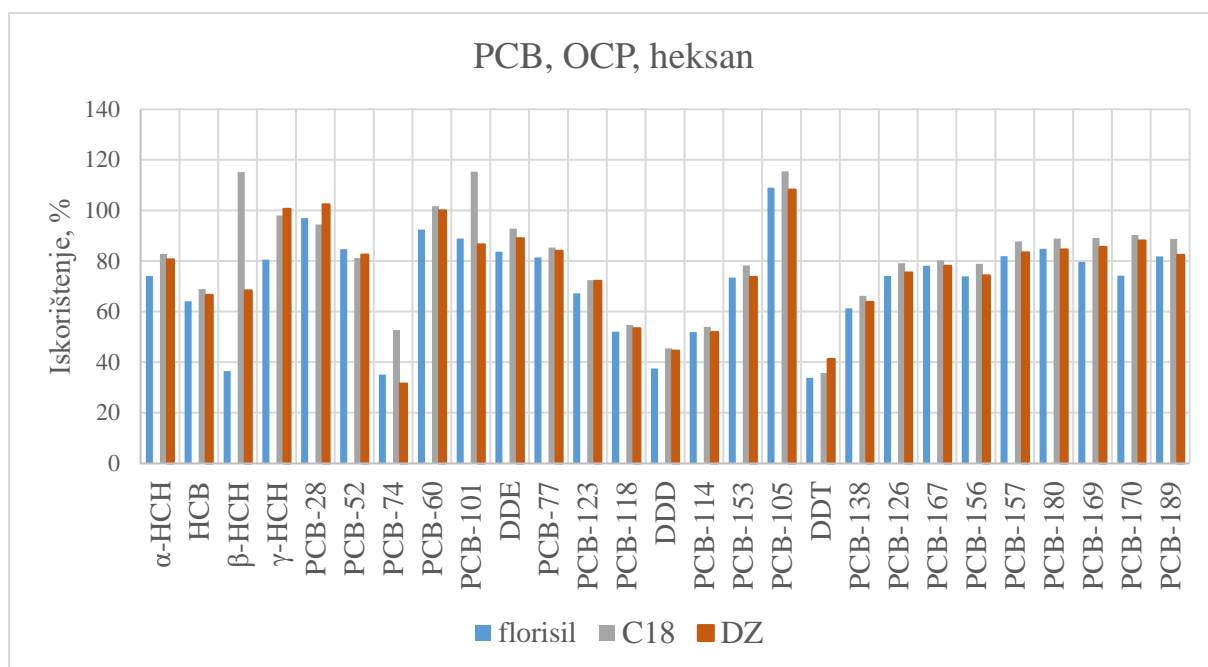
Slika 34. Utjecaj vrste otapala na učinkovitost ekstrakcije PCB-a i OCP-a kada je kao otapalo korištena smjesa diklormetana i heksana u omjeru 1:1



*Slika 35. Utjecaj vrste otapala na učinkovitost ekstrakcije PCB-a i OCP-a kada je kao otapalo korištena smjesa diklormetana i heksana u omjeru 7:3*



*Slika 36. Utjecaj vrste otapala na učinkovitost ekstrakcije PCB-a i OCP-a kada je kao otapalo korištena smjesa acetona i heksana u omjeru 1:1*



Slika 37. Utjecaj vrste otapala na učinkovitost ekstrakcije PCB-a i OCP-a kada je kao otapalo korišten heksan

Slike 33.-37. prikazuju iskorištenja ekstrakcije PCB-a i OCP-a prilikom korištenja različitih otapala. Smjesa acetona i heksana u omjeru 1:1 daju iskorištenja preko 60 % za obje vrste spojeva, uz iznimku PCB-114. Na Slikama 31., 32. i 33. vidljivo je da određeni spojevi imaju iskorištenja veće od 100 %, štoviše PCB-174 prilikom korištenja smjese diklormetana i heksana u omjeru 7:3 doseže i 3169 %. Očito da te tri vrste otapala pogoduju utjecaju matrice što povećava signal analita. Čisti heksan rezultira vrlo zadovoljavajućim iskorištenjima za većinu PCB-a i OCP-a, uglavnom većim od 50 %, uz iznimke za PCB-74, DDD i DDT što onda predstavlja glavnu konkurenciju prvoj kombinaciji otapala, tj. smjesi acetona i heksana u omjeru 1:1. Kao i u slučaju PAU-a, slične vrijednosti iskorištenja dobivene su korištenjem sorbensa C18 i dijatomejske zemlje.

Usporedbom dobivenih podataka može se zaključiti kako je za ekstrakciju OCP-a i PCB-a pogodna smjesa acetona:heksana = 1:1 kao i čisti heksan, dok je za PAU-e nedvojbeno najpogodnija smjesa acetona i heksana u omjeru 1:1 zbog čega je ona onda i odabrana kao otapalo za eluiranje. Kada je u pitanju sorbens, već je spomenuto kako C18 i dijatomejska zemlja daju podjednake rezultate. Međutim, gledajući s ekonomskog aspekta, dijatomejska zemlja je prihvatljivija i kao takva pogodnija za izvođenje ekstrakcije.

### 4.3. Validacija metode za određivanje PAU-a, PCB-a i OCP-a u uzorcima tla

- PAU

Za sve PAU-e u uzorcima tla procijenjena je linearnost u rasponu koncentracija od 1,82 do 45,45 ng/mL koristeći šest standardnih otopina opisanih u poglavlju 3.4.1. Umjerna krivulja za pojedini PAU dobivena je metodom unutarnjeg standarda, a dobiveni rezultati (površine ispod kromatografskih krivulja PAU-a i unutarnjeg standarda te poznatih koncentracija) analizirani su primjenom linearne regresijske analize čiji rezultati ukazuju na linearnost odziva MS detektora u ispitivanom koncentracijskom području, uz koeficijente korelacije  $r$  u rasponu između 0,976 za Acenaft-e-d10 i 0,997 za BaP.

Granice detekcije metode određene su množenjem standardnog odstupanja 10 ponovljenih mjerenja koncentracije PAU-a u najnižem standardu s 3, a granice kvantifikacije metode množenjem standardnog odstupanja 10 ponovljenih mjerenja koncentracija PAU-a u najnižem standardu s 10.

Tablica 11. Granice detekcije i kvantifikacije metode za PAU-e

<b>SPOJ</b>	<b>GRANICA DETEKCIJE, ng/mL</b>	<b>GRANICA KVANTIFIKACIJE, ng/mL</b>
<b>Acenafti</b>	2,62	4,90
<b>Acenaft-e</b>	2,26	3,78
<b>Fl</b>	2,50	4,51
<b>Fen</b>	2,56	4,65
<b>Ant</b>	2,43	4,16
<b>Flu</b>	2,11	3,04
<b>Pir</b>	2,23	3,52
<b>BaA</b>	2,21	3,18
<b>Kri</b>	2,14	3,04
<b>BbF</b>	2,26	3,35
<b>BkF</b>	2,31	3,45
<b>BjF</b>	2,13	2,93
<b>BeP</b>	2,21	3,10
<b>BaP</b>	2,32	3,42

nastavak Tablice 11.

<b>SPOJ</b>	<b>GRANICA DETEKCIJE, ng/mL</b>	<b>GRANICA KVANTIFIKACIJE, ng/mL</b>
<b>IP</b>	2,39	3,66
<b>DahA</b>	2,64	4,24
<b>BghiP</b>	2,55	4,28

- PCB/OCP

Linearnost odziva ECD-a ispitana je analizom standardnih smjesa PCB-a i OCP-a pripremljenih u n-heksanu pod uvjetima opisanim u poglavlju 3.4.1. Na slabo polarnim kapilarnim plinskromatografskim kolonama SPB-5 i SPB-1701 uz detekciju ECD-om postignuto je dobro razdvajanje svih analiziranih spojeva. Regresijska analiza kromatografskih podataka ukazuje na linearnost odziva detektora u ispitivanom koncentracijskom području, 0,759 - 5,254 ng/mL, uz koeficijente korelacije ( $r$ ) u rasponu od 0,994 do 1,000.

Granice detekcije određene su iz omjera visine kromatografske krivulje analiziranog spoja i šuma osnovne linije od 3:1. S obzirom na vrlo niske koncentracije PCB-a i OCP-a u tlu granice detekcije uzimane su i kao granice kvantifikacije analiziranih spojeva u tlu. Kako se granice detekcije pojedinih spojeva mijenjaju s promjenama osjetljivosti detektora navedene su prosječne vrijednosti granica detekcije analiziranih spojeva postignute uz postojeće uvjete. Granice detekcije bile su u rasponu od 0,01 do 0,05 ng/mL.

Tablica 12. Granice detekcije za PCB-e i OCP-e

<b>SPOJ</b>	<b>GRANICA DETEKCIJE, ng/mL</b>
<b>HCB</b>	0,01
<b><math>\alpha</math>-HCH</b>	0,02
<b><math>\beta</math>-HCH</b>	0,02
<b><math>\gamma</math>-HCH</b>	0,01
<b><math>p,p'</math>-DDE</b>	0,02
<b><math>p,p'</math>-DDD</b>	0,02
<b><math>p,p'</math>-DDT</b>	0,03
<b>PCB-28</b>	0,02
<b>PCB-52</b>	0,03
<b>PCB-60</b>	0,03

*nastavak Tablice 12.*

<b>SPOJ</b>	<b>GRANICA DETEKCIJE, ng/mL</b>
<b>PCB-74</b>	0,02
<b>PCB-101</b>	0,03
<b>PCB-105</b>	0,03
<b>PCB-114</b>	0,05
<b>PCB-118</b>	0,05
<b>PCB-123</b>	0,05
<b>PCB-138</b>	0,02
<b>PCB-153</b>	0,02
<b>PCB-156</b>	0,02
<b>PCB-157</b>	0,03
<b>PCB-167</b>	0,03
<b>PCB-170</b>	0,05
<b>PCB-180</b>	0,05
<b>PCB-189</b>	0,05

Ispitivanje iskorištenja PAU-a, PCB-a i OCP-a provedena je MSPD metodom sa optimalnim uvjetima definiranim u poglavlju 4.2. U Tablici 13. prikazana su iskorištenja ispitivanih PAU-a, a u Tablici 14. PCB-a i OCP-a na dva koncentracijska nivoa unutar linearnog područja. Svaka ekstrakcija ponavljala se tri puta, a iskorištenje je izraženo kao srednja vrijednost. U svim provedenim eksperimentima dodana je uzorku jednaka količina surogat standarda koja odgovara masenoj koncentraciji od 5 ng/mL. Očekuje se da iskorištenja ne ovise o koncentraciji uzorka, odnosno da optimirana metoda ne pokazuje značajnu razliku u iskorištenjima tijekom očekivanog koncentracijskog područja analiziranih spojeva.



Tablica 13. Iskorištenje PAU-a primjenom optimalnih uvjeta MSPD unutar linearnog područja

SPOJ	Koncentracijski nivo, ng/mL	Iskorištenje $\pm$ RSD ( $n=5$ ), %	SPOJ	Koncentracijski nivo, ng/mL	Iskorištenje $\pm$ RSD ( $n=5$ ), %
Naf	5	/	Naf-d8	5	15 $\pm$ 33
	50	/			15 $\pm$ 12
Acenafti	5	17 $\pm$ 33	Acenafti-d8		25 $\pm$ 20
	50	12 $\pm$ 16			24 $\pm$ 11
Acenafte	5	23 $\pm$ 19	Acenafte-d10		23 $\pm$ 21
	50	17 $\pm$ 11			22 $\pm$ 10
Fl	5	36 $\pm$ 14	Fl-d10		29 $\pm$ 11
	50	18 $\pm$ 11			26 $\pm$ 7
Fen	5	110 $\pm$ 18	Fen-d10		32 $\pm$ 8
	50	24 $\pm$ 12			27 $\pm$ 6
Ant	5	32 $\pm$ 8	Ant-d10		43 $\pm$ 5
	50	19 $\pm$ 15			39 $\pm$ 9
Flu	5	39 $\pm$ 8	Flu-d10		36 $\pm$ 5
	50	20 $\pm$ 14			31 $\pm$ 11
Pir	5	36 $\pm$ 7	Pir-d10		38 $\pm$ 5
	50	20 $\pm$ 13			31 $\pm$ 13
BaA	5	43 $\pm$ 2	BaA-d12		67 $\pm$ 1
	50	32 $\pm$ 10			61 $\pm$ 8
Kri	5	42 $\pm$ 2	Kri-d12		53 $\pm$ 3
	50	28 $\pm$ 15			46 $\pm$ 12
BbF	5	42 $\pm$ 3	BbF-d12	54 $\pm$ 4	
	50	30 $\pm$ 9		50 $\pm$ 7	
BkF	5	51 $\pm$ 3	BkF-d12	72 $\pm$ 2	
	50	37 $\pm$ 7		66 $\pm$ 6	
BjF	5	44 $\pm$ 2	BaP-d12	108 $\pm$ 3	
	50	34 $\pm$ 10		111 $\pm$ 6	
BeP	5	34 $\pm$ 5	IP-d12	86 $\pm$ 5	
	50	26 $\pm$ 5		99 $\pm$ 10	

nastavak Tablice 13.

SPOJ	Koncentracijski nivo, ng/mL	Iskorištenje $\pm$ RSD ( $n=5$ ), %	SPOJ	Koncentracijski nivo, ng/mL	Iskorištenje $\pm$ RSD ( $n=5$ ), %	
BaP	5	53 $\pm$ 8	DahA-d14	5	134 $\pm$ 11	
	50	44 $\pm$ 6			157 $\pm$ 6	
IP	5	63 $\pm$ 7	BghiP-d12		63 $\pm$ 4	
	50	52 $\pm$ 7			65 $\pm$ 10	
DahA	5	91 $\pm$ 7				
	50	84 $\pm$ 8				
BghiP	5	44 $\pm$ 6				
	50	37 $\pm$ 8				

Tablica 14. Iskorištenje PCB-a i OCP-a primjenom optimalnih uvjeta MSPD unutar linearnog područja

SPOJ	Koncentracijski nivo, ng/mL	Iskorištenje $\pm$ RSD ( $n=5$ ), %	SPOJ	Koncentracijski nivo, ng/mL	Iskorištenje $\pm$ RSD ( $n=5$ ), %
$\alpha$ -HCH	2	66 $\pm$ 20	PCB-114	2	63 $\pm$ 21
	5	77 $\pm$ 23		5	75 $\pm$ 18
HCB	2	56 $\pm$ 21	PCB-153	2	55 $\pm$ 20
	5	67 $\pm$ 20		5	66 $\pm$ 24
$\beta$ -HCH	2	98 $\pm$ 24	PCB-105	2	85 $\pm$ 33
	5	91 $\pm$ 18		5	91 $\pm$ 19
$\gamma$ -HCH	2	69 $\pm$ 20	DDT	2	63 $\pm$ 55
	5	79 $\pm$ 23		5	51 $\pm$ 24
PCB-28	2	67 $\pm$ 17	PCB-138	2	56 $\pm$ 15
	5	69 $\pm$ 13		5	65 $\pm$ 20
PCB-52	2	74 $\pm$ 23	PCB-126	2	64 $\pm$ 24
	5	68 $\pm$ 9		5	76 $\pm$ 21

nastavak Tablice 14.

SPOJ	Koncentracijski nivo, ng/mL	Iskorištenje $\pm$ RSD ( $n=5$ ), %	SPOJ	Koncentracijski nivo, ng/mL	Iskorištenje $\pm$ RSD ( $n=5$ ), %
PCB-74	2	48 $\pm$ 12	PCB-167	2	56 $\pm$ 22
	5	59 $\pm$ 11		5	73 $\pm$ 15
PCB-60	2	55 $\pm$ 21	PCB-156	2	55 $\pm$ 15
	5	65 $\pm$ 16		5	64 $\pm$ 28
PCB-101	2	76 $\pm$ 23	PCB-157	2	123 $\pm$ 6
	5	82 $\pm$ 25		5	91 $\pm$ 22
DDE	2	74 $\pm$ 23	PCB-180	2	79 $\pm$ 36
	5	83 $\pm$ 22		5	75 $\pm$ 15
PCB-77	2	65 $\pm$ 24	PCB-169	2	64 $\pm$ 25
	5	77 $\pm$ 17		5	83 $\pm$ 10
PCB-123	2	58 $\pm$ 15	PCB-170	2	136 $\pm$ 19
	5	65 $\pm$ 16		5	76 $\pm$ 21
PCB-118	2	58 $\pm$ 36	PCB-189	2	55 $\pm$ 28
	5	64 $\pm$ 19		5	71 $\pm$ 17
DDD	2	59 $\pm$ 12			
	5	70 $\pm$ 18			

Podaci prikazani u Tablici 13. ukazuju na najveći utjecaj promjene koncentracije uzorka prilikom ekstrakcije Flu, gdje razlika u iskorištenjima iznosi gotovo 20 %. Nasuprot tomu, najmanji utjecaj koncentracije prisutan je kod BghiP i iznosi 7 %. Općenito, bolja iskorištenja dobivena su na nižem koncentracijskom nivou. Iskorištenje veće od 100 % na nižem koncentracijskom nivou za Fen može se pripisati utjecaju matice.

Iz Tablice 14. može se zaključiti kako promjena koncentracije uzorka najveći utjecaj na iskorištenje ekstrakcije ima za spoj PCB-189, a najmanji na PCB-28. Nadalje, veća iskorištenja uglavnom su dobivena na višem koncentracijskom nivou, uz određene iznimke:  $\beta$ -HCH, PCB-52, DDT i PCB-180. Također, i za ove spojeve, iskorištenja veća od 100 % na nižem koncentracijskom nivou, što je slučaj kod PCB-157 i PCB-170, posljedica su utjecaja matice

uzorka. Iz istog razloga dobivena su lošija iskorištenja na nižem koncentracijskom nivou, poput onih za HCB, PCB-74, PCB-60, PCB-153, PCB-138, PCB-167, PCB-156 i PCB-189.

#### 4.4. Primjena metode na realnim uzorcima

Nakon validacije, optimirana ekstrakcija primjenjena je na 10 različitih realnih uzoraka tla iz okolice Zagreba. U Tablici 15. i 16. prikazane su dobivene koncentracije analiziranih spojeva.

Tablica 15. Koncentracija analiziranih PAU-a u realnim uzorcima tla

	koncentracija u tlu (ng/g)									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
<b>BaA</b>	772,3	21,0	32,4	4,7	17,4	25,1	3,6	4,5	3,3	31,1
<b>Kri</b>	789,5	27,2	42,9	5,2	23,2	32,3	7,6	6,5	4,9	43,4
<b>BbF</b>	803,5	24,7	40,2	5,0	21,7	27,8	5,8	5,2	3,8	34,8
<b>BkF</b>	357,2	11,2	16,6	3,4	10,8	18,4	3,5	3,4	3,0	20,4
<b>BjF</b>	363,3	10,3	17,0	2,6	10,0	18,8	4,9	2,9	2,1	20,8
<b>BeP</b>	198,7	7,6	10,7	1,8	6,2	7,7	1,7	1,7	1,3	10,2
<b>BaP</b>	556,5	17,5	28,5	2,5	14,9	21,4	1,9	3,1	1,8	19,3
<b>IP</b>	502,8	15,4	26,3	4,1	15,7	21,4	4,0	4,9	3,4	23,0
<b>DahA</b>	127,7	4,6	7,7	3,9	5,2	6,8				6,2
<b>BghiP</b>	512,0	14,9	24,6	3,7	16,1	22,2	3,6	3,9	3,2	25,2

Tablica 16. Koncentracija analiziranih PCB-a i OCP-a u realnim uzorcima tla

	koncentracija u tlu (ng/g)									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
<b><math>\alpha</math>-HCH</b>	2,3	2,8	3,0	2,8	3,6	3,0	3,8	3,6	3,2	2,9
<b>HCB</b>	1,8	1,6	1,6	1,8	2,9	2,7	2,6	2,2	2,1	1,7
<b><math>\beta</math>-HCH</b>	3,5	1,5	2,1	1,4		2,2	3,4	5,6		
<b><math>\gamma</math>-HCH</b>	1,8	1,9	2,8	2,5		2,4	2,2	2,9		
<b>PCB-28</b>	0,7	1,0	1,5	1,7	1,8	2,1	1,6	2,0	2,8	2,2
<b>PCB-52</b>		1,2	0,2		1,7	12,3	2,6	1,5	1,9	1,1

nastavak Tablice 16.

	koncentracija u tlu (ng/g)									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
<b>PCB-74</b>	9,3	0,7	1,1	0,7		0,4		2,4	0,8	1,3
<b>PCB-60</b>	5,6	0,6	2,4	2,9	2,8	2,9	2,4	1,9	2,6	2,4
<b>PCB-101</b>	2,8		0,6	1,2	0,6	1,1	1,8	0,7	1,6	1,0
<b>DDE</b>	1,7	1,3	1,5	1,7	2,5	1,7	2,5	1,7	1,8	1,8
<b>PCB-77</b>		1,3		1,5					2,8	2,9
<b>PCB-123</b>		1,9	7,8	2,1	6,4	3,5	3,4	2,4		
<b>PCB-118</b>	2,2		2,1	2,1	2,3	2,4	3,6	2,6		
<b>DDD</b>	3,1	2,2	2,7	2,9	2,5	2,5	2,7	2,4	2,7	2,7
<b>PCB-114</b>	2,5					1,4			1,2	
<b>PCB-153</b>	18,3		1,4	1,8		1,5	4,1	0,9		
<b>PCB-105</b>	2,7	0,5		2,1		0,8	2,3	1,5	1,0	
<b>DDT</b>		6,8	9,8	25,0	5,9	5,8	5,0	5,1	4,7	7,4
<b>PCB-138</b>	3,2		2,9		1,4		1,6	0,9		
<b>PCB-126</b>										
<b>PCB-167</b>	1,1		0,6	0,6	1,3	1,2	1,7	1,7	1,4	1,3
<b>PCB-156</b>	5,3	1,2					2,5	2,0		
<b>PCB-157</b>	3,5									
<b>PCB-180</b>	15,2	2,4	3,9	3,7	4,8	4,8	4,6	1,5		
<b>PCB-169</b>									1,8	1,7
<b>PCB-170</b>	16,9									3,1
<b>PCB-189</b>	0,8				1,1	1,5	1,1	1,2	1,5	
<b>DDT+DDE+DDD</b>	4,8	10,3	14,0	29,6	10,9	10,1	10,2	9,2	9,2	11,9
<b>suma PCB regulativa</b>	42,3	4,7	12,6	10,5	12,5	24,1	20,0	10,1	6,3	4,3

Koncentracije PAU-a u realnim uzorcima tla, prikazane u Tablici 15., sve su redom veće od granice detekcije (Tablica 11.), a u slučaju tla označenog slovom A dosežu vrlo visoke vrijednosti. Ostala tla pokazuju značajno niže koncentracije, pogotovo ona označena slovima D, G, H i I. Općenito, najniža koncentracija među svim tlima dobivena je za spoj DahA, a prate

ga i BeP te BaP. Kao najviše zastupljeni PAU pokazali su se Kri i BbF. PAU-i s manjim brojem aromatskih prstenova (od Naf do Pir) nisu detektirani u realnim uzorcima tla što može biti posljedica nižih iskorištenja dobivenih primjenom optimalnih uvjeta MSPD ekstrakcije za navedene PAU kako i za njihove odgovarajuće deuterirane spojeve, vidljivih u Tablici 12. U slučaju PCB-a i OCP-a dobivene su koncentracije prikazane u Tablici 16., od kojih neke pokazuju vrijednosti ispod granice detekcije (Tablica 12.). Može se primjetiti kako su OCP-i zastupljeniji od PCB-a i njihove su koncentracije uglavnom iznad granice detekcije. Nasuprot tomu, određeni PCB-i pokazuju koncentracije sve redom manje od granice detekcije u skoro svim ispitivanim tlima, a to su primjerice PCB-126, PCB-169 i PCB-170.

Uspoređujući dobivene rezultate s MDK vrijednostima za PAU-e (Tablica 2.) te PCB-e i OCP-e (Tablica 5.) zaključuje se da niti jedno ispitivano tlo ne premašuje zadane koncentracije. Nadalje, uspoređujući koncentracije ispitivanih spojeva s koncentracijama istih u ostatku svijeta, konkretno Europi primjećeno je kako su koncentracije PAU znatno manje u Zagrebu nego u npr. Londonu gdje iznose oko 18 mg/kg tla, dok su koncentracije PCB-a slične onima dobivenim u Zagrebu, oko 22 µg/kg tla [77].

## *5. ZAKLJUČAK*

Uvidom u negativne učinke organskih zagađivala na cjelokupni okoliš, a posebice tlo pojavila se potreba za njihovom identifikacijom i kvantifikacijom koje pokazuju niz izazova upravo zbog složenosti same matice. Zbog toga se za izoliranje organskih zagađivala, tj. policikličkih aromatskih ugljikovodika, polikloriranih bifenila te organoklorovih pesticida iz uzoraka tla primjenila ekstrakcija raspršenjem tla kroz čvrstu fazu. Prethodno je metoda optimirana, a parametri koji su se pratili su: vrsta sorbensa, omjer tla i sorbensa te otapalo za eluiranje. U nastavku su navedeni zaključci provedenih eksperimenata:

- Podjednako visoka iskorištenja ekstrakcije dobivena su u slučaju kada se kao sorbens koristi C18 i dijatomejska zemlja. Konačni izbor sorbensa zato ovisi o ekonomskom aspektu, a u tom slučaju prihvatljivija je dijatomejska zemlja.
- Omjer tla i sorbensa 1:2 se pokazao najboljim zbog ekonomskog aspekta te boljih iskorištenja za PCB-e i OCP-e.
- Za ekstrakciju OCP-a i PCB-a podjednako su pogodna otapala smjesa acetona i heksana u omjeru 1:1 i čisti heksan, dok je za PAU-e isključivo najpogodnija smjesa acetona i heksana u omjeru 1:1. Budući da je smjesa acetona i heksana pogodna za sve vrste ispitivani spojeva, ona je i odabrana kao konačan parametar.

Validacijom metode potvrdila se linearnost metode na što ukazuju visoke vrijednosti  $R^2$  koeficijenta za sve tri ispitivane vrste spojeva. Granice detekcije za ispitivane PAU-e kreću se između 2,11 i 2,64 ng/mL, a za PCB-e i OCP-e između 0,01 i 0,05 ng/mL. Što se tiče iskorištenja za ispitivane PAU, dobivene su više vrijednosti na nižem koncentracijskom nivou. Nasuprot tomu, ekstrakcija PCB-a i OCP-a pokazuje veća iskorištenja na višem koncentracijskom nivou. Za neke spojeve dobivena su iskorištenja veća od 100 % što se pripisuje utjecaju matice.

Primjena ispitivane metode na realne uzorke tla na području Zagreba i okolice ukazuju na koncentracije PAU-a, PCB-a i OCP-a manje od maksimalno dopuštenih u Republici Hrvatskoj. Najzastupljeniji PAU su Kri i BbF, među PCB-ima se ističu PCB-60, PCB-123 te PCB-180. Iako je učinkovitost ekstrakcije OCP-a veća od PCB-a, njihova je ukupna koncentracija niža od ukupne koncentracije PCB-a.



## Popis literature:

- [1.] O. M. Alharbi, R. A. Khattab, I. Ali, Health and environmental effects of persistent organic pollutants, *Journal of Molecular Liquids* **263** (2018) 442-453.
- [2.] M. A. Ashraf, Persistent organic pollutants (POPs): a global issue, a global challenge, *Environmental Science and Pollution Research* **24(5)** (2017) 4223-4227.
- [3.] K. C. Jones, P. De Voogt, Persistent organic pollutants (POPs): state of the science, *Environmental pollution* **100(1-3)** (1999) 209-221.
- [4.] Z. L. Zhang, H. S. Hong, J. L. Zhou, J. Huang, G. Yu, Fate and assessment of persistent organic pollutants in water and sediment from Minjiang River Estuary, Southeast China, *Chemosphere* **52(9)** (2003) 1423-1430.
- [5.] M. Kaštelan-Macan i M. Petrović (ur.), Analitika okoliša, HINUS i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, (2013) 111-286.
- [6.] I. Jakovljević, S. Žužul, Policiklički aromatski ugljikovodici u zraku, *Archives of Industrial Hygiene & Toxicology/Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* **62(4)** (2011)
- [7.] A. T. Lawal, Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review, *Cogent Environmental Science* **3(1)** (2017) 1339841.
- [8.] J. P. Costantino, C. K. Redmond, A. Bearden, Occupationally related cancer risk among coke oven workers: 30 years of follow-up, *Journal of occupational and environmental medicine*, (1995) 597-604.
- [9.] T. Partanen, P. Boffetta, Cancer risk in asphalt workers and roofers: Review and meta-analysis of epidemiologic studies, *American journal of industrial medicine* **26(6)** (1994) 721-740.
- [10.] S. C. C. Lung, C. H. Liu, Fast analysis of 29 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and nitro-PAHs with ultra-high performance liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry, *Scientific Reports*, **5(1)** (2015) 1-13.
- [11.] E. Dybing, P. E. Schwarze, P. Nafstad, K. Victorin, T. M. Penning, Polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air and cancer, *Air Pollution and Cancer* **161** (2013)
- [12.] A. K. Haritash, C. P. Kaushik, Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review, *Journal of hazardous materials* **169(1-3)** (2009) 1-15.

- [13.] H. Choi, R. Harrison, H. Komulainen, J. M. D. Saborit, Polycyclic aromatic hydrocarbons, *WHO guidelines for indoor air quality: selected pollutants*, World Health Organization, (2010)
- [14.] A. S. Tsibart, A. N. Gennadiev, Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: sources, behavior, and indication significance (a review), *Eurasian Soil Science* **46(7)** (2013) 728-741.
- [15.] B. A. M. Bandowe, J. Sobocka, W. Wilcke, Oxygen-containing polycyclic aromatic hydrocarbons (OPAHs) in urban soils of Bratislava, Slovakia: patterns, relation to PAHs and vertical distribution, *Environmental pollution* **159(2)** (2011) 539-549.
- [16.] C. T. Chiou, S. E. McGroddy, D. E. Kile, Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments, *Environmental science & technology* **32(2)** (1998) 264-269.
- [17.] B. Saba, U. Rafique, I. Hashmi, Adsorption kinetics of anthracene and phenanthrene in different soils of Attock Refinery Limited (ARL) Rawalpindi, Pakistan, *Desalination and Water treatment* **30(1-3)** (2011) 333-338.
- [18.] S. J. Chen, H. B. Su, J. E. Chang, W. J. Lee, K. L. Huang, L. T. Hsieh, Y. C. Huang, W. Y. Lin, C. C. Lin, Emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from the pyrolysis of scrap tires, *Atmospheric Environment* **41(6)** (2007) 1209-1220.
- [19.] H. H. Yang, W. J. Lee, S. J. Chen, S. O. Lai, PAH emission from various industrial stacks, *Journal of Hazardous materials* **60(2)** (1998) 159-174.
- [20.] B. Maliszewska-Kordybach, Sources, concentrations, fate and effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the environment. Part A: PAHs in air, *Polish journal of environmental studies* **8** (1999) 131-136.
- [21.] K. D. Bartle, M. L. Lee, S. A. Wise, Modern analytical methods for environmental polycyclic aromatic compounds, *Chemical Society Reviews* **10(1)** (1981) 113-158.
- [22.] T. Rengarajan, P. Rajendran, N. Nandakumar, B. Lokeshkumar, P. Rajendran, I. Nishigaki, Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **5(3)** (2015) 182-189.
- [23.] J. Mandić, *Policiklički aromatski spojevi u sedimentu srednjeg i južnog Jadrana*, Doktorska disertacija, Sveučilište u Splitu, 2016.

- [24.] J. Ribeiro, T. F. Silva, J. G. Mendonça Filho, D. Flores, Fly ash from coal combustion—An environmental source of organic compounds, *Applied Geochemistry* **44** (2014) 103-110.
- [25.] I. Jakovljević, Prostorna i vremenska raspodjela policikličkih aromatskih ugljikovodika u zraku, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2017.
- [26.] J. Niederfellner, D. Lenoir, G. Matuschek, F. Rehfeldt, H. Utschick, R. Brüggemann, Description of vapour pressures of polycyclic aromatic compounds by graph theoretical indices, *Quantitative Structure-Activity Relationships* **16(1)** (1997) 38-48.
- [27.] Narodne Novine, Pravilnik o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od onečišćenja, *Vlada Republike Hrvatske, Ministarstvo poljoprivrede*, 2013.
- [28.] M. Dvorščak, *Trace analysis of persistent organochlorine compounds in soil and atmospheric particles*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
- [29.] O. Faroon, P. Ruiz, Polychlorinated biphenyls: New evidence from the last decade, *Toxicology and industrial health* **32(11)** (2016) 1825-1847.
- [30.] A. V. B. Reddy, M. Moniruzzaman, T. M. Aminabhavi, Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment: recent updates on sampling, pretreatment, cleanup technologies and their analysis, *Chemical Engineering Journal* **358** (2019) 1186-1207.
- [31.] S. Herceg Romanić, Poliklorirani bifenili i organoklorovi pesticidi s posebnim osvrtom na njihovu prisustnost u iglicama crnogoričnog drveća, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **53(1)** (2002) 21-30.
- [32.] A. M. Taiwo, A review of environmental and health effects of organochlorine pesticide residues in Africa *Chemosphere* **220** (2019) 1126-1140.
- [33.] R. Jayaraj, P. Megha, P. Sreedev, Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment, *Interdisciplinary toxicology* **9(3-4)** (2016) 90-100.
- [34.] M. M. El Bouraie, A. A. El Barbary, M. Yehia, M. Determination of organochlorine pesticide (OCPs) in shallow observation wells from El-Rahawy contaminated area, Egypt, *Environmental Research, Engineering and Management* **57(3)** (2011) 28-38.

- [35.] K. S. Schafer, S. E. Kegley, Persistent toxic chemicals in the US food supply, *Journal of Epidemiology & Community Health* **56(11)** (2002) 813-817.
- [36.] R. Jing, S. Fusi, B. V. Kjellerup, Remediation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in contaminated soils and sediment: state of knowledge and perspectives, *Frontiers in Environmental Science* **6** (2018) 79.
- [37.] J. P. Sidhu, W. Ahmed, W. Gernjak, R. Aryal, D. McCarthy, A. Palmer, P. Kolotelo, S. Toze, Sewage pollution in urban stormwater runoff as evident from the widespread presence of multiple microbial and chemical source tracking markers, *Science of the Total Environment* **463** (2013) 488-496.
- [38.] D. Pimentel, Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics, *Journal of Agricultural and environmental Ethics* **8(1)** (1995) 17-29.
- [39.] S. Tanabe, PCB problems in the future: foresight from current knowledge, *Environmental pollution* **50(1-2)** (1988) 5-28.
- [40.] I. Kmetič, T. Murati, K. Kvakani, M. Ivanjko, B. Šimić, Poliklorirani bifenili–toksičnost i rizici, *Croat. J. Food Sci. Technol* **4(1)** (2012) 71-80.
- [41.] K. Breivik, R. Alcock, Y. F. Li, R. E. Bailey, H. Fiedler, J. M. Pacyna, Primary sources of selected POPs: regional and global scale emission inventories, *Environmental pollution* **128(1-2)** (2004) 3-16.
- [42.] K. Ballschmiter, R. Wittlinger, R. Interhemisphere exchange of hexachlorocyclohexanes, hexachlorobenzene, polychlorobiphenyls, and 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (p-chlorophenyl) ethane in the lower troposphere, *Environmental science & technology* **25(6)** (1991) 1103-1111.
- [43.] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=61548> (preuzeto 6.6.2022.)
- [44.] J. S. Joffe, ABC of Soils, *Pedology Publications*, New Brunswick (1949)
- [45.] K. S. Tale, S. Ingole, A review on role of physico-chemical properties in soil quality, *Chemical Science Review and Letters* **4(13)** (2015) 57-66.
- [46.] S. Paudel, J. P. Sah, Physiochemical characteristics of soil in tropical sal (*Shorea robusta* Gaertn.) forests in eastern Nepal, *Himalayan Journal of Sciences* **1(2)** (2003)107-110.
- [47.] D. Mutavdžić Pavlović, Fizikalna i kemijska svojstva tla i njihovo određivanje, *Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za analitičku kemiju, interna skripta, Zagreb* (2010)

- [48.] E. Prichard, V. Barwick, *Quality assurance in analytical chemistry*, John Wiley & Sons (2007)
- [49.] J. F. Artiola, A. W. Warrick, Sampling and data quality objectives for environmental monitoring, *Environmental Monitoring and Characterization* (2004) 11-27.
- [50.] P. Wang, Q. Zhang, Y. Wang, T. Wang, X. Li, L. Ding, G. Jiang, Evaluation of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave-assisted extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples, *Analytica Chimica Acta* **663(1)** (2010) 43-48.
- [51.] M. D. L. De Castro, J. L. L. García, *Introduction to solid sample pretreatment, Acceleration and Automation of Solid Sample Treatment* (2002) 1–10.
- [52.] M. D. Luque De Castro, F. Priego-Capote, Soxhlet extraction: Past and present panacea, *Journal of Chromatography A* **1217** (2010) 2383-2389.
- [53.] N. Fidalgo-Used, E. Blanco-González, A. Sanz-Medel, Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples, *Analytica Chimica Acta* **590(1)** (2007) 1-16.
- [54.] B. K. Tiwari, Ultrasound: A clean, green extraction technology, *Trends in Analytical Chemistry* **71** (2015) 100-109.
- [55.] E. Ibáñez, J. A. Mendiola, M. Castro-Puyana, Supercritical Fluid Extraction, *Encyclopedia of Food and Health* (2015) 227–233.
- [56.] M. Herrero, J. A. Mendiola, A. Cifuentes, E. Ibáñez, Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications, *Journal of Chromatography A* **1217(16)** (2010) 2495-2511.
- [57.] R. M. Smith, Extractions with superheated water, *Journal of Chromatography A* **975(1)** (2002) 31-46.
- [58.] P. C. Veggi, J. Martinez, M. A. A. Meireles, Fundamentals of microwave extraction, *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds* (2012) 15-52.
- [59.] I. J. Seabra, A. M. A. Dias, M. E. M. Braga, H. C. De Sousa, High pressure solvent extraction of maritime pine bark: Study of fractionation, solvent flow rate and solvent composition, *The journal of supercritical fluids* **62** (2012) 135-148.

- [60.] A. L. Capriotti, C. Cavaliere, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Laganà, Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction, *Journal of chromatography A* **1217(16)** (2010) 2521-2532.
- [61.] A. L. Capriotti, C. Cavaliere, A. Laganà, S. Piovesana, R. Samperi, Recent trends in matrix solid-phase dispersion, *Trends in Analytical Chemistry* **43** (2013) 53-66.
- [62.] E. M. Kristenson, A. T. Udo, L. Ramos, Recent advances in matrix solid-phase dispersion, *Trends in Analytical Chemistry* **25(2)** (2006) 96-111.
- [63.] L. Pensado, M. C. Casais, M. C. Mejuto, R. Cela, Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples, *Journal of chromatography A* **1077(2)** (2005) 103-109.
- [64.] R. A. Doong, P. L. Liao, Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in soil samples using headspace solid-phase microextraction, *Journal of Chromatography A* **918(1)** (2001) 177-188.
- [65.] D. Mutavdžić Pavlović, T. Pinušić, M. Periša, S. Babić, Optimization of matrix solid-phase dispersion for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of 12 pharmaceuticals in sediments, *Journal of Chromatography A* **1258** (2012) 1-15.
- [66.] S. A. Barker, Matrix solid phase dispersion (MSPD), *Journal of biochemical and biophysical methods* **70(2)** (2007) 151-162.
- [67.] S. A. Barker, A. R. Long, C. R. Short, Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion, *Journal of Chromatography A* **475(2)** (1989) 353-361.
- [68.] J. A. Ferreira, L. F. S. Santos, N. R. D. S. Souza, S. Navickiene, F. A. de Oliveira, V. Talamini, MSPD sample preparation approach for reversed-phase liquid chromatographic analysis of pesticide residues in stem of coconut palm, *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **91(2)** (2013) 160-164.
- [69.] P. Campíns-Falcó, J. Verdú-Andrés, A. Sevillano-Cabeza, C. Molins-Legua, R. Herráez-Hernández, New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves, *Journal of Chromatography A* **1211(1-2)** (2008) 13-21.

- [70.] N. Carro, L. Vilas, I. García, M. Ignacio, A. M. Mouteira, Optimization of a method based on micro-matrix solid-phase dispersion (micro-MSPD) for the determination of PCBs in mussel samples, *Analytical chemistry research* **11** (2017) 1-8.
- [71.] J. Li, D. Liu, T. Wu, W. Zhao, Z. Zhou, P. Wang, A simplified procedure for the determination of organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls in edible vegetable oils, *Food Chemistry* **151** (2014) 47-52.
- [72.] T. Bolanča, Š. Ukić, Ionska kromatografija, *Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb* **79** (2013)
- [73.] L.M.L. Nollet, L.S.P. de Gelder, eds., The handbook of water analysis, third edition, Third edit, Taylor & Francis Group, 2014.
- [74.] S. P. J. Van Leeuwen, J. De Boer, Advances in the gas chromatographic determination of persistent organic pollutants in the aquatic environment, *Journal of Chromatography A* **1186(1-2)** (2008) 161-182.
- [75.] S. Ncube, L. Madikizela, E. Cukrowska, L. Chimuka, Recent advances in the adsorbents for isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from environmental sample solutions, *Trends in Analytical Chemistry* **99** (2018) 101-116.
- [76.] R. B. Hoff, T. M. Pizzolato, Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: A review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications, *Trends in Analytical Chemistry* **109** (2018) 83-96.
- [77.] C. H. Vane, A. W. Kim, D. J. Beriro, M. R. Cave, K. Knights, V. Moss-Hayes, P. C. Nathanail, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) in urban soils of Greater London, UK, *Applied Geochemistry* **51** (2014) 303-314.

## *6. ŽIVOTOPIS*



