

**AGNIESZKA HUĆKO<sup>1</sup>, EWA SZPYRKA<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Uniwersytet Rzeszowski, Kolegium Nauk Przyrodniczych, Instytut Biotechnologii – student<sup>2</sup>Uniwersytet Rzeszowski, Kolegium Nauk Przyrodniczych, Instytut Biotechnologii, e-mail: eszpyrka@ur.edu.pl**OPTIMALIZACJA I WALIDACJA METODY OZNACZANIA  
POLICHLOROWANYCH BIFENYLI W GLEBIE**

*Polichlorowane bifenyly (PCB) są to syntetyczne związki aromatyczne produkowane w dużych ilościach na całym świecie od lat trzydziestych XX wieku. Ich synteza została zabroniona w latach 70 XX wieku. Związki te miały szerokie zastosowanie między innymi jako płyny dielektryczne w kondensatorach i transformatorach, smary czy plastyfikatory. Ze względu na właściwości tych związków, takie jak odporność na degradację chemiczną i długi okres półtrwania (od 3 do 40 lat), stanowią one trwałe zanieczyszczenia środowiska. Najwyższe ich ilości znajdują się w glebie, jednak można je oznaczyć również w powietrzu, osadach, wodzie, roślinach, a nawet organizmach żywych. Celem pracy była optymalizacja i walidacja metody oznaczania kongenerów PCB 10, 28, 138, 153 i 180 w glebie. W procesie optymalizacji metody, testowano trzy odczynniki do ekstrakcji oraz dwa rodzaje sorbentów do oczyszczania. Walidację przeprowadzono na dwóch poziomach wzbogacenia w celu określenia odzysku i precyzji metody. Zoptymalizowaną i zwalidowaną metodę zastosowano do analizy zawartości wybranych kongenerów PCB w próbkach rzeczywistych pobranych z terenu Podkarpacia. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że najlepszym odczynnikiem do ekstrakcji PCB z gleby jest heksan, zaś sorbentem do oczyszczania Florisil. Stężenie PCB 10, 28, 52, 138 i 153 w analizowanych próbkach rzeczywistych było poniżej granicy oznaczalności ( $LOQ < 0,005$  mg/kg). PCB 180 oznaczono na poziomie 0,007 mg/kg w glebie pobranej z terenu obok linii kolejowych w Gluchowie.*

**Słowa kluczowe:** polichlorowane bifenyly, gleba, zanieczyszczenia, optymalizacja, walidacja

**I. WSTĘP**

Polichlorowane bifenyly (PCB) to toksyczne związki aromatyczne obejmujące 209 kongenerów, których struktura chemiczna różni się pozycją oraz liczbą atomów chloru w pierścieniu. Związki te znalazły szerokie zastosowanie między innymi jako płyny dielektryczne w kondensatorach i transformatorach, płyny do przenoszenia ciepła, hydrauliczne, oleje smarowe, składniki pestycydów, lakieru epoksydowego, plastyfikatory do produkcji farb, klejów, uszczelniaczy i tworzyw sztucznych oraz jako dodatek w produkcji papierów w celu kopiowania bez kalki [Erickson i Kaley 2010, Vorkamp i in. 2016]. Zakaz ich stosowania w Polsce wprowadzono w wyniku wydania Rozporządzenia Ministra Gospodarki z dnia 24 czerwca 2002 roku, które dopuszczało wykorzystanie PCB do dnia 30 czerwca 2010 roku [Rozporządzenie Ministra Gospodarki 2002]. Pomimo wprowadzonego zakazu produkcji tych

związków, duża ich ilość znajduje się w prawie każdym elemencie globalnego ekosystemu na całym świecie.

Skażenie upraw rolniczych, flory i fauny na danym terenie wynika z dużej trwałości i kumulacji tych syntetycznych związków w glebie [Elabbas i in. 2013, Kumar i in. 2014, Kiani i in. 2023]. PCB głównie dostają się do organizmu człowieka drogą pokarmową np. poprzez spożycie tłuszczu zwierzęcych. PCB przyczynia się do rozwoju chorób przewlekłych takich jak: cukrzyca typu 2, dysfunkcje neurologiczne oraz choroby układu krążenia, otyłość [Kaw i Kannan 2016]. Toksyczne działanie tych ksenobiotyków wpływa również na niską masę urodzeniową u niemowląt oraz spadek rozwoju funkcji poznawczych [Jin i in. 2017].

Stosowanych jest wiele technik oznaczania PCB, w tym wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) (z detektorem UV, fluorescencyjnym (FLD) czy matrycą fotodiodową (DAD)), ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa (UPLC), chromatografia gazowa (GC) (wyposażona w detektor wychwyty elektronów (ECD) lub spektrometrii mas (MS)), powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Ramana (SERS) czy też powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR). Najpowszechniej stosowaną techniką instrumentalną jest jednak chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS) ze względu na możliwość jednoznacznej detekcji cząsteczek w złożonej matrycy oraz wysoką czułość metody [Moukas i in. 2014, Ahmad i in. 2019]. Przeprowadzono wiele badań mających na celu określenie zawartości PCB w środowisku, jednak nieliczne zostały wykonane na terenie Polski w celu zbadania stężeń tych aromatycznych związków w glebie.

Zważywszy na tak ogromny negatywny wpływ PCB na cały globalny ekosystem, podjęto badania, których celem była optymalizacja i walidacja metody oznaczania tych ksenobiotyków w glebie oraz ich analiza w próbkach pobranych z terenu Podkarpacia.

## II. METODYKA BADAŃ

Badania rozpoczęto od przeprowadzenia analizy chromatograficznej wzorca mieszaniny PCB w trybie pełnego skanowania (*full scan*) w celu określenia czasu retencji określonych kongenerów (PCB 10, 28, 52, 138, 153 i 180). Zastosowano parametry pracy chromatografu (model 7890A, Agilent Technologies, USA) takie jak: temperatura linii transferowej 280°C, temperatura dozownika 280°C, temperatura źródła jonów 300°C, temperatura kwadrupola 180°C, przepływ gazu 1 ml/min, program temperaturowy pieca: 120°C utrzymywane przez 2 min, wzrost 15°C/min do 280°C utrzymywane przez 5 min, wzrost 28°C/min do 320°C, utrzymywane przez 10 min [Wojtowicz i Jakubowicz 2019].

Kolejnym etapem badań było przeprowadzenie analizy w trybie monitorowania pojedynczych jonów (SIM) dla mieszaniny wzorców PCB o stężeniu 10 mg/kg. W tabeli 1 zestawiono monitorowane jony jakościowe oraz ilościowe badanych kongenerów PCB. W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej, ze wzorca analitycznego przygotowano 6 roztworów o stężeniach PCB w zakresie od 0,0006 mg/kg do 10 mg/kg PCB.

**Tabela 1 - Table 1**

Monitorowane jony PCB [m/z] / Monitored PCB ions [m/z]

Kongener / Congener	Jon ilościowy / Qualification ion	Jon jakościowy / Quantification ion
PCB 10	222	152,1
PCB 28	256	186
PCB 52	290	220
PCB 138	357,9	290
PCB 153	357,9	289,9
PCB 180	391,9	323,9

Proces optymalizacji metody polegał na dodaniu do próbek polipropylenowych o poj. 50 ml po 5 g gleby, 0,1 ml wzorca – mieszaniny PCB o stężeniu 10 mg/kg oraz 10 ml wody, a następnie 9,9 ml wybranego odczynnika do ekstrakcji: mieszaninę aceton:heksan (1:4, v/v) lub heksan lub eter naftowy. Na wytrząsarce mechanicznej typu vortex (Benchmark Scientific Inc., USA) mieszano zawartość próbek przez 1 min. Następnie dodano mieszaninę soli ekstrakcyjnych, w której skład wchodziło: 4 g siarczanu magnezu, 1 g chlorku sodu, 1 g dwuwodnego cytrynianu sodu i 0,5 g seskwihydratu cytrynianu sodu. Zawartość próbek wytrząsano przez 1 min i odwirowano (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Niemcy) przez 5 minut przy obrotach 5000 rpm, a następnie 5 ml ekstraktów przeniesiono do próbek polipropylenowej o poj. 15 ml zawierających sorbenty do oczyszczania i 900 mg siarczanu magnezu. Na etapie oczyszczania sprawdzono 2 rodzaje sorbentów: PSA (150 mg) oraz Florisil (1 g). Zawartość próbek wytrząsano przez 1 min i odwirowano przez 5 min przy obrotach wirówki 5000 rpm. Oczyszczone ekstrakty przeniesiono do fiolek chromatograficznych.

Walidację przeprowadzono stosując zoptymalizowaną metodę przygotowania próbek tzn. ekstrakcję heksanem i oczyszczanie poprzez dyspersyjną ekstrakcję do fazy stałej (dSPE) z użyciem Florisilu. Próbkę gleby poddano procesowi fortyfikacji na poziomie 0,005 mg/kg i 1 mg/kg. Analizy wykonano w 3 powtórzeniach. Średni odzysk oraz precyzję obliczono dla każdego poziomu wzbogacenia. Jako granicę oznaczalności (LOQ) przyjęto najniższy poziom wzbogacenia, dla którego odzysk i precyzja były poprawne.

Zoptymalizowana i zwalidowana metoda została zastosowana do analizy PCB w 13 próbkach gleby pobranych z terenu Podkarpacia. W tabeli 2 przedstawiono próbki rzeczywiste wraz z miejscem ich pochodzenia.

**Tabela 2 - Table 2**

Próbki rzeczywiste / *Real samples*

Nr próbki <i>Sample number</i>	Miejsce pobrania / <i>Sampling place</i>
1	Słup energetyczny 100 k700 – Giedlarowa / <i>Utility pole 100 k700 – Giedlarowa</i>
2	Wiatrak – Głuchów / <i>Wind turbine – Głuchów</i>
3	Wiatrak 2 – Głuchów / <i>Wind turbine 2 – Głuchów</i>
4	Tory kolejowe 1 – Głuchów / <i>Railroad tracks 1 – Głuchów</i>
5	Tory kolejowe 2 – Głuchów / <i>Railroad tracks 2 – Głuchów</i>
6	Tory kolejowe – Krzemienica / <i>Railroad tracks – Krzemienica</i>
7	Słup energetyczny 75 – Giedlarowa / <i>Utility pole 75 – Giedlarowa</i>
8	Wiatrak złącze – Głuchów / <i>Windmill connector – Głuchów</i>
9	Słup energetyczny – Biedaczów / <i>Utility pole – Biedaczów</i>
10	Transformator – Biedaczów / <i>Electric transformer – Biedaczów</i>
11	Rozdzielnia prądu – Krzemienica / <i>Electric power distribution – Krzemienica</i>
12	Ogród / <i>Garden</i>
13	Szklarnia ogrodowa / <i>Greenhouse</i>

### III. WYNIKI I DYSKUSJA

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że najlepszym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji PCB 10, 28, 138, 153 i 180 był heksan, zaś sorbentem stosowanym do

oczyszczania Florisil. Średni odzysk dla wszystkich kongenerów PCB wyniósł 95,7%, a precyzja 4,2%. Szczegółowe dane przedstawia tabela 3.

**Tabela 3 - Table 3**

Średnie odzyski dla kongenerów PCB / *Average recoveries for PCB congeners*

Poziom wzbogacenia Fortification level	PCB 10	PCB 28	PCB 52	PCB 138	PCB 153	PCB 180
0,005 mg/kg	89,5±2,3	98,6±2,4	84,2±2,3	87,7±2,1	99,4±1,7	94,1±4,2
1 mg/kg	61,0±1,4	74,4±0,3	81,8±0,5	79,8±0,5	92,9±0,5	92,4±0,3

Po zastosowaniu innych układów odczynników i sorbentów, otrzymano odzyski w zakresie 108,5-160,5% oraz precyzję od 4,2% do 55,8%.

13 próbek rzeczywistych pobranych z terenu Podkarpacia zostało poddanych badaniu przy zastosowaniu zoptymalizowanej metody. Zawartość kongenerów PCB jak: 10, 28, 52, 138 i 153 była poniżej LOQ (< 0,005 mg/kg) we wszystkich próbkach rzeczywistych. Stężenie PCB 180, powyżej LOQ, zostało oznaczone jedynie w glebie pochodzącej z terenu torów kolejowych w Głuchowie i wynosiło ono 0,007 mg/kg. Wartość ta nie przekracza dopuszczalnego poziomu określonego w Rozporządzeniu Ministra Środowiska (Dz.U. 2016 poz. 1395), który wynosi od 0,02 mg/kg do 2 mg/kg w zależności od rodzaju gruntów [Rozporządzenie 2016].

Inni autorzy, którzy badali zawartość PCB w próbkach gleby pobranej z terenu południowo-wschodniej Polski zanieczyszczonej olejem transformatorowym, wykazali największe stężenie PCB 52 (2,82 mg/kg s.m) oraz PCB 28 – 1,49 mg/kg s.m. [Wojtowicz i Jakubowicz 2019]. Próbki pobrane w Kapsztadzie zawierały PCB 180, którego stężenie było równe 0,142 mg/kg, co świadczy o znacznym zanieczyszczeniu tamtych terenów [Olatunji 2019]. Analiza wykonana w województwie zachodniopomorskim w Polsce wykazała obecność tych syntetycznych związków w glebie pobranej z pól uprawnych w zakresie od 0,0002 mg/kg do 0,0005 mg/kg [Witczak i Abdel-Gawada 2012].

Do środowiska zostało przeniesione 80% rocznej produkcji PCB w wyniku procesów parowania, wycieków, spopielenia i niewłaściwego przechowywania odpadów na wysypiskach śmieci. Zważywszy na długi okres półtrwania oraz odporność na rozkład, związki te są kumulowane w środowisku w osadach oraz glebie [Starek 2001]. Przewidywanie losów PCB jest możliwe zważywszy na wartość współczynnika podziału oktanol - woda ( $\log K_{ow}$ ). Wartość  $\log K_{ow}$  powyżej 6 wskazuje na tendencję do kumulacji tych ksenobiotyków w glebie [Aken i in. 2009].

#### IV. PODSUMOWANIE

PCB to związki syntetyczne, których dystrybucja została zakazana w Polsce w roku 2010. Jednak są one nadal wykrywane na całym świecie ze względu na długi okres półtrwania oraz odporność na degradację. Ze względu na toksyczny wpływ na środowisko oraz zdrowie człowieka istnieje potrzeba skutecznego wykrywania tych związków. Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, że najlepszą metodą przygotowania próbki do badania jest ekstrakcja heksanem oraz oczyszczanie metodą dSPE przy zastosowaniu Florisilu. Metoda ta jest skuteczna do oznaczania PCB w próbkach gleby. Średni odzysk dla wszystkich kongenerów PCB wyniósł 95,7%, natomiast precyzja 4,2%. W próbkach

gleby pobranych z terenu Podkarpacia nie wykryto PCB, z wyjątkiem jednej próbki, w której oznaczono PCB 180 na poziomie LOQ zoptymalizowanej metody.

Informacja o finansowaniu badań: *Dofinansowano ze środków Ministra Nauki w ramach Programu „Regionalna inicjatywa doskonałości”. Umowa nr RID/SP/0010/2024/1.*

#### BIBLIOGRAFIA

1. Ahmad I., Weng J., Stromberg A.J., Hilt J.Z., Dziubla T. 2019. Fluorescence Based Detection of Poly Chlorinated Biphenyls (PCBs) in Water Using Hydrophobic Interaction. *The Analyst*. 144(2). 677-684. DOI:10.1039/c8an00867a.
2. Aken B.V., Correa P. A., Schnoor J. L. 2010. Phytoremediation of Polychlorinated Biphenyls: New Trends and Promises†. *Environmental Science & Technology*. 44(8). 2767-2776. DOI:10.1021/es902514d.
3. Elabbas L.E., Westerholm E., Roos R., Halldin K., Korkalainen M., Viluksela M., Håkansson H. 2013. Non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (NDL-PCBs) in foods: exposure and health hazards. *Persistent Organic Pollutants and Toxic Metals in Foods*. 215-260. DOI:10.1533/9780857098917.2.215.
4. Erickson M.D., Kaley R.G. 2010. Applications of polychlorinated biphenyls. *Environmental Science and Pollution Research*. 18(2). 135-151. DOI:10.1007/s11356-010-0392-1.
5. Jin W., Otake M., Eguchi A., Sakurai K., Nakaoka H., Watanabe M., Mori C. 2017. Dietary Habits and Cooking Methods Could Reduce Avoidable Exposure to PCBs in Maternal and Cord Sera. *Scientific Reports*. 7(1). DOI:10.1038/s41598-017-17656-9.
6. Kaw H.Y., Kannan N. 2016. A Review on Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in South Asia with a Focus on Malaysia. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 242. 153-181. DOI:10.1007/398\_2016\_14.
7. Kiani A., Arabameri M., Shariatifar N., Mehraie A., Tooryan F., Ghanbariasad A., Shahsavari S. 2023. Analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs) in dairy products by modified QuEChERS/GC-QqQ-MS/MS method: A risk assessment study. *Food Sci Nutr*. 10.11(6). 2895-2906. DOI: 10.1002/fsn3.3269.
8. Kumar B., Verma V.K., Singh S.K., Kumar S., Sharma C.S., Akolkar A.B. 2014. Polychlorinated biphenyls in residential soils and their health risk and hazard in an industrial city in India. *Journal of Public Health Research*. 3(2). DOI:10.4081/jphr.2014.252.
9. Moukas A.I., Thomaidis N.S., Calokerinos A.C. 2014. Determination of polychlorinated biphenyls by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 49(11). 1096-1107. DOI:10.1002/jms.3427.
10. Olatunji O.S. 2019. Evaluation of selected polychlorinated biphenyls (PCBs) congeners and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) in fresh root and leafy vegetables using GC-MS. *Scientific Reports*. 9(1). 538. DOI:10.1038/s41598-018-36996-8.
11. Rozporządzenie Ministra Gospodarki z dnia 24 czerwca 2002 r. w sprawie wymagań w zakresie wykorzystywania i przemieszczania substancji stwarzających szczególne zagrożenie dla środowiska oraz wykorzystywania i oczyszczania instalacji lub urządzeń, w których były lub są wykorzystywane substancje stwarzające szczególne zagrożenie dla środowiska. *Dz.U.* 2002 nr 96 poz. 860. [dok. elektr.

- <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/download.xsp/WDU20020960860/O/D20020860.pdf>  
data wejścia 24.06.2024].
12. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi. Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej 2016, Poz. 1395. [dok. elektr. <http://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/download.xsp/WDU20160001395/O/D20161395.pdf> data wejścia 24.06.2024].
  13. Starek A. 2001. Polichlorowane bifenyly - toksykologia – ryzyko zdrowotne. Roczniki Państwowego Zakładu Higieny. 52(3). 187-201.
  14. Vorkamp K., Odsbjerg L., Langeland M., Mayer P. 2016. Utilizing the partitioning properties of silicone for the passive sampling of polychlorinated biphenyls (PCBs) in indoor air. Chemosphere. 160. 280-286. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.06.054.
  15. Witczak A., Abdel-Gawad H. 2012. Comparison of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls residues in vegetables, grain and soil from organic and conventional farming in Poland. Journal of Environmental Science and Health. Part B. 47(4). 343-354. DOI:10.1080/03601234.2012.646173.
  16. Wojtowicz K., Jakubowicz P. 2019. Opracowanie metodyki oznaczania polichlorowanych bifenyli w próbkach gleb. Nafta-Gaz. 75. 420-429. DOI: 10.18668/NG.2019.07.06.

## **OPTIMIZATION AND VALIDATION OF THE METHODS FOR THE DETERMINATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN SOIL**

### Summary

*Polychlorinated biphenyls (PCBs) are synthetic aromatic compounds produced in large quantities around the world since the 1930s, the synthesis of which was banned in the 1970s. These compounds were widely used, among others, as dielectric fluids in capacitors and transformers, grease and plasticizers. Due to the properties of these compounds, such as resistance to chemical degradation and long half-life (from 3 to 40 years), they constitute persistent environmental pollutants. The highest amounts are found in the soil, but they can also be determined in the air, sediments, water, plants and even living organisms. The aim of the work was to optimize and validate the method for determining PCB congeners 10, 28, 138, 153 and 180 in soil. As part of the method optimization, three extraction reagents and two types of purification sorbents were tested. Validation was performed at two fortification levels to determine the recovery and precision of the method. The optimized and validated method was used to analyze the content of selected PCB congeners in real samples collected from the Podkarpackie region. Based on the conducted research, it was shown that the best reagent for the extraction of PCBs from soil is hexane, and the best sorbent for purification is Florisil. The concentration of PCB 10, 28, 52, 138 and 153 in the analyzed real samples was below the limit of quantification (LOQ < 0.005 mg/kg). PCB 180 was determined at a level of 0.007 mg/kg in soil taken from the area next to the railway lines in Głuchów.*

**Keywords:** polychlorinated biphenyls, soil, pollution, optimization, validation