

اعتبارسنجی و بکارگیری یک روش آنالیز جهت اندازه گیری میزان آلاینده‌های آلی پایدار در نمونه‌های ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) جمع‌آوری شده از بازار تهران

میترا بیات^۱، محمد صابر تهرانی^۱، فرزاد کبارفرد^{۲*}، سید واقف حسین^۱، حسن یزدان‌پناه^۳

*farzadkf@yahoo.com

۱- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- گروه سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۸

چکیده

آلاینده‌های آلی پایدار گروه وسیعی از ترکیبات سمی و خطرناک می‌باشند که در برابر تجزیه شیمیایی، فیزیکی و حتی پرتوها مقاوم هستند. در این تحقیق یک روش آنالیز همزمان برای شناسایی و تعیین مقدار ۱۸ آلاینده آلی پایدار شامل هفت ترکیب PCBs، ایزومرهای شماره ۱۸۰، ۱۸۱، ۱۱۸، ۱۰۱، ۳۸، ۵۲، ۲۸ به عنوان شاخص‌های آلودگی بی‌فنیل‌های پلی‌کلره و یازده آفتکش آلی کلره (OCPs) شامل هگزا کلروبنزن (Hexachlorobenzene)، متوكسی کلر (Methoxychlor)، دی‌آلدرين (Dieldrin)، دوت و متabolیت‌های آن (DDTs: *o,p*'-DDE, *p,p*'-DDE, *o,p*'-DDT, *p,p*'-DDT) و تعدادی از سیکلو دی‌انهای (Σ Cyclodiene) شامل آلفا و بتا-اندوسلوفان (α -, β -Endosulfan), آلفا و گاما- کلرдан (α -, γ -Chlordane)، بررسی و مقدار آن در ماهی قزل آلا رنگین کمان با روش استخراج مایع- مایع و دستگاه کروماتوگرافی گازی طیف سنجی جرمی- متوالی (GC-MS/MS) و روش پایش MRM اندازه گیری شد. نتایج اعتبارسنجی نشان داد که منحنی کالیبراسیون ۱۸ آلاینده آلی پایدار مورد مطالعه در سطوح غلظتی ۰/۱-۳۰ ng/mL برای PCBs و OCPs و ۰/۱۵۰ ng/mL برای PCBs، خطی بوده است و ضریب همبستگی (r^2) در محدوده ۰/۹۹۰-۰/۹۹۹ قرار داشت. مقادیر حد تشخیص و حد تعیین مقدار آلتیت‌های مورد مطالعه بترتیب ۰/۶-۰/۳ ng/g و ۰/۶-۰/۳ ng/g بdst آمد. میانگین میزان بازیافت و میزان تکرارپذیری روش در ۵ سطح آلوده مختلف (برای OCPs: ۰/۱۰۰ ng/g و برای PCBs: ۰/۲۰ ng/g) بترتیب ۱۱۲٪-۱۱۴٪ و ۷۳٪-۷۷٪ محسوب شد. دامنه مقادیر عدم قطعیت ۰/۳۰-۰/۸۸٪-۰/۷۷٪ محسوب شد. نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان دهنده حضور ترکیبات آلی کلره در ماهیان مورد بررسی می‌باشد، بدین ترتیب که بیشترین میزان آلودگی مربوط به *p,p*'-DDT با مقدار میانگین ۰/۱۱۳ weight (ng/g ww) در مراتب بعدی آلودگی قرار داشتند. بررسی دیگر سوم آلی کلره مورد مطالعه در نمونه‌های ماهی نشان دهنده حضور برخی از این ترکیبات مانند α -Chlordane، γ -Chlordane، α,p '-DDE، o,p '-DDT و HCB بود که مقادیر بدست آمده در نمونه‌ها پایین تر از حدود تعیین مقدار روش، بود. با توجه به مقادیر بدست آمده، میزان آلودگی به سوم آلی کلره پایین تر از حداقل مقادیر مجاز مصوب SANTE/۱۱۸۱۳،۲۰۱۷ محسوب شد. قانون اتحادیه اروپا قرار داشت. همچنین بررسی بی‌فنیل‌های پلی‌کلره شاخص مورد مطالعه در نمونه‌های ماهی، نشان دهنده حضور تنها PCB-۲۸ بود که مقدار آن پایین تر از حداقل مقادیر مجاز مصوب EU/۶۴۴،۰۱۷ محسوب شد.

واژگان کلیدی: آلاینده‌های آلی پایدار، آفتکش‌های آلی کلره، بی‌فنیل‌های پلی‌کلره، ماهی قزل آلا رنگین کمان، دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی متوالی

*نویسنده مسئول

مقدمه

طبق تعریف سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحده (فائو)^{۱۱}، ترکیبی که بتواند هر نوع آفت را از بین ببرد یا از آن جلوگیری کند، آفتکش نامیده می‌شود (WHO, 2003 ; FAO, 2003).

آفت کش ها مواد شیمیایی هستند که آگاهانه توسط انسان وارد مواد غذایی می‌شوند و به دلیل پایداری زیاد پس از مصرف، در بافت‌های انسانی و حیوانی تجمع می‌یابند و سبب ایجاد بیماری‌های فراوانی از جمله سرطان و انواع تومورها می‌شوند (Navaro *et al.*, 2007).

بی‌فنیل‌های پلی‌کلره در چند دهه اخیر در حجم بسیار زیادی تولید شده‌اند و به دلیل خصوصیات فیزیکی و شیمیایی منحصر‌بفرد به عنوان دی‌الکتریک در خازن‌ها، مایعات هیدرولیک، روغن ترانسفورماتورها، مواد پوشش دهنده سطح، چسب‌ها و رنگ‌ها در صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرند (Cok and Satiroglu, 2004).

با طور تجاری این ترکیبات از کلرینه نمودن بی‌فنیل‌ها تولید می‌شوند که مخلوط ایزومرهای چندگانه با درجه متفاوت از کلر هستند (Borja *et al.*, 2005).

از آنجایی که ترکیبات PCB مقاومت بالایی نسبت به تجزیه دارند، در خاک و آب برای سالهای زیادی باقی می‌مانند (Wenhai *et al.*, 2005).

شایان ذکر است، کشور ما عضو کنوانسیون استکھلم بوده و متعهد است تا سال ۲۰۲۵ نسبت به امضاء بی‌فنیل‌های پلی‌کلره، اقدام نماید (Porta, 2001; UN, 2001; UNEP, 2004).

روش دستگاهی مورد استفاده در تحقیقات علمی برای بالا بردن صحت و دقت روش بسیار حائز اهمیت است. از سوی دیگر، سوموم ارگانوکلره و فنیل‌های پلی‌کلره دارای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کاملاً متفاوت هستند و تفاوت‌های زیادی در قطبیت، فراریت و پایداری در مقابل تجزیه شدن از خود نشان می‌دهند. طبق گزارش‌های موجود، مقدار سوموم ارگانوکلره فعال مورد استفاده در کشورهای مختلف بیش از هزار عدد می‌باشد که با احتساب متابولیت‌های آنها این عدد به چندین هزار خواهد رسید (Carlo and Yolanda, 2007).

فنیل‌های پلی‌کلره به دلیل تنوع استخلاف دارای ایزومرهای مختلف می‌باشد. بنابراین، شناسایی این مواد در ماتریکس‌های پیچیده‌ای مانند مواد غذایی بخصوص ماتریکس‌های چرب نیازمند یک روش جداسازی و دستگاههای دقیق جهت شناسایی و تعیین مقدار آنالیت‌های مورد آنالیز در غلظت‌های بسیار کم می‌باشد. نتیجه آنالیز این آلاینده‌ها باید سریع، ساده، دقیق و انتخابی باشد و در ضمن، قابل کاربرد در ماتریکس‌های

انتشار مواد شیمیایی سمی به محیط زیست، سلامت انسان و جانوران های مختلف را به مخاطره انداخته است (Dip *et al.*, 2003).

آلاینده‌های آلی پایدار (POPs)^۱ به دلیل پراکندگی و آلودگی محیط زیستی، موجب نگرانی‌های بسیاری در ارتباط با سلامت عمومی هستند و محدودیت‌های بسیاری در استفاده از این ترکیبات در بیشتر کشورها ایجاد گردیده است اما کاربرد وسیع آنها در حال حاضر در صنایع مختلف از جمله کشاورزی Guruge and Tanabe, 2001; Minh *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007

آلاینده‌های آلی پایدار گروه بسیار متنوع و متفاوتی از مواد شیمیایی انسان ساخت را دربرمی‌گیرد. چندین گروه از این مواد شناخته شده‌اند و نگرانی زیادی در مورد سمیت این ترکیبات به عنوان مواد خطرناک و آلوده‌کننده محیط زیست وجود دارد. دی‌بنزو دی‌اکسین‌های پلی‌کلره^۲ (PCDDs)، دی‌بنزوفروران‌های پلی‌کلره^۳ (PCDFs)، هیدرو کربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای^۴ (PAHs)، دی‌فنیل‌های پلی‌کلره^۵ (PBDEs)، بی‌فنیل‌های پلی‌کلره^۶ (PCBs)، آفتکش‌های آلی کلره^۷ (OCPs) شامل هگزا کلرو بنزن، هگزا کلرو سیکلولوهگزان و ایزومرهای آن (alfa، بتا و گاما)، ددت و متابولیت‌های آن، حشره‌کش‌های سیکلودین (آلدرين، دی آلدرين، کلردان، آندوسولفان و ...)، توکسافون^۸، هپتاکلر^۹ و میرکس^{۱۰}، از جمله این ترکیبات می‌باشند (Fu and Wu, 2005).

۱۳۸۸ آلاینده‌های آلی پایدار در برابر تجزیه نوری، بیولوژیک و شیمیایی بسیار مقاوم می‌باشند و خصوصیاتی نظیر چربی دوستی بالا و ماندگاری طولانی مدت آنها در محیط زیست، منجر به تجمع زیستی این ترکیبات در بافت‌های چربی موجودات زنده می‌شود که در نتیجه ماندگاری آنها در طول زنجیره غذایی افزایش می‌یابد و خطرات جبران‌ناپذیری برای سلامتی انسان و سایر اکوسیستم‌های گیاهی و جانوری ایجاد می‌نماید (Perugini *et al.*, 2004; Naso *et al.*, 2005).

دو گروه از مهمترین این ترکیبات می‌باشند.

¹ Persistent organic pollutants

² Polychlorinated dibenzo-dioxins

³ Polychlorinated dibenzo-furans

⁴ Polyaromatic hydrocarbons

⁵ Polybrominated diphenyl ethers

⁶ Polychlorinated biphenyls

⁷ Organochlorine Pesticides

⁸ Toxaphene

⁹ Heptachlor

¹⁰ Mirex

¹¹ Food and Agriculture Organization (FAO)

مواد و روش کار

نمونه برداری ماهی

تعداد ۷۴ نمونه ماهی در مدت زمان دو سال (آبان ۹۵ لغایت آبان ۹۷) از مغازه های خرده فروشی شیلات و فروشگاه های سطح شهر تهران جمع آوری گردیدند. پس از جمع آوری، نمونه های ماهی در دمای ۲۰-۲۰ درجه سانتی گراد در فریزر نگهداری شدند. جهت انجام آزمایش ها و آنالیز، نمونه ها پس از خروج از فریزر به صورت فیله در آمدند و سایر اجزاء آن شامل سر، دم، پوست و استخوان های ماهی دور ریخته شدند. سپس فیله ها به داخل دستگاه آسیاب آشپزخانه های منتقل شدند و به شکل خمیری در آمدند و در نهایت در ظروف شیشه ای مناسب بسته بندی و دوباره به فریزر منتقل گردیدند.

مواد مورد نیاز

حالهای سیکلوهگزان، استن، نرمال هگزان، دی کلرومتان، ایزوواکتان و مواد شیمیایی کلرید سدیم، سولفات منیزیم و سیلیکا از شرکت مرک^۱ خریداری شد. بی فیل های پلی کلره به صورت یک آمپول مخلوط از ۷ با شماره های ۲۸-۵۲-۲۸-۱۰۱-۱۱۸-۱۳۸-۱۵۳ و ۱۸۰ با غلظت ۰/۰۱ میلی گرم در میلی لیتر و حجم ۱ میلی لیتر و استاندارد داخلی آنها نیز به صورت یک آمپول مخلوط از هفت ^{۱۳}C-PCBs با غلظت ۰/۰۰۵ mg/mL و حجم ۱ میلی لیتر از کمپانی Wellington و آفت کش های آلی کلره شامل ۱۱ ترکیب (هگزا کلروبنزن، متوكسی کلر، دی آلدرين، ددت و متابولیت های آن (-o,p-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDT, p,p'-DDT)، آلفا و بتا-اندو سولفان، آلفا و گاما- کلردان)، هر کدام یک آمپول یک میلی لیتری با غلظت ۰/۱ mg/mL و دو آمپول جداگانه (-p,p'-D8-D8 و DDE-D8) با غلظت ۰/۱ mg/mL و حجم ۱ میلی لیتر از کمپانی Chiron^۲ خریداری شد و به عنوان استاندارد داخلی مورد استفاده قرار گرفت.

تجهیزات مورد نیاز

دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل 7890A با دتکتور طیف سنج جرمی متواتی (GC-MS/MS) مجهز به یونساز با تکنیک EI و آنالیزور جرمی Triple Quadropole همراه با اتوسیمپلر مدل 7693 از شرکت آمریکایی Agilent مورد استفاده قرار گرفت. ستون نصب شده بر روی دستگاه، ستون موبینه-HP (طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر، ضخامت فاز ۵MS (5% phenyl-methylpolysiloxane)

^۱ Merck

^۲ Campro Scientific

۱۴۹

مختلف نیز باشد تا بتوان به سهولت و در کمترین زمان اطلاعات دقیقی درباره پایش، ارزیابی خطر و کیفیت مواد غذایی بدست آورد. روش های استخراج متعددی برای شناسایی و تعیین مقدار آلاینده های آلی پایدار در غذای انسان وجود دارد (Voorspoels *et al.*, 2004; Covaci *et al.*, 2005) استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی متواتی (GC-MS/MS^۳) انتخاب مناسبی جهت تحقق تمامی موارد مذکور می باشد. با استفاده از این دستگاه می توان چندین نوع آلاینده از کلاسهای مختلف را به طور همزمان و با بهره گیری از روش های Multiresidue و تکنیک های پایش Carlo and Yolanda, 2007 یونها مانند^۴ MRM یا^۵ SIM اندازه گیری نمود (.

غذاهای دریابی از جمله ماهی به عنوان یکی از کالاهای مهم در سبد غذایی مردم جامعه می باشد. هر ایرانی با مصرف روزانه ۶ گرم (g/day)، (انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی ایران، ۱۳۸۳-۸۵؛ کلانتری و غفاری پور، ۱۳۷۹-۸۱) از غذاهای دریابی بهره می برد و با توجه به نیاز انسان به این کالای غذایی به عنوان گوشت سفید حاوی منابع امگا ۳ و ویتامین D باقیستی سلامت این ماده غذایی بررسی گردد (کرمی، ۱۳۹۷). بافت های ماهی به عنوان یک منبع مناسب دارای میزان چربی بالا (۳٪)، محیط مناسبی جهت تجمع آلاینده های آلی موجود در محیط های آبی مانند رودخانه ها می باشد (Brown *et al.*, 1987). به دلایل مذکور و اینکه ایران یکی از بزرگترین تولید کننده ماهی قزل آلا در دنیاست (خدانظری، ۱۳۹۷) و این ماهی بیشتر از سایر محصولات دریابی مورد مصرف جامعه می باشد، ماهی قزل آلا به عنوان ماده غذایی مورد مطالعه از نظر آسودگی به آلاینده های آلی پایدار (OCPs, PCBs) انتخاب شد.

هدف از انجام این تحقیق، تکوین و اعتبار سنجی یک روش آنالیز معتبر جهت اندازه گیری میزان سوم آلی کلره و بی فیل های پلی کلره در ماهی قزل آلا می باشد. در مطالعه حاضر با کمک دستگاه GC-MS و روش پایش MRM و روش استخراج مایع- مایع (LLE^۶، روش مناسب، سریع، آسان، ارزان و دقیق برای آنالیز همزمان ۱۱ OCPs و ۷ PCBs ماهی قزل آلا رای رنگین کمان بازار تهران بکار گرفته شد.

^۱ Gas chromatography –Tandem mass spectrometry

^۲ Multiple reaction monitoring

^۳ Selected ion monitoring

^۴ Liquid-liquid extraction

گردید. دمای محفظه تزریق ۳۰۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. خروجی کروماتوگرافی گازی به صورت گاز حاوی آنالیتها و حلال می باشد که پس از ورود به اتاق یونساز توسط روش برخورد الکترونی (EI) یونیزه می شود و به سمت آنالیزور جرمی هدایت می گردد. مقدار انرژی یونیزاسیون جهت یونیزه کردن یون ها ۷۰ الکترون ولت در نظر گرفته شد. همچنان دمای محفظه یونیزاسیون و آنالیزورهای جرمی بترتیب ۲۴۰ و ۱۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

آنالیز جرمی بکار رفته در دستگاه GC-MS مورد استفاده در این تحقیق آنالیزور جرمی چهار قطبی سه گانه^۴ می باشد. این آنالیزور با داشتن محدوده خطی مطلوب در آنالیز کمی آنالیتها، محدوده جرمی مناسب، به عنوان یک فیلتر جرمی به صورت سیستم های پایش Full scan ، SIM و سایر پایش های اختصاصی تر مانند MRM استفاده گردید. در روش پایش MRM از قسمت میانی آنالیزور جرمی چهار قطبی سه گانه یا همان سلول تصادم^۵ به عنوان محلی جهت شکستن یون های موردنظر و بدست آوردن قطعات یونی مناسب (فرگمنت) آنها در انرژی های بهینه شده (۳۵-۱۰ ev^۶) استفاده گردید. از گاز های نیتروژن به عنوان گاز فرگمنته کننده و هلیوم به عنوان گاز خنک کننده با سرعت ثابت ۱ mL/min استفاده شد

معتبر سازی روش آنالیز

جهت شناسایی آنالیتها و به منظور تشخیص زمان بازداری و یون های شاخص (یون تعیین مقدار و یونهای تاییدی) هر آلاینده، ابتدا محلول های استانداردهای ۱۱ آفت کش آلی کلره (غلظت ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر)، ۷ بی فنیل چند کلره (غلظت $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^۱) و استاندارد داخلی $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs^۷ p,p' -DDT-D8 (غلظت $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^{۰/۵}) و استانداردهای داخلی (جدول ۱).

ثابت ۰/۲۵ میکرومتر) بود. تجهیزات دیگری مانند ترازوی دیجیتال با دقت ۱/۰ میلی گرم، آسیاب آشپزخانه ای، دستگاه تبخیر Turbovap II، سانتریفیوژ، همز، سونیکاتور، میکروویپت در اندازه های مختلف، ستون کروماتوگرافی شیشه ای، لوله فالکون، گاز ازت و هلیوم با خلوص بالا (۹۹/۹۹۹٪) در این پروژه مورد استفاده قرار گرفت.

معتبر سازی روش آنالیز و آماده سازی نمونه **GC-MS**: به منظور آنالیز هر OCPs، ۷ PCBs^۱ و تهییه کروماتوگرام و طیف جرمی برای مشخص کردن یون های شاخص (یون تاییدی و یون تعیین مقدار^۱) (کبارفرد و عمیدی، ۱۳۸۷)، برنامه دمایی با در نظر گرفتن نقطه جوش حلال و تحمل دمایی ستون طراحی شد. به این صورت که دمای ابتدای ستون ۶۰ درجه سانتی گراد انتخاب و به مدت ۲ دقیقه ستون در این دما نگهداری شد، سپس با سرعت ۲۰ درجه سانتی گراد در دقیقه، ستون به دمای ۱۲۰ درجه رسید و سپس با سرعت ۱۰ درجه سانتی گراد در دقیقه به دمای ۲۶۰ درجه سانتی گراد و در نهایت با سرعت ۲۵ درجه سانتی گراد در دقیقه به دمای ۳۰۰ درجه سانتی گراد رسید و ۵ دقیقه در این دما نگهداری شد. کل برنامه دمایی به مدت ۲۵/۶ دقیقه (run time) محاسبه گردید. اولین پیک نمایش داده شده در کروماتوگرام مربوط به HCB (دقیقه ۱۵/۶) و آخرین پیک مربوط به PCB-۱۸۰ به دقیقه (۲۲/۲) می باشد. بدین ترتیب کلیه ۱۸ آلاینده آلی پایدار مورد مطالعه در مدت حدود ۷ دقیقه جداسازی گردیدند. در برنامه طراحی شده برای این آنالیز سرعت حرکت فاز متحرک (گاز هلیوم) از اهمیت بسیاری برخوردار است. برای این منظور برنامه فشار گاز متحرک هلیوم مناسب با برنامه دمایی طراحی گردید. بدین ترتیب، در ابتدای فشار گاز psi^7 به مدت یک دقیقه ثابت نگهداشته شد. سپس با سرعت ۱۰ psi/min به فشار $1/5 \text{ psi}$ و سپس با سرعت ۱ psi/min به فشار $9/6 \text{ psi}^8$ و در ادامه با سرعت ۱ psi/min به فشار $11/2 \text{ psi}^9$ رسانده شد و در این فشار به مدت ۵ دقیقه نگهداری گردید. در این راستا با توجه به لزوم آنالیز نمونه هایی که احتمالاً حاوی مقادیر بسیار پایینی از آنالیتها بودند و با در نظر گرفتن حداکثر مجاز این ترکیبات در ماهی قزل آلا، تزریق در حالت splitless و با لاپتر مناسب^۳ انجام

⁴ Triple Quadrupole

⁵ Collision cell

⁶ Electron volt

⁷ Atomic mass unit

¹ Qualifier and quantifier ions

² Pound-force per square inch (unit of pressure)

³ Splitless and split mode used for dilute and concentrated solutions respectively

جدول ۱: یونهای شاخص و تعیین مقدار شناسایی شده برای ۱۸ آلاینده آلی پایدار (OCPs و PCBs) و استانداردهای داخلی آنها

Table 1: Qualifier and quantifier ions used for 18 POPs (11 OCPs and 7 PCBs) and their IS

ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	یون مادر	یون های محصول (یون تأییدی، یون تعیین مقدار)	انرژی تفکیک (الکترون ولت)
HCB	۱۵/۶	۲۸۵	۲۴۹,۲۱۴	۱۶,۱۵
α -Chlordane	۱۹/۵	۴۱۰	۲۶۶,۳۰۱	۲۸,۱۵
γ -Chlordane	۱۹/۳	۴۱۰	۲۶۶,۳۰۱	۲۸,۱۵
Dieldrin	۱۹/۹	۳۸۰	۱۹۳,۲۲۸	۳۰,۲۴
o,p'-DDE	۱۹/۳	۳۱۸	۱۷۶,۲۴۸	۲۸,۱۵
p,p'-DDE	۱۹/۸	۳۱۸	۱۷۶,۲۴۸	۲۸,۱۵
o,p'-DDT	۲۰/۵	۳۵۴	۱۶۵,۱۹۹	۳۰,۱۵
p,p'-DDT	۲۱	۳۵۴	۱۶۵,۱۹۹	۳۰,۱۵
α -Endosulfan	۱۹/۵	۴۰۶	۲۰۶,۱۵۹	۱۵,۱۰
β -Endosulfan	۲۰/۴	۴۰۶	۲۰۶,۱۶۰	۱۳,۱۰
Methoxychlor	۲۱/۸	۳۴۵	۱۴۱,۱۶۹	۳۰,۳۵
PCB ۲۸	۱۷/۱	۲۵۶,۲۵۸*	۱۸۶	۳۰
PCB ۵۲	۱۷/۷	۲۹۰,۲۹۲*	۲۲۰	۳۰
PCB ۱۰۱	۱۹/۳	۳۲۶,۳۲۸*	۲۵۶	۳۵
PCB ۱۱۸	۲۰/۳	۳۲۶,۳۲۸*	۲۵۶	۳۵
PCB ۱۵۳	۲۰/۷	۳۶۰,۳۶۲*	۲۹۰	۳۰
PCB ۱۳۸	۲۱/۱	۳۶۰,۳۶۲*	۲۹۰	۳۰
PCB ۱۸۰	۲۲/۱	۳۹۴,۳۹۶*	۲۲۴	۳۵
p,p'-DDE-D8	۱۹/۸	۳۲۶	۱۸۴,۰۵۶	۲۸,۱۵
p,p'-DDT-D8	۲۱	۳۶۲	۱۷۳,۰۲۷	۳۰,۱۵
^{13}C -PCB ۲۸	۱۷/۱	۲۶۸,۲۷۰*	۱۹۸	۳۰
^{13}C -PCB ۵۲	۱۷/۷	۳۰۲,۳۰۴*	۲۳۲	۳۰
^{13}C -PCB ۱۰۱	۱۹/۳	۳۳۸,۳۴۰*	۲۶۸	۳۵
^{13}C -PCB ۱۱۸	۲۰/۳	۳۳۸,۳۴۰*	۲۶۸	۳۵
^{13}C -PCB ۱۵۳	۲۰/۷	۳۷۲,۳۷۴*	۳۰۲	۳۰
^{13}C -PCB ۱۳۸	۲۱/۱	۳۷۲,۳۷۴*	۳۰۲	۳۰
^{13}C -PCB ۱۸۰	۲۲/۱	۴۰۶,۴۰۸*	۳۳۶	۳۵

شد. همچنین برای بدست آوردن پیکهایی با حداکثر شدت،^۶ ناحیه زمانی جهت پردازش یونهای شاخص ترکیبات تعريف گردید. در مرحله بعد به منظور انتخاب و بهینه سازی فرگمنتهای حاصل از یون مادر و انرژی های مختلفی که در آن تبدیل های حاصل^۱ منجر به ایجاد یون های محصول با بیشترین

سپس محلول استاندارد حد واسط از مخلوط پازده OCPs و PCBs مورد مطالعه به منظور آنالیز همزمان ۱۸ ترکیب آلی پایدار در روش پایش اسکن (غلظت ۰/۵ $\mu\text{g/mL}$: OCPs و ۰/۱ $\mu\text{g/mL}$: PCBs) و به مقدار ۱ میکرولیتر به دستگاه تزریق شد.

پس از شناسایی یون های مادر، به منظور افزایش حساسیت و گزینش پذیری، از روش پایش یون های انتخابی (SIM) استفاده

¹ Transition

ترکیبات p,p' -DDT-D8 و p,p' -DDE-D8 استاندارهای داخلی برای آنالیز ترکیبات ددت و متوكسی کلر مورد استفاده قرار گرفت و جهت آنالیز سایر سوموم آلی کلره از ترکیب نشاندار C_{12} -PCB-118¹³ استفاده گردید. بی فنیل های چند کلره با استاندارد داخلی مرتبط به خود از نوع نشاندار- C_{12} ¹³ labelled-PCBs مورد بررسی قرار گرفتند.

معتبرسازی روش آنالیز نمونه ها

شناسایی و اندازه گیری میزان باقیمانده سوموم آلی پایدار در نمونه های ماهی قزل الأ بوسیله دستگاه GC-MS/MS و با روش پایش MRM انجام شد. بدین ترتیب یک گرم فیله ماهی بخ زدایی شده عاری از هر گونه آلاینده (نمونه تمیز³، با ۲۵ میکرو لیتر از غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر استانداردهای داخلی OCPs و μ L از غلظت ۵۰۰ ng/mL استانداردهای PCBs آلووده⁴ شد. همچنین جهت محاسبه میزان بازیافت و کارایی روش استخراج مقدار ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو لیتر از محلولی با غلظت OCPs ۵۰۰ ng/mL: PCBs ۱۰۰ ng/mL: OCPs ۱۰۰ ng/mL (جهت بدست آوردن سطح اسپایک ۱، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ ng/g OCPs: ۵، ۱۰، ۲۰ ng/g و ۲، ۵، ۱۰ mL) بر ماهی اسپایک شد. پس از هم زدن شدید، مقدار ۱۰ mL مخلوط حلال های ان-هگزان/استن با نسبت ۱:۱ را بر روی نمونه ریخته و بعد از هم زدن محلول مقدار ۴ گرم سولفات منیزیم و ۲ گرم کلرید سدیم به آن اضافه شد. سپس این مخلوط با سرعت ۳۶۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانترفیوژ گردیده و میزان ۱ mL از محلول جداسازی شده با گاز ازت خشک شد. سپس به آن ۱ mL ۱ هگزان اضافه می شود (محلول¹). به منظور تهیه ستون سیلیکا جهت مرحله خالص سازی⁵، مقدار ۱ گرم سیلیکای غیر فعال شده⁶، داخل ستون کروماتوگرافی مخصوص ریخته شد و پس از آماده سازی ستون⁷ با هگزان و دی کلرومتان، محلول ۱ به ستون اضافه شد. سپس لوله با ۲ mL هگزان در دو مرحله و هر بار ۱ mL شستشو گردید.

³ Blank

⁴ Spike

⁵ Clean up

⁶ تهیه سیلیکای غیر فعال: برای این منظور مطابق با دستورالعمل آزمایشگاه رفنس اروپا سیلیکا ژل را سه مرتبه با دی کلرومتان شستشو داده و سپس جهت خشک شدن یک شب در آون با دمای ۲۰۰-۳۰۰ درجه قرار داده شد.

⁷ Conditioning

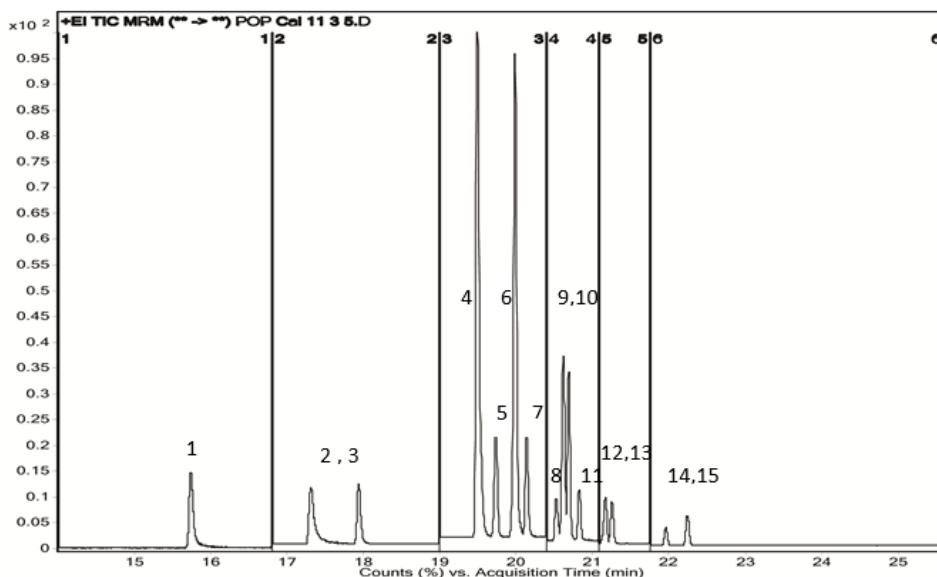
فراآوانی می شوند و به عنوان انرژی های تفکیک¹ مخصوص هر سم انتخاب شد (جدول ۱). در ادامه جهت افزایش حداکثری اختصاصی بودن و حساسیت روش آنالیز، مقدار یک میکرولیتر از محلول با غلظت μ g/mL OCPs ۰/۵ و μ g/mL PCBs ۳۰ به همراه استانداردهای داخلی مربوطه (غلظت ۲۵ نانوگرم بر میلی لیتر) تزریق گردید (شکل ۱).

جهت کشیدن منحنی کالیبراسیون محلول های استاندارد، مخلوط از ۱۸ آلاینده آلی پایدار با غلظت های مختلف [۰/۰۵، ng/mL ۱۵۰، ۱۲۵، ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۰۱] (استانداردهای داخلی آنها با غلظت PCBs ng/mL ۳۰ [۲۵ ng/mL] تهیه و به دستگاه تزریق شد و مورد آنالیز قرار گرفت. بدین منظور با توجه به زمان بازداری آلاینده های مورد نظر در ناحیه های تعریف شده، یون های اختصاصی هر یک از سوموم، پایش شده و سطح زیر پیک هر یک در غلظت مورد نظر بدست آمد. منحنی های استاندارد با تمامی استانداردهای داخلی کشیده شدند و نهایتاً بهترین معادله با ضریب همبستگی بالای ۹۹٪ انتخاب گردید. برای تعیین صحت و دقت روش پنج سطح اسپایک (۱، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ ng/g OCPs و متناسب با آن ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ ng/g PCBs) مورد بررسی قرار گرفت (استاندارد داخلی ۲۵ ng/g بود). نسبت سطح زیر منحنی آنالیت به سطح زیر منحنی استاندارد داخلی برای نمونه های مجھول پس از تزریق نمونه ها به دستگاه محاسبه گردید و در معادلات خطی منحنی کالیبراسیون قرار داده شد و غلظت هر سم و مقدار بازیافت آن بررسی گردید. برای هر غلظت در هر روز ۳ نمونه آماده و به دستگاه تزریق شد و این عمل ۳ روز متوالی تکرار گردید. بر مبنای نتایج حاصله میزان بازیافت به عنوان معیاری از صحت و RSD٪ به عنوان معیاری از دقت روش محاسبه گردید. همچنین کمترین غلظتی که پیکی معادل سه برابر نویز ایجاد کند (S/N=۳) به عنوان LOD آن آنالیت مورد نظر و کمترین غلظتی که پیکی معادل ۱۰ برابر نویز ایجاد کند (S/N=۱۰) به عنوان LOQ آن آنالیت در نظر گرفته می شود. عدم قطعیت (U) روش از حاصلضرب درصد ضریب تغییرات در فاکتور پوشش (عدد ۲) مطابق فرمول EU, 2017, 644; EU, SANTE, 2017, ۱ بدمد آمد .(11813; Chandran and Singh, 2007)

$$\text{Fرمول ۱} \quad U = 2 (\text{Coverage factor}) \times \text{CV\%}^2$$

¹ Collision energy

² Coefficient of variation



شکل ۱: کروماتوگرام مخلوط ۱۸ آلاینده‌آلی پایدار در مد MRM

Figure 1: GC-MS/MS chromatogram of 18 POPs in MRM mode

1: HCB, 2: PCB 28, 3: PCB 52, 4: PCB 101, γ -Chlordane, o,p' -DDE, 5: α -Chlordane, α -Endosulfan, 6: p,p' -DDE, 7: Dieldrin, 8: PCB 118, 9: β -Endosulfan, 10: o,p' -DDT, 11: PCB 138, 12: p,p' -DDT, 13: PCB 153, 14: Methoxychlor, 15: PCB 180

شماره ۶۴۴ و ۱۱۸۱۳ اتحادیه اروپا مقایسه شد
644; EU, SANTE, 2017, 11813; Chandran and
. (Singh, 2007)

تخمین میزان دریافت روزانه سوم POPs در شهر تهران

میزان دریافت هر سم به میزان آلودگی و میزان مصرف ماده غذایی مورد نظر بستگی دارد. در این تحقیق پس از شناسایی و تعیین مقدار آلاینده‌های آلی پایدار مورد مطالعه موجود در ماهی میزان متوسط دریافت روزانه این سومون با درنظر گرفتن میانگین سرانه ۶ گرم ماهی در روز (انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی ایران، ۱۳۸۳-۸۵؛ کلانتری و غفاری پور، ۸۱-۱۳۷۹) و با احتساب ۶۰ کیلوگرم برای وزن یک فرد بالغ (FAO, 2002; WHO, FSF/FOS, 2011) بدست آمد. مقادیر بدست آمده محاسبه گردید (فرمول ۲). فرض اینکه یک فرد تهرانی در طول یک روز یک عدد ماهی مصرف کند، میانگین دریافت روزانه آلاینده‌های آلی پایدار مورد مطالعه از طریق مصرف ماهی به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن او مطابق فرمول ۲ محاسبه شد (فرمول ۲).

هت استخراج نهایی آنالیت‌ها از ماهی مقدار ۱۰ mL مخلوط حللهای هگزان/دی کلرومنتان با نسبت ۱:۱ به آن اضافه شده و تا حجم ۰/۵ میلی لیتر با گاز ازت توسط دستگاه تبخیر خشک گردید. سپس مقدار ۲ mL ایزواکتان به آن اضافه شد و دوباره تا حجم ۰/۵ mL خشک گردید. مقدار ۱۰۰ از آن را به ویال GC-MS منتقل شد و مقدار ۱ μ L به دستگاه MS تزریق گردید. بدین ترتیب میزان حدود تشخیص و تعیین مقدار و همچنین میزان بازیافت به منظور صحت روش و میزان دقت از محاسبه تکرارپذیری روش، محاسبه گردید. غلظت هر یک از آلاینده‌های موجود در نمونه‌ها با استفاده از محاسبه نسبت مقدار سطح زیر پیک هر آلاینده به مقدار سطح زیر پیک استاندارد داخلی مربوطه و قراردادن آن در معادله خط منحنی کالیبراسیون استاندارد آنالیت‌ها بدست آمد. مقادیر بدست آمده به عنوان پاسخ تجزیه‌ای جهت محاسبه غلظت باقیمانده آلاینده‌های آلی پایدار موجود در نمونه‌ها استفاده شد. جهت بدست آوردن مقادیر هر آلاینده، جرم مورد نظر از داخل کروماتوگرام استخراج شد.

پس از بهینه کردن شرایط در بخش‌های مختلف از جمله کروماتوگرافی گازی و طیف سنجی جرمی و روش استخراج و خالص‌سازی، اعتبار بخشی روش بر اساس پروتکل اعتبارسنجی SANTE انجام شد و با پارامترهای موجود در دستورالعمل

$$\text{میزان آلدگی (ng/g)} = \frac{\text{(حد تعیین مقدار} / ۲ \times \text{تعداد نمونه غیر آلدگی)}}{\text{تعداد نمونه ها}}$$

$$\text{میزان دریافت (ng/kg bw/day)} = \frac{\text{(صرف سرانه ماهی (g/day)}}{۶} \times \text{میزان آلدگی در ماهی ها}$$

$$\text{میانگین وزن یک فرد بالغ (kg)} = ۶$$

فرمول ۲

متند تکوین شده در تحقیق حاضر مورد آنالیز قرار گرفتند. در هر روز یک نمونه کنترل کیفی به صورت بلانک در کنار نمونه های مجھول آنالیز شد. نتایج بدست آمده در جدول ۳ ارائه شده است. بیشترین میزان آلدگی مربوط به *p,p'-DDT* با مقدار میانگین *ww* (Wet weight) ۱۱۳ ng/g بود. همچین سومون *Dieldrin* و *p,p'-DDE* با مقادیر میانگین *ww* ۱۲۳/۳ ng/g و ۱۰ ng/g در مرتب بعدی بترتیب بودند. بررسی سایر آلاینده های مورد مطالعه در نمونه های ماهی نشان دهنده حضور برخی از این ترکیبات مانند *o,p'-DDT*, *o,p'-DDE*, α -Chlordane, γ -Chlordane, HCB و PCB-۲۸ بود که مقادیر بدست آمده در نمونه ها، پایین تر از حدود تعیین مقدار روش (LOQ) بود. همچنین میزان تخمینی دریافت روزانه (Estimated daily intake) این سومون برای یک فرد بالغ تهرانی به میزان ng/kg bw/day میزان برای یک فرد بالغ تهرانی به میزان

۰/۰۰۷ - ۰/۰۰۷ محسابه گردید (جدول ۳).

نتایج

نتایج حاصل از تزریق استانداردها به دستگاه نمایانگر خطی بودن منحنی های کالیبراسیون می باشد. بدین ترتیب، معادلات خطی و ضریب همبستگی (r^2) در دامنه ۰/۹۹۰-۰/۹۹۷ در بست آمد. حد تشخیص و حد تعیین مقدار بترتیب $8/3$ ng/g و $0/6$ ng/g - ۲۵ - ۲ محسابه و میانگین میزان بازیافت و تکرارپذیری روش در ۵ سطح آلدگی بترتیب در بازه ۰/۱۱۱-۰/۱۲۰ - ۰/۷۳ درصد مطابق با دستورالعمل اتحادیه اروپا (EU, 2017, 644; EU, SANTE, 2017, 11813) قطعیت روش $2/77-30/88$ درصد محسابه گردید (جدول ۲).

آنالیز نمونه های جمع آوری شده از سطح بازار تهران
۷۴ نمونه ماهی جمع آوری شده از فروشگاه های شهر تهران با

جدول ۲: حد تشخیص، حد تعیین مقدار، دقت، صحت و عدم قطعیت در ۱۸ آلاینده آلی پایدار (۷ PCBs و ۱۱OCPs)

Table 2: Performance characteristics of the method for analysis of 18 POPs (OCPs and PCBs) in fish

ترکیب	حد تشخیص (نانوگرم بر گرم)	حد تعیین مقدار (نانوگرم بر گرم)	حد دقیق (درصد)	صحت ± دقیق (درصد)	عدم قطعیت (درصد)	ضریب همبستگی	معادله خط
HCB	۱/۶	۵	۸۷ ± ۳/۴	۶/۷۸	۰/۹۹۰	$Y=0/0.321X-0/0.019$	
α -Chlordane	۳/۳	۱۰	۸۵/۲ ± ۹/۳	۱۸/۵۸	۰/۹۹۵۴	$Y=0/0.194X+0/0.31$	
γ -Chlordane	۱/۶	۵	۱۰۸/۵ ± ۱۳/۸	۲۷/۶۴	۰/۹۹۶۷	$Y=0/0.193-0/0.223$	
Dieldrin	۳/۳	۱۰	۱۰۰/۸ ± ۱۴/۳	۲۸/۶۰	۰/۹۹۴۸	$Y=0/0.47X-9/10^{-5}$	
<i>o,p'-DDE</i>	۱/۶	۵	۱۰۳/۹ ± ۱۳/۹	۲۷/۸۲	۰/۹۹۹	$Y=0/111X-0/0.804$	
<i>p,p'-DDE</i>	۱/۶	۵	۱۱۱/۸ ± ۵/۵	۱۱/۰۴	۰/۹۹۸۰	$Y=0/10.29X-0/0.852$	
<i>o,p'-DDT</i>	۳/۳	۱۰	۹۵/۸ ± ۱/۴	۲/۷۷	۰/۹۹۵۰	$Y=0/0.62X+0/2559$	
<i>p,p'-DDT</i>	۳/۳	۱۰	۱۰۹/۷ ± ۱۳/۵	۲۷/۰۱	۰/۹۹۱۹	$Y=0/0.167X-0/0.745$	
α -Endosulfan	۸/۳	۲۵	۷۲/۳ ± ۱۷/۹	۲۵/۷۰	۰/۹۹۱۵	$Y=0/0.8X+0/0.153$	
β -Endosulfan	۸/۳	۲۵	۸۵/۲ ± ۵/۳	۱۰/۰۵	۰/۹۹۷۲	$Y=0/0.48X-0/0.081$	
Methoxychlor	۳/۳	۱۰	۸۳/۲ ± ۱۴/۵	۲۹/۰۸	۰/۹۹۶۹	$Y=0/0.292X-0/1754$	
PCB 28	۰/۶	۲	۸۹ ± ۴/۴	۸/۸۲	۰/۹۹۷۸	$Y=0/0.493X-0/0.161$	
PCB 52	۰/۶	۲	۸۴/۴ ± ۲/۹	۵/۷۴	۰/۹۹۹۷	$Y=0/0.506X-0/0.205$	
PCB 101	۰/۶	۲	۸۰/۵ ± ۸/۱	۱۶/۱۴	۰/۹۹۸۰	$Y=0/0.781X-0/0.406$	
PCB 118	۰/۶	۲	۸۷/۳ ± ۷/۳	۱۴/۶۷	۰/۹۹۷۹	$Y=0/0.541X-0/0.257$	
PCB 138	۰/۶	۲	۸۲ ± ۱۴/۷	۲۹/۴۷	۰/۹۹۶۷	$Y=0/0.471X-0/0.044$	
PCB 153	۰/۶	۲	۹۵/۱ ± ۸/۵	۱۷/۰۸	۰/۹۹۹۱	$Y=0/0.507X-0/0.245$	
PCB 180	۱/۶	۵	۷۶ ± ۱۵/۴	۳۰/۸۸	۰/۹۹۴۸	$Y=0/0.471X-0/0.012$	

جدول ۳: مقادیر میانگین، میانه، درصد پراکندگی و میزان تخمینی دریافت روزانه نمونه های ماهی آلوده به سموم آلی کلره و بی فنیل های پلی کلره مورد مطالعه در کل ۷۴ نمونه ماهی

Table 3: Occurrence of OCPs and PCBs in fish samples from Tehran markets (Median, Mean, Incidence, EDI) (n=74)

ترکیب	پراکندگی (درصد)	میانگین (نانوگرم بر گرم)	میانه (نانوگرم بر گرم)	حداکثر (نانوگرم بر گرم)	میزان تخمینی دریافت روزانه (نانوگرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز)	حداکثر مقادیر مجاز مصوب (نانوگرم بر گرم وزن تر)
HCB	Nd*	< LOQ	< LOQ	-	.0/۰۶	۲۰۰
α -Chlordane	Nd*	< LOQ	< LOQ	-	.0/۰۷	۵۰
γ -Chlordane	Nd*	< LOQ	< LOQ	-	.0/۰۷	(مجموع ایزومرهای سیس و ترانس)
Dieldrin	۲/۷	۱۳/۳۱	۱۳/۳۱	۱۵/۱	.0/۰۴	۲۰۰ (به تنهایی یا همراه با آلدرين)
o,p'-DDE	Nd*	< LOQ	< LOQ	-	.0/۰۲	
p,p'-DDE	۸/۱۱	۱۰/۰۳	۷/۴۵	۱۷/۹	.0/۲۸	۱۰۰۰
o,p'-DDT	Nd*	< LOQ	< LOQ	-	.0/۰۱	(مجموع تمام متابولیت ها)
p,p'-DDT	۵/۴	۱۱۲/۹۹	۲۱/۸۸	۳۹۸	.0/۶۱	
α -Endosulfan	Nd*	-	-	-	-	۵۰ (مجموع ایزومرهای آلفا، بتا و سولفات اندوسولفان)
β -Endosulfan	Nd*	-	-	-	-	
Methoxychlor	Nd*	-	-	-	-	۱۰
PCB ۲۸	Nd*	< LOQ	< LOQ	-	.0/۰۲	
PCB ۵۲	Nd*	-	-	-	-	
PCB ۱۰۱	Nd*	-	-	-	-	۷۵
PCB ۱۱۸	Nd*	-	-	-	-	
PCB ۱۳۸	Nd*	-	-	-	-	(مجموع ۷ شاخص)
PCB ۱۵۳	Nd*	-	-	-	-	
PCB ۱۸۰	Nd*	-	-	-	-	

* مشخص نشد (مقادیر زیر حد تشخیص دستگاه بود و مشاهده نشد)

و دی کلرومتان و دستگاه GC-ECD ، نمونه ها را آنالیز کردند. این تحقیق بر سه گونه ماهی شامل اردک ماهی (*Esox*)، کپور (*Carassius auratus*)، کاراس (*Cyprinus carpio*) و کاراس (*Lucius*)، کاراس (*Davodi et al., 2011*) انجام شد (*Voorspoels et al., 2004; Covaci et al., 2005*). همچنین در تحقیقی دیگر با استفاده از حلال های ان هگزان و دی کلرومتان و استن با نسبت های مختلف و دستگاه سوکسله تعدادی از PCB ها و OCP ها در ماهی آنالیز شدند (*Shude et al., 2009* ; جاواد خرد، ۱۳۹۱) با استفاده از مخلوط حلال های ان هگزان و استن بوسیله دستگاه سوکسله به مدت ۴ ساعت تعدادی از آفت کش های آلی کلره و بی فنیل های پلی کلره را استخراج نمودند و سپس با استفاده از ستون کارتیریج حاوی سیلیکاژل و مخلوط حلال های ان هگزان

بحث

طبق مطالعات انجام گرفته در ایران، اکثر روش های آنالیز نمونه ها بر اساس روش آنالیز آلاینده های آلی پایدار در نمونه های ماهی بر اساس روش سوکسله^۱ و دستگاه^۲ GC-ECD انجام شده است. محققین (داوودی، ۱۳۸۹ ; جاواد خرد، ۱۳۹۱) با استفاده از مخلوط حلال های ان هگزان و استن بوسیله دستگاه سوکسله به مدت ۴ ساعت تعدادی از آفت کش های آلی کلره و بی فنیل های پلی کلره را استخراج نمودند و سپس با استفاده از ستون کارتیریج حاوی سیلیکاژل و مخلوط حلال های ان هگزان

¹ Soxhlet

² Gas chromatography-electron capture detector

نتایج بدست آمده از این پژوهش دقیق و قابل استناد می باشد. این میزان صحت و دقت را می توان معلوم استفاده از استانداردهای داخلی متعدد و اختصاصی هر ترکیب دانست. بررسی مقالات مختلف نشان داد استفاده از استاندارد داخلی اختصاصی هر ترکیب می تواند دقت انجام آزمایش را تا حدود بسیار زیادی بالا ببرد. میزان انحراف استاندارد نسبی (RSD^7) یا به عبارتی تکرارپذیری روش در تحقیقات توسط Covaci و Voorspoels (2004) و Covaci et al., 2004; EU, 2017, 644; Voorspoels et al., 2004; EU, SANTE, 2017, 11813 توسط Cocco و همکاران (2011) تنها از یک استاندارد داخلی (PCB-۲۰۹) استفاده شده است که میزان بازیافت ۷۴-۹۴ درصد و RSD در دامنه ۱۱-۱۹ درصد اعلام شده بود (Cocco et al., 2011) و میزان حداقل حدود تشخیص و تعیین مقدار بتریب ng/g ۲۰ و ۴۰ گزارش شده بود که در روش اخیر (این مقاله) این مقدار بتریب ng/g $8/3$ ng/g 25 بدست آمد. استفاده از متدهای طیف سنجی جرمی متوالی (MS/MS) و پایش یونها به روش MRM یکی از بهترین گزینه ها برای آنالیز همزمان ۱۸ آلاینده آلی پایدار در ماتریکس پیچیده ای مانند ماهی می باشد. بدین ترتیب، در مدت زمان بسیار کوتاه (۷ دقیقه) و فقط با تعیین تعدادی یون شاخص از آلاینده های مورد نظر، پاسخ سریع، صحیح و دقیقی بدست آمد.

بررسی آلاینده های آلی پایدار مورد مطالعه در ۷۴ نمونه ماهی قزل آلای رنگین کمان جمع آوری شده از فروشگاه های شهر تهران، مشخص نمود که تعدادی از آنها به این سوم آلوده می باشند (جدول ۳). مقدار بالای p,p' -DDT در ماهیان نشان می دهد، برخلاف ممنوعیت بکارگیری DDT صنعتی در مزارع کشاورزی، این سم اخیراً مورد استفاده قرار گرفته است. از سوی دیگر، مقدار کم متابولیت p,p' -DDE و o,p' -DDT (۱۰ ng/g) همچنین مقادیر ناچیز متابولیت های o,o' -DDE در ماهیان آلووده به این سوم، نشانه ای از مقاومت بالای زیست محیطی و نیمه عمر طولانی آنها در اکوسیستم های آبی می باشد که مشخصاً نشان می دهد، این ماهیان بتازگی در معرض سم DDT قرار نگرفته اند (Andersen et al., 2001; Zhou et al., 2008).

دی آلدرين متابولیت پایدار سم آلدرين است که به صورت اپوکسید نسبت به پیش ماده خود، دارای قطبیت بیشتر و در

مانند^۱ ASE یا^۲ PLE استفاده گردد. Lui و همکاران (۲۰۰۶) و همچنین Yang و همکاران (۲۰۱۰) بترتیب از روشهای^۳ GPC و ASE برای آنالیز سوم آلی کلره و بی فنیل های پلی کلره با بکارگیری حلال های ان هگزان و دی کلرومتان استفاده کردند (Liu et al., 2006; Yang et al., 2010). همچنین Drabova و همکاران (2011) و Suchan et al., 2004; Suchan et al., 2004; Drabova et al., 2011 همکاران (۲۰۰۴) مقدار زیادی از آلاینده های آلی پایدار را با بکار بردن حلال ان هگزان و دی کلرومتان (۱:۱) و روش PLE جداسازی و شناسایی نمودند (Suchan et al., 2004; Drabova et al., 2011). روش های مذکور امروزه همچنان مورد استفاده قرار می گیرند اما با توجه به تعدد پروژه های تحقیقاتی، استفاده از روشی که بتواند در مدت زمان کوتاهی نتایج قابل قبولی ارائه نماید، لازم و ضروری می باشد. در این تحقیق از روش استخراج مایع - مایع استفاده شده است. سادگی و حجم کم حلal مصرفی و عدم نیاز به تجهیزات خاص و گران جهت آماده سازی نمونه ها از مزایای استفاده از این روش می باشد. بدین ترتیب استفاده از حلال های متفاوت در درصد های مختلف برای دو مرحله استخراج و خالص سازی مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت مخلوط حلال های ان هگزان و استن با نسبت ۱:۱ جهت مرحله استخراج و مخلوط حلال های ان هگزان و دی کلرومتان با نسبت ۱:۱ جهت مرحله خالص سازی با بدست آوردن مقدار بازیافت مناسب برای آنالیت های مورد مطالعه انتخاب گردید. در بررسی مقالات مختلف، حجم مصرفی حلال به میزان بالایی (۰-۴۰ میلی لیتر) (Litter) گزارش شده است (Suchan et al., 2004; Voorspoels et al., 2004; Covaci et al., 2005; Lui et al., 2006; Schmid et al., 2007; Yang et al., 2010; Cocco et al., 2011; Davodi et al., 2011; Drabova et al., 2011). در تحقیق اخیر تنها ۲۰ میلی لیتر حلال در دو مرحله مورد استفاده قرار گرفت که می توان گفت با توجه به حجم کم حلال ملاحظات زیست محیطی رعایت گردیده است. در این مقاله از روش کالیبراسیون استاندارد داخلی^۴ استفاده شده است که در مقایسه با سایر روش های پیچیده مانند کالیبراسیون با دو روش "افزایش آنالیت به نمونه تمیز"^۵ و تطبیق ماتریکس^۶، روشی بسیار ساده تر می باشد و در مدت زمان کوتاه تر نتایج آنالیز بدست می آید.

¹ Accelerated Solvent Extraction² Pressurized Liquid Extraction³ Gel Permeation Chromatography⁴ Internal standard calibration curve⁵ Spiked calibration curve⁶ Matrix match calibration curve⁷ Relative Standard Deviation

تشکر و قدردانی

از تمامی کسانی که در این پژوهش همکاری مشارکت داشتند بخصوص همکاران مرکز تحقیقات سلامت غذا و آزمایشگاه جامع تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- استنیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی ایران ۸۵-۱۳۸۳. مطالعه جامع الگوی سبد غذایی. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی. جاودان خرد، الف.، اسماعیلی ساری، ع. و بهرامی فر، ن. ۱۳۹۱. پایش آفت کش های آلی کلره و بی فنیل های چند کلره در سه گونه از ماهیان خوارکی در تلااب انزلی. نشریه دامپزشکی، ۹۵: ۵۰-۵۹.
- . خدانظری، الف.ن، حاجی مرادلو، ع. و قربانی، ر.، ۱۳۹۷. جایگزینی پودر ماهی با درصدهای مختلف سیلائز تخمیری حاصل از پودر ماهی کیلکا آچجوی بر فاکتور رشد و قابلیت هضم پروتئین خوارک قزل آلای رنگین کمان. مجله علمی شیلات ایران، ۲۸: ۹۵-۱۰۷.
- Doi: 10.22092/ISFJ. 2019.118889
- دادوی، م.، اسماعیلی ساری، ع.، بهرامی فر، ن. و زمانی احمد محمودی، ر.، ۱۳۸۹. بررسی غلظت و الگوی پراکندگی بی فنیل های چند کلره در ۵ گونه ماهیان خوارکی تلااب شادگان. نشریه دامپزشکی، ۸۸: ۵۳-۵۹.
- کبارفرد، ف. و عمیدی، س.، ۱۳۸۷. مبانی و کاربرد کروماتوگرافی مایع - طیف سنجی جرمی. انتشارات مرکز تحقیقات فیتوشیمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، آلای رنگین کمان. ۸۵-۸۲ صفحه.
- کرمی، الف.، علیشاھی، م.، قربانپور، م.، تابنده، م.ر. و محمدیان، ت.، ۱۳۹۷. بررسی پاسخ پادتن سرمی قزا آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) به واکسن دوگانه استریپتوکوکوزیس/ لاكتوکوکوزیس. مجله علمی شیلات ایران، ۲۸: ۱-۹.
- DOI: 10.22092/ISFJ. 2019.118605
- کلانتری، ن. و غفاری پور، م.، ۱۳۷۹-۸۱. طرح جامع مطالعات الگوی مصرف مواد غذایی خانوار و وضعیت تغذیه ای کشور. ملوندی، ح.، ۱۳۸۸. ارزیابی و مقایسه ترکیبات ارگانولکله در اندام های مختلف شغال با توجه به جنس و طول بدن در منطقه مرکزی استان مازندران. دانشگاه تربیت مدرس،

نتیجه حلالیت زیاد در آب می باشد. این سم با حرکت در طول زنجیره غذایی تحت اثر تغییض زیستی قرار می گیرد. نیمه عمر Ritter *et al.*, ۱۹۹۵) که با توجه به مقدار کم موجود در ماهیان بررسی شده (۱۳/۳ ng/g)، عدم استفاده از این سم جهت کنترل حشرات در چند سال گذشته را نشان می دهد و این میزان تنها دلیلی بر باقیماندن این سم با این مقدار کم در ماهیان می باشد.

هگزاکلرو بنزن به صورت یک محصول فرعی در فرمولاسیون ساخت برخی مواد شیمیایی در کارخانجات تولید مواد کلردار مانند حلال ها و آفت کش های با از طریق سوختن زباله های شهری تولید می شود (Bailey, 2001) که با توجه به حلالیت کم آن در آب معمولاً در بافت های چرب به مدت طولانی ذخیره می شود. پایین بودن مقدار این آلاینده در ماهیان آنالیز شده (< LOQ) نشان از عدم استفاده وسیع از حشره کش ها و سایر مواد شیمیایی در سال های اخیر می باشد.

سموم α -Chlordane و γ -Chlordane نیز مانند HCB به مقدار کم در ماهیان دیده شد که حاکی از عدم بکارگیری این سموم در حال حاضر و از بین رفتن باقیمانده آنها در محیط زیست می باشد (جاودان خرد، ۱۳۹۱).

PCB-۲۸ به دلیل میزان کم کلر بکار رفته در ساختار آن، امکان جابجایی و حرکت بیشتری دارد و در سیستم های بیولوژیک بیشتر انتقال می باید. مقدار ناچیزی از این بی فنیل پلی کلره در ماهیان مشاهده گردید که نشان دهنده حضور آن به دلیل کوچکی مولکول می باشد.

با توجه به مقادیر بدست آمده، بررسی باقیمانده آفت کش های ارگانولکله در ماهی قزل آلا نشان داد، میزان آلودگی به این سموم پایین تر از حداقل مقادیر مجاز مصوب SANTE/۱۱۸۱۳، ۲۰۱۷ قانون اتحادیه اروپا قرار داشت. همچنین بررسی بی فنیل های چند کلره شاخص مورد مطالعه در نمونه های ماهی، نشان دهنده حضور تنها PCB-۲۸ بود که مقدار آن پایین تر از حداقل مقادیر مجاز مصوب EU/۶۴۴، ۲۰۱۷ EU قانون اتحادیه اروپا در ماهی و حیوانات آبزی قرار داشت (EU, 2017, 644; EU, SANTE, 2017, 11813).

با توجه به اینکه این مقاله، پژوهشی آزمایشی^۱ بوده است، روش طراحی شده در این تحقیق می تواند برای آنالیز انواع نمونه های ماهی در استان های مختلف کشور و در تمام فصول سال بکار گرفته شود تا بتوان تصویری واقعی از میزان آلودگی این منابع به آلاینده های آلی پایدار بدست آورد.

¹ Pilot study

- Cok, I. and Satiroglu, M.H., 2004.** Polychlorinated Biphenyl Levels in Adipose Tissue of Primiparous Woman in Turkey. *Environment International*, 30: 7-10.
Doi: 10.1016/S0160-4120(03)00140-5.
- Covaci, A., Gheorgheb, A., Voorspoels, S., Maervoeta, J., Steen Redeker, E., Blust, R. and Schepens, P., 2005.** Polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in sediment cores from the Western Scheldt river (Belgium), analytical aspects and depth profiles. *Environment International*, 31: 367- 375.
Doi: 10.1016/j.envint.2004.08.009.
- Davodi, M. Esmaili-Sari, A. and Bahramifarr N., 2011.** Concentration of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in some edible fish species from the Shadegan Marshes (Iran). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 294-300.
Doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.07.045.
- Dip, R., Hegglin, D., Deplazes, P., Dafflon, O., Koch, H. and Naegeli, H., 2003.** Age- and Sex-dependent Distribution of Persistent Organochlorine in Urban Foxes. *Environmental Health Perspectives*, 111: 1608-1613.
Doi: 10.1289/ehp.6226.
- Drabova, L., Pulkabova, J., Kalachova, K., Hradecky, J., Suchanova, M., Tomaniova, M., Kocourek, V. and Hajsova J., 2011.** Novel approaches to determination of PAHs and Halogenated POPs in Canned Fish. *Czech Journal of Food Sciences*, 29: 498-507.
Doi:10.17221/405/2010-CJFS.
- European Commission, 2017.** Commission Regulation (EU), 2017/644, Setting Maximum Levels for certain Contaminations in Foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. L 92/9.
- دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی مهندسی محیط زیست.
- Andersen, G., Kovacs, K.M., Lydersen, C., Skaare, J.U., Gjertz I. and Jenssen, B.M., 2001.** Concentrations and Patterns of Organochlorine Contaminants in White Whales (*Delphinapterus leucas*) from Svalbard Norway. *The Science of the Total Environment*, 264: 267-281. Doi:10.1016/S0048-9697(00)00765-8.
- Bailey, R.E., 2001.** Global hexachlorobenzene emissions. *Chemosphere*, 43: 167-182.
Doi: 10.1016/S0045-6535(00)00186-7.
- Borja, J., Taleon, D.M., Auresenia, J. and Gallardo, S., 2005.** Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process Biochemistry*, 40: 1999-2013.
Doi: 10.1016/j.procbio.2004.08.006.
- Brown, J., Bedard, D.L., Brennan, M.J., Carnahan, J.C., Feng, H. and Wangner, RE., 1987.** Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments. *Science*, 236: 709-712.
Doi: 10.1126/science.236.4802.709.
- Carlo, S. and Yolanda, P., 2007.** Recent trends in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26: 103-115.
Doi:10.1016/j.trac.2006.08.005.
- Chandran, S. and Singh, R.S.P., 2007.** Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie*, 62: 4-14. Doi: 10.1691/ph.2007.1.5064.
- Cocco, E., Guignard, C., Haffmann, L. and Bohn, T., 2011.** Rapid analysis of polychlorinated biphenyls in fish by pressurized liquid extraction with in-cell cleanup and GC-MS. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 91: 333-347.
Doi: 10.1080/03067319.2010.496048.

- European Commission, 2017.** SANTE/11813/2017, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.
- FAO., 2002.** Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed. Food and Agricultural Organization of United Nations. Rome, 25 P.
- FAO., 2003.** International Code of Conduct on the Distribution and use of Pesticide, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 6 P.
- Fu, C.T. and Wu, S.Ch., 2005.** Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls in mullet fish in former ship dismantling harbor, a contaminated estuary, and nearby coastal fish farms. *Marine Pollution Bulletin*, 51: 932-939. Doi: 10.1016/j.marpolbul.2005.09.047.
- Guruge, K.S. and Tanabe, S., 2001.** Contamination by persistent organochlorines and butyltin Compounds in west coast of Sir Lanka. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 179-186. Doi: 10.1016/S0025-326X(00)00140-5.
- Liu, H., Zhang, Q., Cai, Z., Li, A., Wang, Y. and Jiang, G., 2006.** Separation of polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in environmental samples using silica gel and florisil fractionation chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 557: 314-20. Doi: 10.1016/j.aca.2005.10.001.
- Minh, N.H., Someya, M., Minh, T.B., Kunisue, T., Iwata, H., Watanabe, M., Tanaba, S., Viet, P.H. and Tuyen, B.C., 2004.** Persistent Organochlorine residues in human breast milk from Honai and Hochiminh city, Vietnam, contamination, accumulation kinetics and risk assessment from infants. *Environmental Pollution*, 129: 431-441.
- Doi:10.1016/j.envpol.2003.11.012.
- Naso, B., Perrone, D., Ferrante, M.C., Bilancion, M. and Lucisano, A., 2005.** Persistent organic pollutants in edible marine species from the gulf of Naples, Southern Italy. *Science of the Total Environment*, 343: 83-95. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.10.007.
- Navarro, S., Vela, N. and Navarro, G., 2007.** An overview on the environmental behavior of pesticide residue in soils. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 5: 357-375. Doi: 10.5424/sjar/2007053-5344.
- Perugini, M., Cavalieri, M., Giammario, A., Mazzone, P., Olivieri, V. and Amorena, M., 2004.** Levels of Polychlorinated Biphenyls and Organochlorine Pesticides in some Edible Marine Organisms from Central Adriatic Sea. *Chemosphere*, 57: 391-400. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.04.034.
- Porta, M. and Zumeta, E., 2002.** Implementing the Stockholm treaty on persistent organic pollutants. *Occupational and Environmental Medicine*, 59: 651-2. Doi: 10.1136/oem.59.10.651
- Ritter, L., Solomon, K.R. and Forget, J., 1995.** Persistent Organic Pollutants, an Assessment Report on, DDT, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Chlordane, Heptachlor, Mirex, Toxaphene, HCB, PCBs, Dioxins and Furans. Canadian Network of toxicology Centers 620 Gordon Street Guelph on Canada, 145 P.
- Schmid, P., Kohler, M., Gujer, E., Zennegg, M. and Lanfranchi, M., 2007.** Persistent organic pollutants, brominated flame retardants and synthetic musks in fish from remote alpine lakes in Switzerland. *Chemosphere*, 67: 16-21. Doi:10.1016/j.chemosphere.2006.05.080.
- Suchan, P., Pulkrabova, J., Hajslova, J. and Kocourek, V., 2004.** Pressurized liquid extraction in determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish

- samples. *Analytica Chimica Acta*, 520: 193-200. Doi:10.1016/j.aca.2004.02.061.
- UN., United Nations, Treaty Series., 2001.** Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants Stockholm, 22 May, 2256: 119. Registration 17 May 2004, No: 40214, Signatories 152, Parties 183.
- UNEP., 2004.** UNEP Annual Evaluation Report 2004. Protecting human health and the environment from persistent organic pollutants. Stockholm convention. Available DIALOG. <http://wedocs.unep.org/handle/20.500.11822/356>. Cited 28 Aug 2019.
- Voorspoels, S., Covaci, A., Maervoet, J., De Meester, I. and Schepens, P., 2004.** Levels and profiles of PCBs and OCPS in marine benthic species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 49: 393-404. Doi: 10.1016/j.marpolbul.2004.02.024.
- Wenhai, W., Jie, X., Hongmei, Zh., Qing, Zh. and Shijian, L. 2005.** A practical approach to the degradation of polychlorinated biphenyls in transformer oil. *Chemosphere*, 7: 944-950. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.11.079.
- WHO., 2003.** Guidelines on the management of public health pesticides. Report of the WHO Interregional Consultation, Chiang Mai, Thailand.
- WHO/FSF/FOS/97.7., 2011.** Guidline for predicting dietary intake of pesticide residues.
- Yang, R., Wang, Y., Li, A., Zhang, Q., Jing, C., Wang, T., Wang, P., Jiang, G. and Li, Y. 2010.** Organochlorine pesticides and PCBs in fish from lakes of the Tibetan Plateau and the implications. *Environmental Pollution*, 158: 2310-2316. Doi: 10.1016/j.envpol.2010.02.004.
- Zhu, Y., Lio, H., Xi, Q., Cheng, H. and Xu, X., 2005.** Organochlorine pesticides (DDT and HCH) in soils from the outskirt of Beijing, China. *Chemosphere*, 60: 770-778. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.04.01
- Zhou, R., Zhu, L. and Kong, Q., 2007.** Persistent chlorinated pesticides in fish species from Qiantang River in East China. *Chemosphere*, 68: 838-847. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.02.021.
- Zhou, R., Zhu, L., Chen, Y. and Kong, Q., 2008.** Concentration and Characteristics of Organochlorine Pesticides in Aquatic Biota from Qiantang River in China. *Environmental Pollution*, 151: 190-199. Doi: 10.1016/j.envpol.2007.02.015.

Validation and application of an analytical method for determination of Persistent Organic Pollutants in Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) collected from Tehran retail markets

Bayat M.¹; Saber Tehrani M.¹; Kobarfard F.^{2*}; Husain S.W.¹; Yazdanpanah H.³

*farzadkf@yahoo.com

1- Department of Chemistry, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

2- Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Department of Toxicology, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Persistent organic pollutants are a wide group of toxic and dangerous compounds. These organic compounds are chemically and physically stable even beams. In this study an analysis method for simultaneous determination of 18 persistent organic pollutants including eleven Organochlorine pesticides (OCPs): HCB, Dieldrin, Methoxychlor, α -, Y-Chlordane, α -, β -Endosulfan and *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT and seven indicator Polychlorinated biphenyls (PCBs); IUPAC nos.: 28,52,101,118,138,153,180 congeners were determined in Rainbow trout by GC-MS/MS in MRM monitoring mode and LLE extraction. The validation results showed the calibration curves over the concentration range of 0.1-30 ng/mL for PCBs and 0.5-150 ng/mL for OCPs were linear and coefficient of determination (r^2) ranged between 0.990-0.999. The LODs and LOQs for POPs studied were between 0.6-8.3 and 2-25 ng/g, respectively. The average recoveries obtained for analytes in five different spiked levels (1-10 ng/g for PCBs and 5 times for OCPs) were in the range of 73%-112%. The relative standard deviations of POPs in fish were in the range of 1.4-17.9% for all of the concentration levels. The ranges of uncertainty were reported between 2.77%-30.88%. The results indicated the presence of organochlorine pesticides in trout samples and the highest level of contamination was related to *p,p'*-DDT with average values of 113 ng/g ww (wet weight). Dieldrin and *p,p'*-DDE were among the next level of contamination with mean values of 13.3 and 10 ng/g ww, respectively. Study of other OCPs in the trout samples indicated the presence of α -, Y-Chlordane, *o,p'*-DDE, *o,p'*-DDT and HCB in which the amount were lower than the limit of quantitation (LOQ) of the method. OCPs residues were lower than maximum residue levels set by European Council Directives, SANTE (2017) No.11813. Also, the study of PCBs in trout samples indicated the presence of only PCB 28 and its amount was lower than maximum residue levels set by European Commission Regulation (EU) (2017) No.644.

Keywords: Persistent organic pollutant, Polychlorinated biphenyls, Organochlorine pesticides, Rainbow trout, GC-MS/MS

*Corresponding author