

УДК 543.6

МЕЛЬНИЧУК С.Д., ЛОХАНСКАЯ В.И., БАРАНОВ Ю.С., ГРИБОВА Н.Ю.

**АНАЛИТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ БЕНЗО(а)ПИРЕНА
В РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЛАХ.**

Відпрацьована методика аналізу масової концентрації БаП у соняшниковій, кукурудзяній, оливковій, лляній, маслі насіння гарбуза і волоського горіха методом ВЕРХ/ФЛД, методика виключає стадію лужного гідролізу зразка. Тривалість повного аналізу однієї проби зразка олії складає 70 хвилин. Досліджений інтервал концентрацій бензо(а)пірену склав від 0,5 мкг/кг до 10,0 мкг/кг. Методика відповідає вимогам ДСТУ 17025 та ЄС SANCO 12495-2011, що підтверджено відповідними валідаційними характеристиками. Розроблена методика успішно застосовувалася при виконанні міжлабораторних порівнянь, виконанні рутинних аналізів на протязі 2011-2012

Ключові слова: бенз(а)пірен, високоефективна рідинна хроматографія, рослинні олії

Отработана методика анализа массовой концентрации БаП в подсолнечном, кукурузном, оливковом, льняном, масле семян тыквы и грецкого ореха методом ВЭЖХ/ФЛД, исключая стадию щелочного гидролиза образца. Продолжительность полного анализа одной пробы образца масла составила 70 минут. Изученный интервал концентраций бензо(а)пирена составил от 0,5 мкг/кг до 10,0 мкг/кг. Методика соответствует требованиям ДСТУ 17025 и ЕС SANCO 12495-2011, что подтверждено соответствующими валидационными характеристиками. Разработанная методика успешно применялась при выполнении межлабораторных сравнений, выполнении рутинных анализов на протяжении 2011-2012 гг.

Ключевые слова: бенз(а)пирен, высокоэффективная жидкостная хроматография, растительные масла

Method of analytical control of benzo(a)pyrene in vegetable oil excluding stage alkaline hydrolysis of vegetable oils was tested in investigation on the content of BaP in sunflower, corn, olive, flaxseed, pumpkin seed oil and walnuts by HPLC/FLD. Duration of a full analysis of one sample oil sample was 70 minutes. Studied range of concentrations of benzo(a)pyrene was 0.5 mg/kg and 10.0 mg/kg. Method meets requirements of DSTU 17025 and EU SANCO 12495-2011, which is confirmed by the appropriate validation characteristics. The developed method has been successfully applied in the inter-laboratory comparisons, performing routine analyzes for 2011-2012.

Keywords: benz(a)pyrene, high performance liquid chromatography, vegetable oil

Среди особо опасных контаминантов растительных масел, жиросодержащих пищевых продуктов, воздуха, воды и почвы выделяют полициклические ароматические

углеводороды (ПАУ). Необходимость контроля ПАУ возникла вследствие подтверждения канцерогенного действия ряда химически чистых ароматических углеводородов, в частности бензо(а)пирена [1]. По мере развития химического анализа многокомпонентных систем в конце 1950-х годов начали осуществлять первые определения ПАУ в воде, почве и воздухе, растительных маслах и семенах масличных культур. Смеси ПАУ, обнаруживаемые в объектах окружающей среды и продуктах питания, характеризуются многообразием вариаций качественного и количественного составов, включают следующие соединения: аценафтен, аценафтилен, антрацен, бенз(а)антрацен, бензо(а)пирен, бензо(б)флуорантен, бензо(г,х,и)перилен, бензо(к)флуорантен, дибенз(а,х)антрацен, идено(1,2,3-сд)пирен, короннен, нафталин, пирен, перилен, хризен, фенатрен, флуорантен, флуорен. Отличительной особенностью смесей ПАУ является преобладание (от 10% до 30%) устойчивого в любой среде канцерогена – бензо(а)пирена (БаП) [2]. В связи с этим, БаП стал первым из ПАУ, для которого установлены предельно допустимые концентрации (ПДК), используемые для определения степени загрязненности объекта полициклическими ароматическими углеводородами [3,4]. Сегодня уже известно, что биохимическая активность БаП зависит от сопутствующих ему ПАУ [5]. Из обнаруженных в объектах окружающей среды и растительных маслах сотен ПАУ различного химического строения, для постоянного контроля выбран узкий ряд приоритетных соединений. В Украине в растительных маслах нормируется содержание одного ПАУ – бензо(а)пирена, в странах Европейского Союза (ЕС) – четырёх ПАУ [6,7].

Аналитическое определение ПАУ, в соответствии с регламентом Комиссии ЕС № 333/2007, может проводиться по любой методике, прошедшей процедуру валидации и соответствующей требованиям аналитического контроля, изложенным в законодательстве. Основываясь на установленных критериях подхода в анализе, методы контроля сегодня активно развиваются. Наиболее сложными объектами анализа остаются загрязненные ПАУ жиросодержащие копченые продукты питания и растительные масла. Поскольку растительные масла используются в ежедневном рационе человека, и Украина является лидером на мировом рынке производства подсолнечного масла, контроль ПАУ в подсолнечном масле является важной санитарно-гигиенической и экономической задачей.

Целью данной работы стал поиск условий выполнения измерения микроколичеств бензо(а)пирена в различных растительных маслах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Согласно литературным источникам, изученным в работе, первым аналитическим методом, позволяющим достоверно обнаруживать некоторые ПАУ, является низкотемпературный спектрально-люминесцентный метод или метод квазилинейных спектров флуоресценции. Метод низкотемпературной спектрофлуориметрии разработан в середине 1950-х гг. на основе эффекта Э.В.Шпольского. В его основе лежит способность ПАУ поглощать излучение определенной длины волны и флуоресцировать в области длин волн от 300 нм до 420 нм. Предел количественного определения ПАУ в стандартных растворах составлял 1 пг/мл, в смесях из десяти компонентов 10 нг/мл [8]. Образцы масла, загрязненные липофильными ПАУ подвергались многостадийной и трудоёмкой пробоподготовке: щелочному гидролизу, экстрагированию и перекрекции ПАУ, очистке экстракта. Данный подход в пробоподготовке детально описан в современных стандартных методиках [9,10]. Упростить пробоподготовку и достичь высокого качества получаемых результатов,

возможно при использовании современных сорбентов [11-13], извлекающих из липидной матрицы все соединения группы ПАУ без щелочного гидролиза матрицы.

Основной химико-аналитической аппаратурой применяемой в современном анализе ПАУ являются: высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и газожидкостная хроматография (ГЖХ). Для регистрации аналитических сигналов в методе ГЖХ чаще всего используется пламенно-ионизационный детектор (ПИД), обладающий высокой чувствительностью, линейностью и надежностью. Однако канцерогенный бензо(а)пирен и неканцерогенный бензо(е)пирен имеют близкие температуры кипения и при анализе ГЖХ/ПИД регистрируются одним пиком, возникают затруднения в количественной интерпретации результатов хроматограммы. Использование детектора масс-спектрометра может привести к неточной информации по количеству в случае совпадения масс некоторых соединений, различных по строению и токсичности. Идентификация ПАУ с помощью масспектрометра в методе ВЭЖХ/МС имеет свои особенности. Поскольку, ПАУ являются слабополярными, малолетучими, устойчивыми к электронному удару соединениями, для их ионизации в методе ВЭЖХ/МС/МС необходимо использовать дополнительные источники ионизации, например фотоионизацию [14]. Это увеличивает стоимость укомплектации прибора и анализа в целом [15]. Наиболее простым, в тоже время точным и чувствительным инструментальным методом анализа БаП, является используемый многими лабораториями метод обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуориметрическим детектированием (ФЛД). В таблице 1 приведены значения пределов количественного определения БаП детекторами, применяемыми в методах ГЖХ и ВЭЖХ [16].

Таблица 1.

Значения предела количественного определения Б(а)П в масложировой продукции

Метод	ГЖХ		ВЭЖХ	
	МС	ПИД	ФЛД	УФ
Предел количественного определения, мкг/кг	0,5	5,0	0,07	7,0

Как можно видеть из таблицы 1 метод ВЭЖХ/ФЛД является наиболее чувствительным в определении БаП в маслах. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектированием лежит в основе разработанного в Украине ДСТУ 4689:2006 «Продукти харчові. Методи визначання масової частки бензо(а)пірену». Суть метода состоит в щелочном гидролизе исследуемой пробы, экстракции БаП и неомыленной части липидов гексаном, очистке экстракта переэкстракцией БаП из гексана смесью вода – N,N-диметилформамид с последовательной экстракцией гексаном, концентрированием, очисткой на флоризиле и определении массового количества БаП методом ВЭЖХ/ФЛД. Согласно этой методике контроль БаП осуществляется на уровне от 0,07 до 0,5 мкг/кг (граница суммарной относительной ошибки измерения $\pm 60\%$) и от 0,5 до 2,5 мкг/кг (граница суммарной относительной ошибки измерения $\pm 45\%$), что соответствует европейским нормам только по БаП.

Еврокомиссия по охране здоровья и защите прав потребителей в 2011 году приняла поправки регламента Комиссии ЕС № 1881/2006, согласно которым необходим контроль содержания 4 ПАУ: бензо(а)пирена, бенз(а)антрацена, бензо(б)флуорантена, хризена на уровне приведенном в таблице 2.

Таблица 2.

Значения предельно допустимых концентраций (ПДК) содержания ПАУ в продуктах питания.

Продукты питания	ПДК, мкг/кг	
	<i>бенз(а)пирен</i>	<i>сумма бенз(а)пирен, хризен бенз(а)антрацен, бензо(б)флуорантен.</i>
Масло и жиры (за исключением какао-масла и кокосового масла) для непосредственного употребления человеком или использования в качестве ингредиента в еде	2,0	10,0
Какао-бобы и производные продукты	5,0 начиная с 01.04.2013	35,0 начиная с 01.04.2013 до 31.3.2015 30,0 начиная с 01.04.2015
Кокосовое масло предназначенное для непосредственного употребления человеком или использование в качестве ингредиентов в продуктах питания	2,0	20,0
Копченые мясо и копченые мясные продукты	5,0 до 31.08.2014 2,0 начиная с 01.09.2014	30,0 начиная с 01.09.2012 до 31.08.2014 12,0 начиная с 01.09.2014
Мясо копченой рыбы и морских копченых продуктов. Максимальный уровень для ракообразных копченостей относится к их мышечной части.	5,0 до 31.08.2014 2,0 начиная с 01.09.2014	30,0 начиная с 01.09.2012 до 31.08.2014 12,0 начиная с 01.09.2014
Продукты для детского питания и детей младшего возраста	1,0	1,0
Продукты для питания новорожденных содержащие и не содержащие молоко	1,0	1,0
Пищевые продукты для диетического и специального питания	1,0	1,0

Основываясь на установленных критериях подхода в анализе ПАУ в Украинской лаборатории качества и безопасности продукции АПК Национального университета биоресурсов и природопользования разрабатывается методика по определению 4 ПАУ в растительных маслах. Определение БаП в растительных маслах (подсолнечном,

кукурузном, оливковом, льняном, масле семян тыквы и грецкого ореха) проводится по методике, прошедшей валидацию в 2011 году.

Отличительной особенностью применяемой методики является отсутствие стадии щелочного гидролиза. Для извлечения ПАУ из липидной матрицы применено разделение на сорбенте с различными функциональными группами, реализующими механизм специфического донорно-акцепторного связывания ПАУ. Колонка, заполненная сорбентом, вступающим в специфическое донорно-акцепторное взаимодействие (ДАВ) с молекулами ПАУ помещена непосредственно в хроматограф, что позволяет автоматизировать процесс извлечения ПАУ. В течении 20 минут проба масла подвижной фазой (изопропанол) перемещается по ДАВ колонке, за это время достигается полное разделение липидов и молекул ПАУ. ПАУ, сорбированные на колонке ДАВ, в течении последующих

40 минут обратным потоком в градиентном режиме (ацетонитрил-вода) элюируются и поступают на последовательно соединенные две хроматографические колонки. Процесс хроматографирования при инъекции 80 мкл масла проводится в условиях градиента, а детектирование – программируемого изменения длин волн в течении 50 минут.

Для проверки правильности работы хроматографической системы, применяемой в извлечении и разделении смесей ПАУ из различных липидных матриц, в течении года проводился хроматографический анализ тестовых растворов. Из полученных хроматограм вычислены и сопоставлены параметры, по которым проводится контроль показателей хроматографической системы. Так, например, по пику бензо(а)пирена, приведенном на рис. 1 контролировали: полноту извлечения аналита из масла, нарушения в упаковке хроматографической колонки и её эффективность.

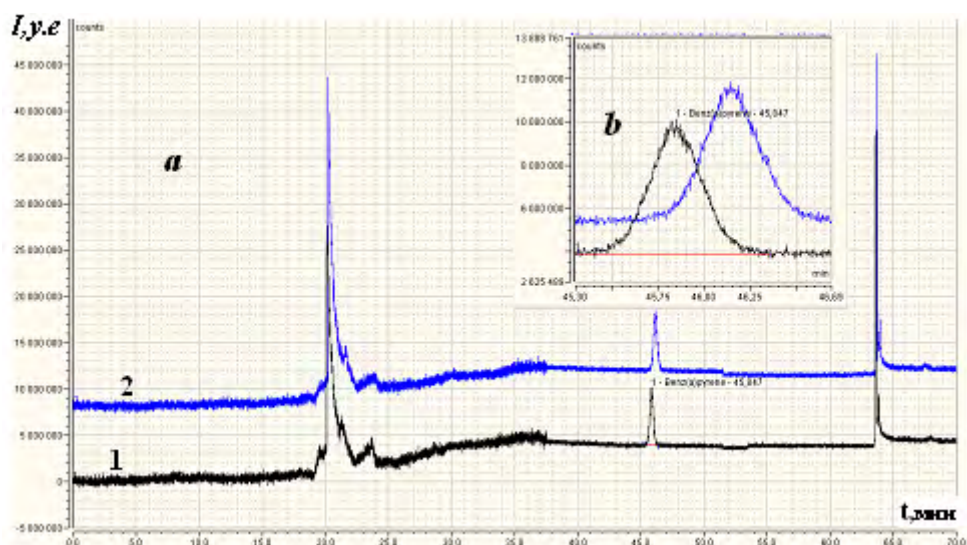


Рис.1. а) Хроматограмма матрицы подсолнечного масла, содержащей 2,0 мкг/кг БаП. Измерения выполнены: 1 - 10.06.2011; 2 - 14.06.2012.
б) Пик бензо(а)пирена (увеличение 1:5).

Практические задачи по установлению количества, регламентированного в Украине БаП, решались с использованием калибровок по стандартным образцам матрицы масла обогащенной БаП (рис.2).

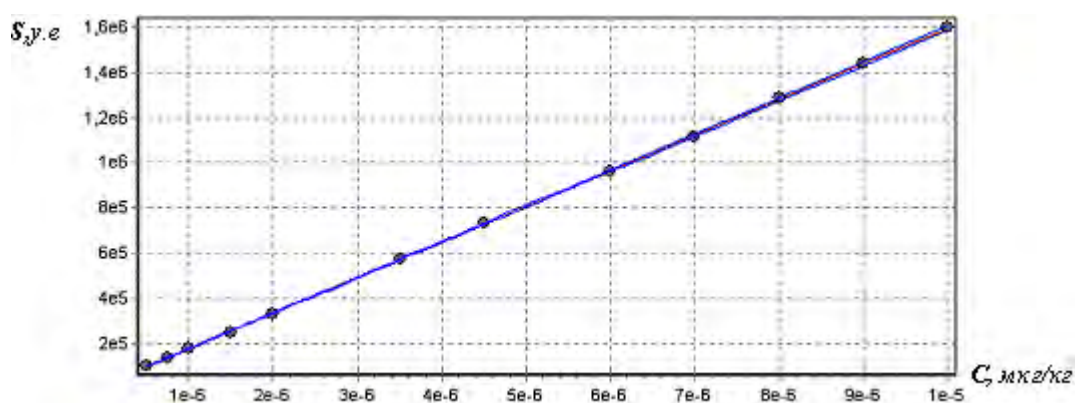


Рис. 2. Калибровочная зависимость интенсивности аналитического сигнала от количества БаП в матрице подсолнечного масла.

При инъекции 80 мкл калибровочных растворов масла линейная зависимость величины аналитического сигнала от концентрации БаП установлена в диапазоне концентраций от 0,5 мкг/кг до 10,0 мкг/кг (рис 2). Нижняя граница калибровки обусловлена нормами ПДК в жиросодержащих продуктах питания для новорожденных и детей младшего возраста, верхняя – фактической потребностью анализа загрязненных масел. Результаты измерений обработаны в программном пакете «Слайн» [17] и приведены в таблице 3.

Таблица 3.

Параметры уравнения регрессии зависимости интенсивности аналитического сигнала от концентрации БаП в подсолнечном масле.

Регрессия	$a + bx$
a =	18122 (95% дов.инт. $a \pm 3,73E3$)
b =	1,57744E11 (95% дов.инт. $b \pm 1,32E9$)
Ост. дисперсия S_y :	4326,5
СКО метода ($S_{xо} = S_y/b$):	2,74273E-8
Вариационный коэфф. $V_{xо} = S_{xо}/X_{ср}$ (%):	1,4579
Предел обнаружения:	9,4294E-8 ($X_c = 4,7147E-8$) Отн.Ед.
Критерий сходимости (d) для N=2,3,4 (%):	0,999922

Обнаружение бензо(а)пирена в растительных маслах (рис. 3, рис. 4) физико-химические показатели которых соответствовали требованиям соответствующих ГОСТов и заявленным ТУ, говорят о том, что масла не зависимо от технологии производства и жирнокислотного состава подвержены загрязнению БаП.

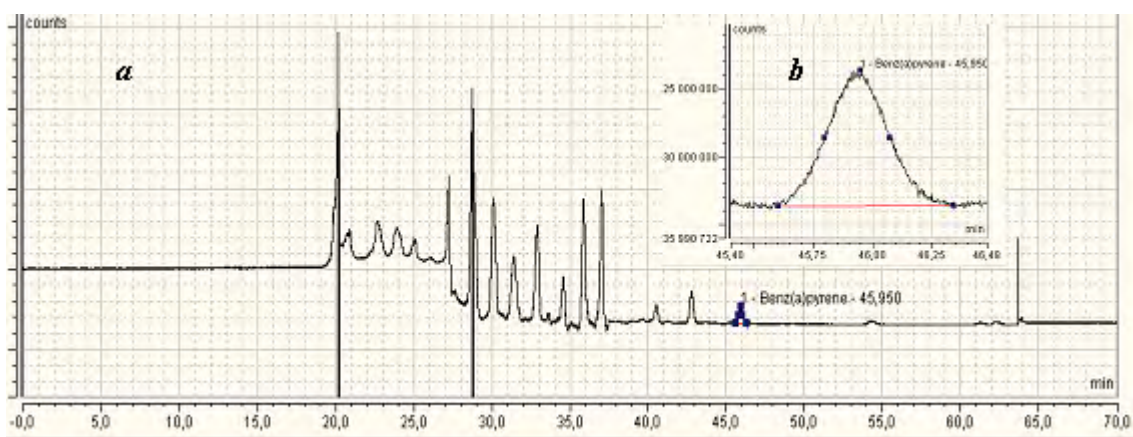


Рис. 3. Хроматограмма тыквенного масла (а), пик обнаруженного бензо(а)пирена (b) (увеличение 1:5).

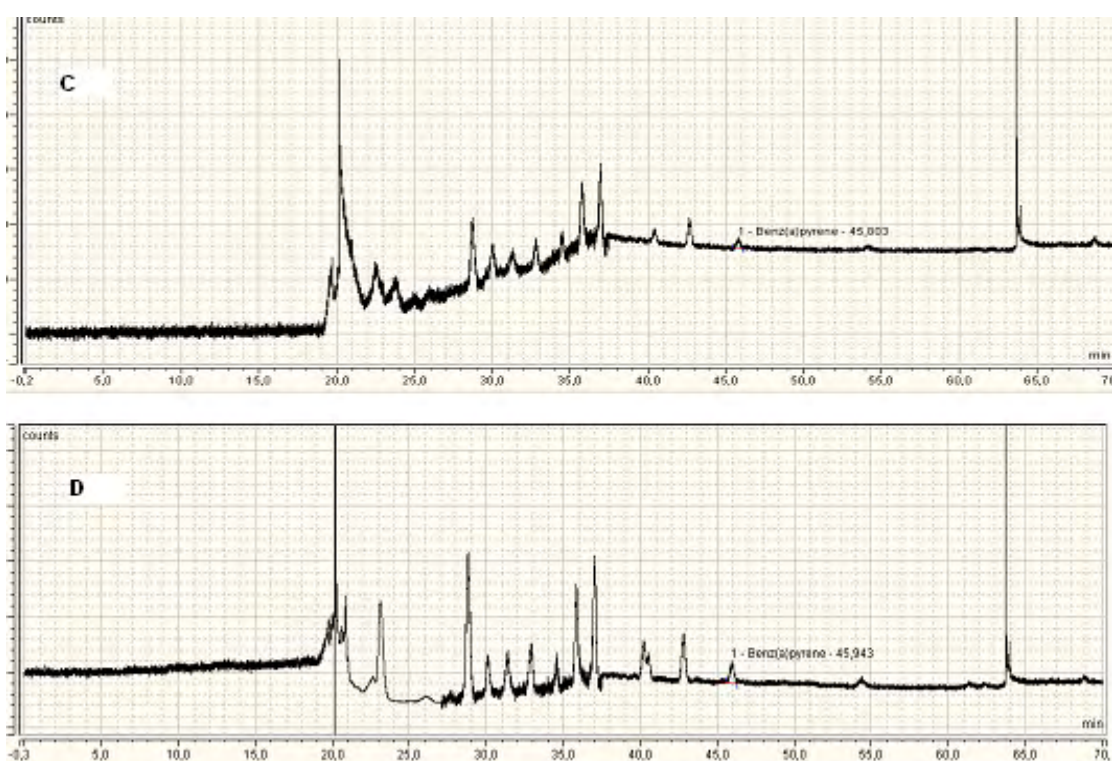


Рис. 4. Хроматограмма орехового (С) и льняного (D) масла.

Поскольку в процессе пробоподготовки в хроматографической системе остаются только соединения группы ПАУ, по внешнему виду хроматограм (рис.3, рис.4) можем предположить, что в данных маслах содержатся смеси разного качественного и количественного составов от 12 до 16 полиароматических соединений. Для идентификации обнаруженных ПАУ необходимо провести дополнительные хроматографические исследования, получить рабочие характеристики калибровочной функции в соответствии с ИСО 8466.

Таким образом, в работе исключая сложные и продолжительные этапы экстракции, отработана методика анализа массового содержания БаП в растительных маслах методом ВЭЖХ/ФЛД. Методика позволила, по сравнению с методикой ДСТУ 4689:2006, сократить продолжительность анализа в 8 раз, избежать потери аналита и достигнуть высокой

воспроизводимости результатов. Определение бензо(а)пирена в растительных маслах на уровне от 0,5 до 10,0 мкг/кг проводится с границей суммарной относительной ошибки измерения $\pm 20\%$. Точность метода и стабильность в работе хроматографической системы подтверждена полученными удовлетворительными метрологическими характеристиками. Разработанная методика успешно применялась при выполнении межлабораторных сравнений на протяжении 2011-2012 гг, что подтверждает соответствие требованиям ДСТУ 17025 и ЕС SANCO 12495-2011.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Шабад Л.М., Дикун П.П.** Загрязнение атмосферного воздуха канцерогенным веществом - 3,4-бензпиреном./ - Л.: МЕДГИЗ.- 1959. - 240 С.
2. **Ровинский Ф. Я., Теплицкая Т. А., Алексеева Т. А.** Фоновый мониторинг полициклических ароматических углеводородов.- Л.: Гидрометеоиздат. - 1988. - 224 С.
3. **Миллер С.В., Кацнельсон Б.А., Величковский Б.Г.** О нормировании предельно допустимых концентраций канцерогенных веществ // Гигиена и санитария. – 1969. - № 3. – С. 84-87.
4. **Шабад Л. М.** О циркуляции канцерогенов в окружающей среде. М.: Медицина. - 1973.-367 с.
5. Polycyclic aromatic hydrocarbons study and toxic equivalency factor (TEFs) in Tehran, IRAN F. Halek, Gh. Nabi and A. Kavousi // Environmental Monitoring and Assessment Volume 143. - Numbers 1-3 (2008) . - P. 303-311
6. Національна комісія України з Кодексу Аліментаріус. Рішення № 0014/0004 від 03.11.2009 «Щодо можливості введення регламентів вмісту бенз(а)пірену у харчових продуктах».
7. Commission Regulation (EU) No 834/2011 of 19 August 2011 amending Annex I to Regulation (EC) No 689/2008 of the European Parliament and of the Council concerning the export and import of dangerous chemicals
8. Содержание 3,4-бензпирена в семенах подсолнечника и продуктах их переработ./ Григоренко Л.Т., Дикун П.П., Калинина И.А. и др.// Труды ВНИИЖ . - 1970. вып 27. – С. 32-41.
9. ДСТУ 4689:2006 «Продукти харчові. Методи визначання масової частки бенз(а)пірену»
10. ISO/AWI 24054, Animal and vegetable fats and oils – determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) – method using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) (2004).
11. **Van Stijn, F. Kerkhoff, M. A. Vandeginste, B. G.** Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Edible Oils and Fats by On-Line Donor-Acceptor Complex Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection.// J. Chromatogr. A. - 1996,- V 750 . - P. 263–273.
12. **Barranco A., Alonso-Salces R. M., Corta E** Comparison of Donor–Acceptor and Alumina Columns for the Clean-Up of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Edible Oils. /Barranco A., Alonso-Salces R. M., Corta E.// Food Chem. . - 2004, . - 86, . - P. 465–474
13. ISO 22959:2009 Animal and vegetable fats and oils - Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by on-line donor-acceptor complex chromatography and HPLC with fluorescence detection
14. **Philippe Verlinde, Thomas Wenzl** Determination of the 15+1 EU Priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in chocolate by liquid chromatography hyphenated to dopant assisted atmospheric pressure photo ionization tandem mass spectrometry // 5th

- International Symposium on recent advances in food analysis. November 1–4, 2011. - /Prague.Czech Republic. - P.98.
15. **Alena Bednarikova, Božena Sklaršova, Emil Kolek** Benzo[a]pyrene photolysis – quest to identify some of products by HPLC–MS–MS // 5th International Symposium on recent advances in food analysis. November 1–4, 2011/. - Prague.Czech Republic . - P.342.
 16. **Отто М.** Современные методы аналитической химии (в 2-х томах). / Пер. с нем. и под ред. А.В. Гармаша.- Т.1. М.: Техносфера, 2003. . - 412 с. ; Т.2. М.: Техносфера, 2004. 281 с.
 17. **В.Н.Макарчук.** Статистическая обработка измерений и построение калибровочных зависимостей. Программа «Слайн». Версия: 3.1.2.51/06.2006

*Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК Національного
університету біоресурсів і природопольовання України.*

*Надійшло до редакції
21.02.3013*