

УДК 664:665.1/7:539:542/543

КІЩЕНКО В.А.¹, ЛЕВЧУК І.В.¹, ЄСАУЛЕНКО А.М.², ТАНАСОВ І.І.²

ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ БЕНЗ[а]ПІРЕНУ В ОЛІЯХ ТА ЖИРАХ З ВИКОРИСТАННЯМ АНАЛІЗАТОРА AGILENT 1200

В статті представлено визначення бенз[а]пірену та інших поліциклічних ароматичних вуглеводнів (ПАВ) на основі високоефективного рідинного аналізатора Agilent 1200. Описано принцип визначення ПАВ в оліях та олієжировмісних продуктах за допомогою on-line донорно-акцепторної комплексної хроматографії і ВЕРХ з флюоресцентним детектуванням на аналізаторі Agilent 1200 в порівнянні з аналізатором згідно ISO 22959.

Ключові слова: аналізатор, ПАВ, бенз[а]пірен, донорно-акцепторна комплексна хроматографія, олії, олієжировмісні продукти.

В статье представлено определение бенз[а]пирена и других полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) на основе высокоэффективного жидкостного анализатора Agilent 1200. Описан принцип определения ПАУ в маслах и масложиродержащих продуктах при помощи on-line донорно-акцепторной комплексной хроматографии и ВЭЖХ с флюоресцентным детектированием на анализаторе Agilent 1200 в сравнении с анализатором согласно ISO 22959.

Ключевые слова: анализатор, ПАУ, бенз[а]пирен, донорно-акцепторная комплексная хроматография, масла, маслосодержащие продукты.

In the article the methods of determination of benz[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons on the basis of high efficient liquid analyzer Agilent 1200 is presented. The principle of determination of PAH in the oils and fats with using of donor-acceptor complex chromatography and HPLC with fluorescent detection on the Agilent 1200 analyzer is described. The proposed method is compared with standard method described into ISO 22959.

Key words: analyzer, PAH, benz[a]pyrene, donor-acceptor complex chromatography, plant's fats and oil.

Вступ

Бенз[а]пірен – онкогенна речовина, що належить до поліциклічних ароматичних вуглеводнів (ПАВ), які утворюються при взаємодії високої температури на деякі органічні речовини. Як відомо з практики підприємств олійножирової галузі, експортуючих рослинну олію, серед інших органічних екотоксикантів контролюється саме вміст бенз[а]пірену.

Удосконалення методів, розробки і впровадження сучасних методів визначення поліциклічних ароматичних вуглеводнів (ПАВ) у оліях, олієжировмісних продуктах та насінні олійних культур є актуальним для здійснення контролю забруднення харчових продуктів.

Аналіз літературних джерел

Поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ) є розповсюдженими забруднювачами рослинних олій та харчових продуктів на їх основі [1, 2].

Найважливішим шляхом розповсюдження поліциклічних ароматичних вуглеводнів, у тому числі бенз[а]пірену, є перехід з атмосфери в ґрунт, водойми і рослини за рахунок седиментації і атмосферних опадів твердих часточок, що містять ПАВ.

В рослинні олії та інші продукти ці сполуки потрапляють з навколишнього середовища [3, 4, 5]. Найвірогіднішим шляхом надходження ПАВ в насіння олійних культур є сушка димовими газами, що містять продукти неповного згорання палива, у тому числі і ПАВ [6]. Значна кількість ПАВ утворюються при спалюванні сміття, нафтопродуктів. Встановлено, що 95 % бенз[а]пірену міститься в насінні олійних культур [7, 8, 9, 10, 11].

Наявність бенз[а]пірену в харчових продуктах розглядається як маркер забруднення канцерогенними ПАВ. На теперішній час в країнах ЄС приділяють багато уваги показникам безпеки олієжировмісних продуктів, у тому числі вмісту бенз[а]пірену в рослинних оліях. Директива Комісії ЄС 208/2005/ЄС жорстко регламентує вміст поліциклических ароматичних вуглеводнів у харчових продуктах. Зокрема, бенз[а]пірену в жирах і рослинних оліях може міститися не більше 0,002 мг/кг [12].

Для захисту здоров'я споживачів необхідно максимально обмежити кількість бенз[а]пірену в окремих харчових і спеціальних продуктах, особливо з підвищеним вмістом рослинних олій, жирів, модифікованих жирів, а також у продуктах, при виробництві яких процеси копчення або висушування можуть призвести до високого рівня забрудненості [13, 14].

Для визначення бенз[а]пірену використовують, як правило, наступні хроматографічні методи: газорідинну хроматографію з полум'яно-іонізаційним детектором (ГРХ), газорідинну хроматографію з мас-селективним детектором (ГРХ/МС), високоефективну рідинну хроматографію з флуоресцентним детектором, високоефективну рідинну хроматографію з діодноматричним детектором (ВЕРХ/УФ) і флуоресцентним детектором, з'єднаних послідовно. Основні вимоги, які пред'являють до методів визначення ПАВ в оліях і олієжировмісних продуктах – висока чутливість і селективність. Флуоресцентний і мас-селективний детектори мають високу селективність, разом з тим чутливість флуоресцентного детектора в 50-100 разів вище, ніж у мас-селективного, що дозволяє зменшити масу аналітичної проби, збільшити кінцевий об'єм підготовленої проби і призводить до значного зменшення впливу матриці на якість дослідження. Ультрафіолетовий і полум'яно-іонізаційний детектори в цих випадках не дають ні високої чутливості, ні високої селективності, у зв'язку з чим їх використання для проведення досліджень ПАВ обмежено дослідженням відносно простих за складом зразків з достатньо високим вмістом ПАВ (>50 мкг/кг).

Європейські нормативи потребують використання більш чутливих та селективних методів, які дозволяють проводити кількісне визначення кожного ПАВ на рівні 1-5 мкг/кг. Міжнародними стандартами (ISO 22959) для визначення ПАВ в оліях та олієжировмісних продуктах встановлено такі методи, як високоефективна рідинна хроматографія та метод on-line донорно-акцепторної комплексної хроматографії в з флуоресцентним детектуванням. Принцип визначення ПАВ в оліях та олієжировмісних продуктах за допомогою on-line донорно-акцепторної комплексної хроматографії і ВЕРХ з флуоресцентним детектуванням полягає в елююванні зразка олії через колонку з модифікованою стаціонарною фазою, яка виступає акцептором електронів, ця колонка утримує ПАВ. Після елюювання олії ПАВ переносять on-line в аналітичну колонку з оберненою фазою. Індивідуальні ПАВ визначають на різних довжинах хвиль. Ідентифікацію здійснюють за часом утримування. Кількісний аналіз здійснюють методом зовнішнього градування. Нижня межа кількісного визначення складає 0,1 мкг/кг [15]. Метод характеризується високою чутливістю та селективністю (рис. 1).

Таким чином, необхідна гармонізація стандартів, що полягає у приведенні стандарту та його вмісту у відповідність з іншим стандартом для забезпечення взаємозамінності послуг, взаємного розуміння результатів випробувань і інформації, яка є в стандартах.

Оскільки рослинні олії дуже широко використовують у виробництві харчових продуктів, для зниження в цих продуктах вмісту бенз[а]пірену, насамперед, необхідно знизити його вміст в оліях.

Мета та завдання досліджень: удосконалити технологічні процеси визначення ПАВ, а також удосконалити та модернізувати методи визначення бенз[а]пірену для надійної його ідентифікації та кількісного вимірювання і тим самим забезпечити виконання прийнятої міжнародної норми, яка складає 2 мкг/кг. Це дозволить не перевищувати рівня допустимого ризику при використанні рослинних олій в харчовому раціоні і тим самим знизити загрозу токсичної та канцерогенної дії ПАВ на організм людини.

Результати досліджень та їх обговорення

Конфігурація рідинного хроматографа та технологічна схема, представлена в стандарті ISO 22959 (рис. 1), передбачає використання двох градієнтних насосів, трьох кранів-перемикачів потоків і трьох хроматографічних колонок. Незважаючи на складність аналітичної системи, тривалість процесу підготовки проб і самого аналізу становить 90 хвилин. При цьому виключаються будь-які втрати аналітів. В якості підготовки проби пропонується розбавлення зразків ізопропанолом в різних пропорціях, залежно від природи олії або жиру. Потім зразок відфільтровують через фільтр (0,45 мікрон), після чого проба готова до досліджень.

На першій стадії підготовлена проба, за допомогою допоміжного насосу високого тиску і автосамплера, вводиться в аналітичну систему і потрапляє безпосередньо на унікальну хроматографічну колонку DACC (80 × 3.0 мм × 5 мкм CP28159), яка заповнена сорбентом з яскраво вираженими π-акцепторними властивостями. Оскільки планарні молекули всіх ПАВ є π-донорами, між аналітом і сорбентом утворюються хімічні зв'язки, досить міцні, щоб відокремити ПАВ від матриці олії в потоці ізопропанолу.

На наступній стадії ізопропанол замінюють на елюент ацетонітрил / вода і відфільтровані ПАВ переходять з DACC колонки в дві послідовно з'єднані хроматографічні колонки (Eclipse PAK 4.6 × 250мм × 5 мкм, каталожний номер 959990-918) і аналізуються за допомогою флуоресцентного детектора. Хроматографічний процес розділення ПАВ відбувається з використанням основного градієнтного насосу.

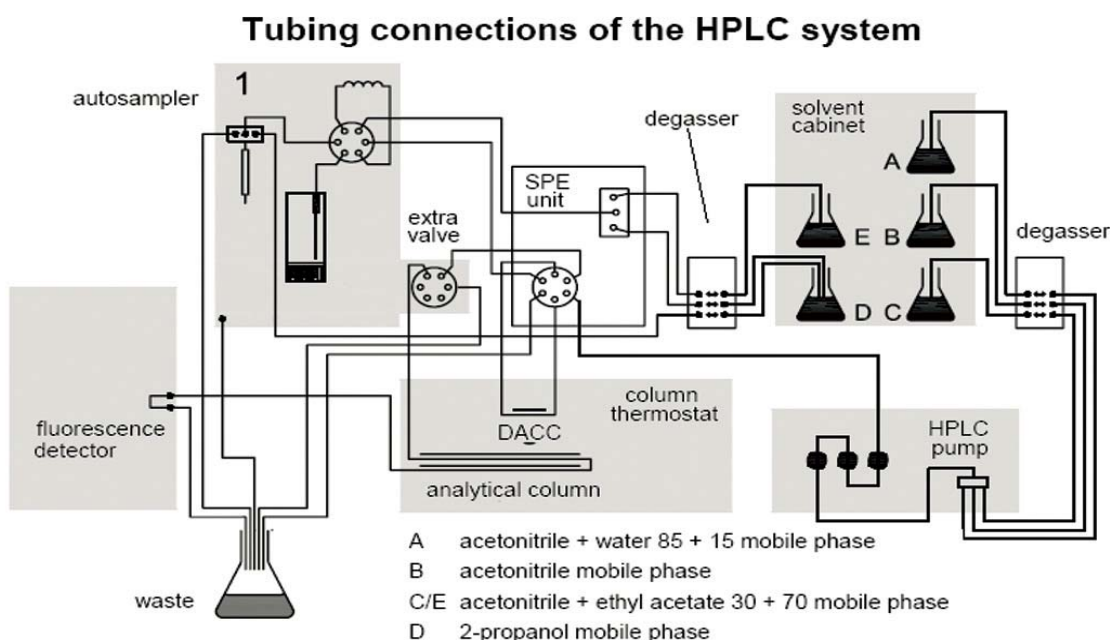


Рис. 1. Схема аналізатора ПАВ, на основі рідинного хроматографа, представлена в стандарті ISO 22959

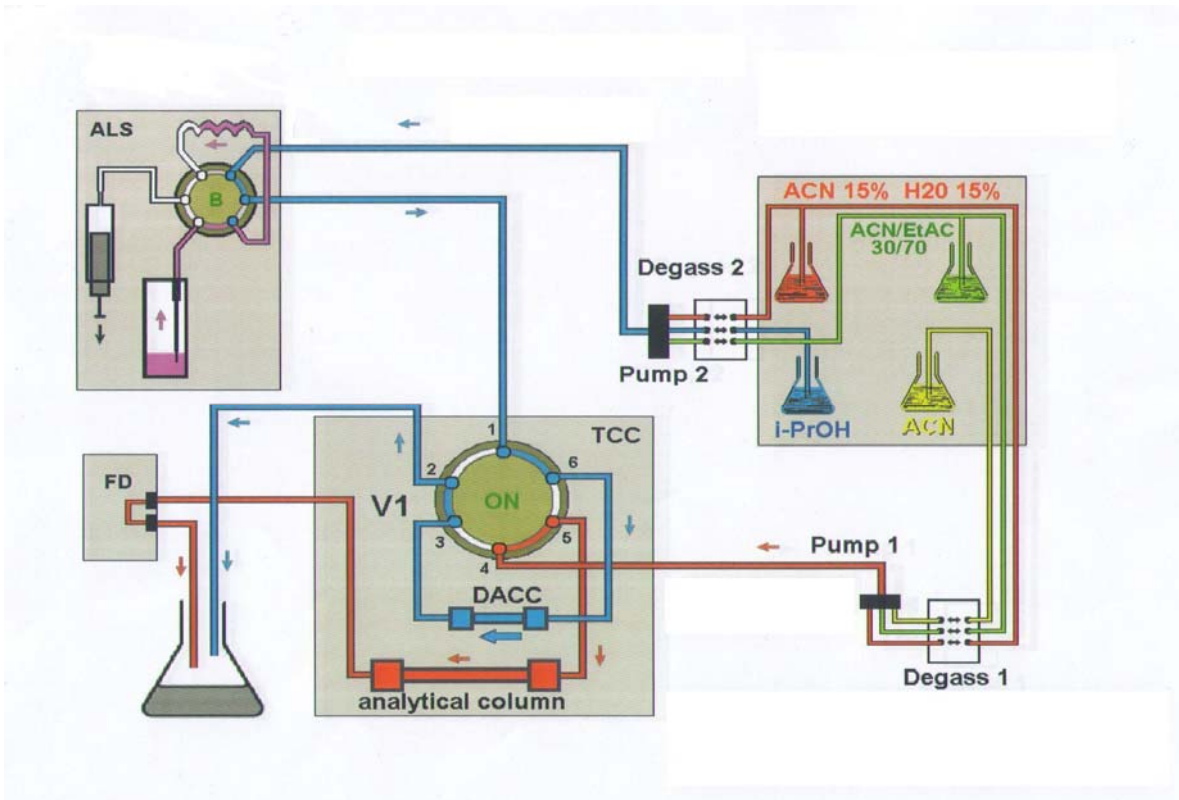


Рис. 2А. Схема аналізатора ПАВ на основі рідинного хроматографа Agilent 1200 в режимі on, яка дозволяє відтворити процедуру аналізу, описану в стандарті ISO 22959

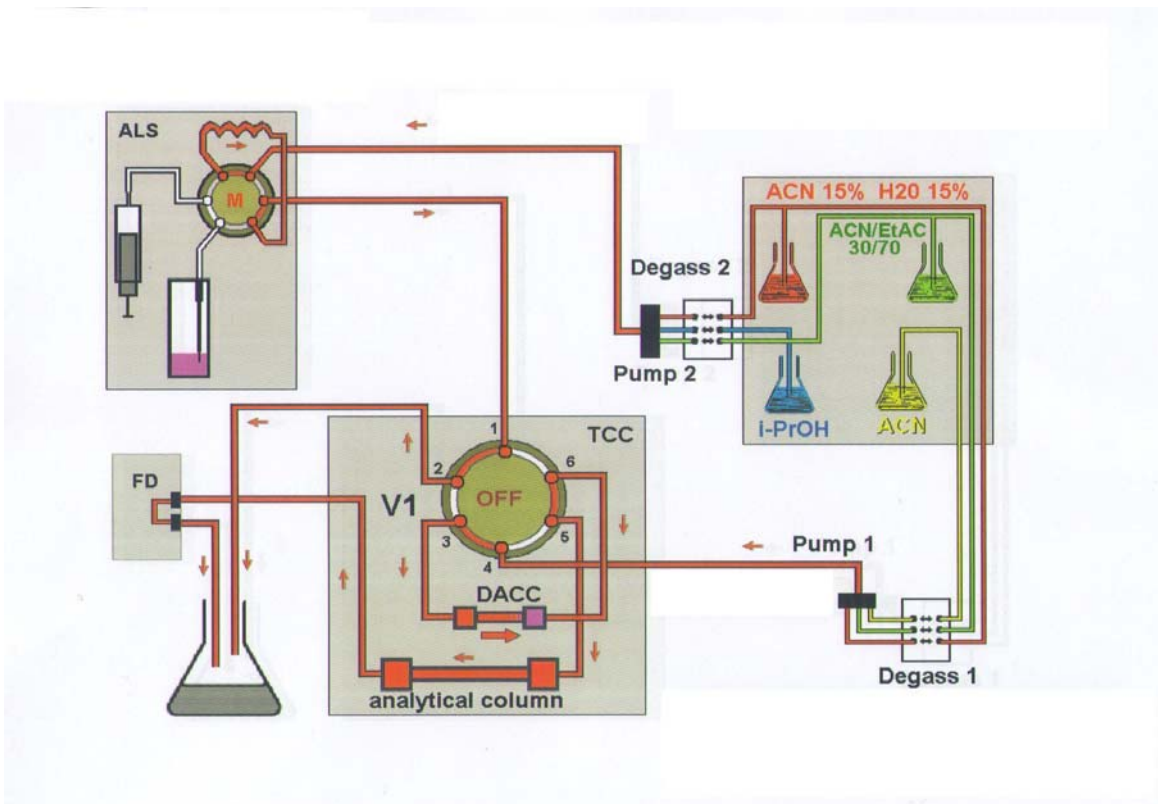


Рис. 2Б. Схема аналізатора ПАВ на основі рідинного хроматографа Agilent 1200 в режимі off, яка дозволяє відтворити процедуру аналізу, описану в стандарті ISO 22959

Аналізуючи принцип роботи аналітичної системи (рис. 1), яка представлена в ISO 22959, нами було виявлено недоліки, а саме:

- через наявність трьох кранів збільшується кількість капілярів, що призводить до виникнення «мертвих» об'ємів, що, в свою чергу, є причиною розмивання піків аналітів;
- це моноблочна система, яка розрахована лише під одне аналітичне завдання, а саме дослідження ПАВ.

Відповідно до аналітичних досліджень, що проводяться випробувальними лабораторіями, які здійснюють дослідження олій та жирів за показниками безпеки, було удосконалено технологічну схему рідинного хроматографа на основі аналізатора Agilent 1200.

На рис. 2А та 2Б представлено схеми аналізатора ПАВ на основі рідинного хроматографа Agilent 1200 в режимі «on» та «off» (включений та виключений), що дозволяє відтворити процедуру аналізу, описану в стандарті ISO 22959. В результаті досліджень встановлено переваги однокранової системи: зменшена кількість капілярів і, відповідно, зменшена кількість «мертвих» об'ємів, що запобігає розмиванню хроматографічного профілю аналітів. Це суттєво важливо при проведенні кількісних аналізів. Однак недоліком даної системи є неможливість промивання ДАСС колонки зворотнім потоком елюенту на злив.

Для градувальних графіків, побудованих для діапазону концентрацій 0,1 – 30 ppb, характерна лінійна залежність. Нижня межа виявлення бенз[а]пірену становить приблизно 0,05 ppb, що цілком достатньо для проведення кількісного аналізу на рівні, визначеному Європейським законодавством (2,0 ppb).

Досвід експлуатації приладу показав, що методика працює надійно. Крім зразків соняшникової олії методика була випробувана на зразках рапсової олії і пальмового жиру. Оскільки всі стадії і підготовка проб відбуваються всередині однієї автоматизованої аналітичної системи, зменшуються витрати часу для підготовки проби.

Індивідуальні ПАВ визначаються за різних довжин хвиль. Ідентифікація здійснюється за часом утримування. Кількісний аналіз здійснюється методом зовнішнього градування. Мінімальна межа кількісного визначення методу складає 0,1 мкг/кг (рис. 3).

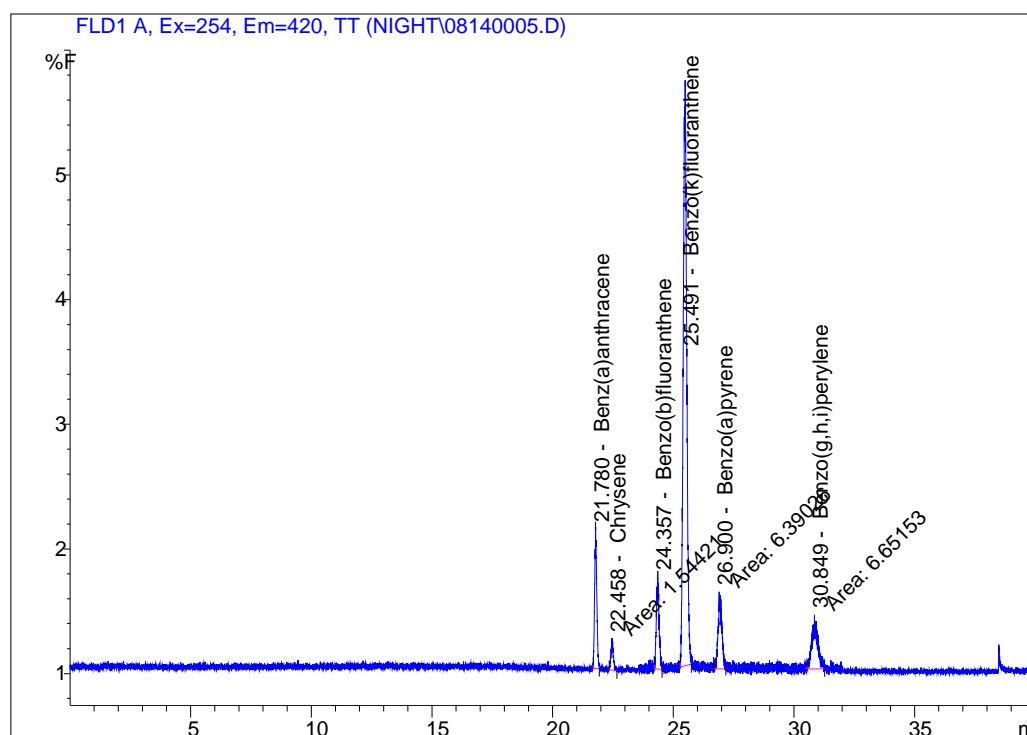


Рис. 3. Хроматограма суміші ПАВ на рівні 0,1 мкг/кг

Приведений вище метод дозволяє звільнитись від складної підготовки зразків для досліджень та уникнути втрати ПАВ в порівнянні з іншими хроматографічними методами, які потребують застосування специфічних реагентів, тривалої підготовки проби, дотримання певних умов при проведенні досліджень (рис. 4, 5).

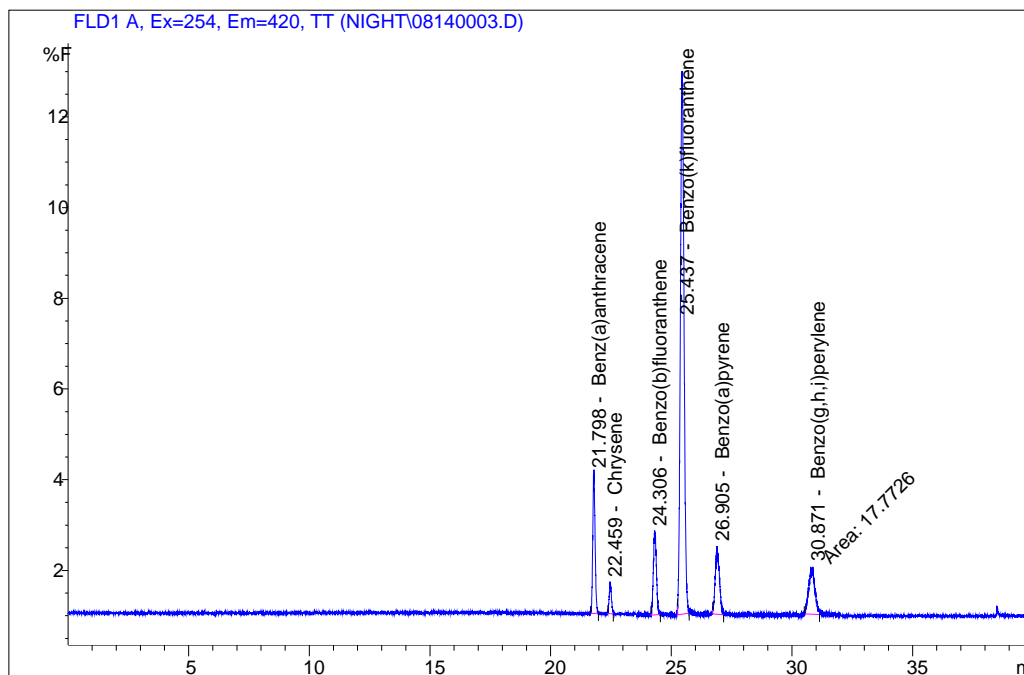


Рис. 4. Хроматограма суміші ПАВ на аналізаторі Agilent 1200

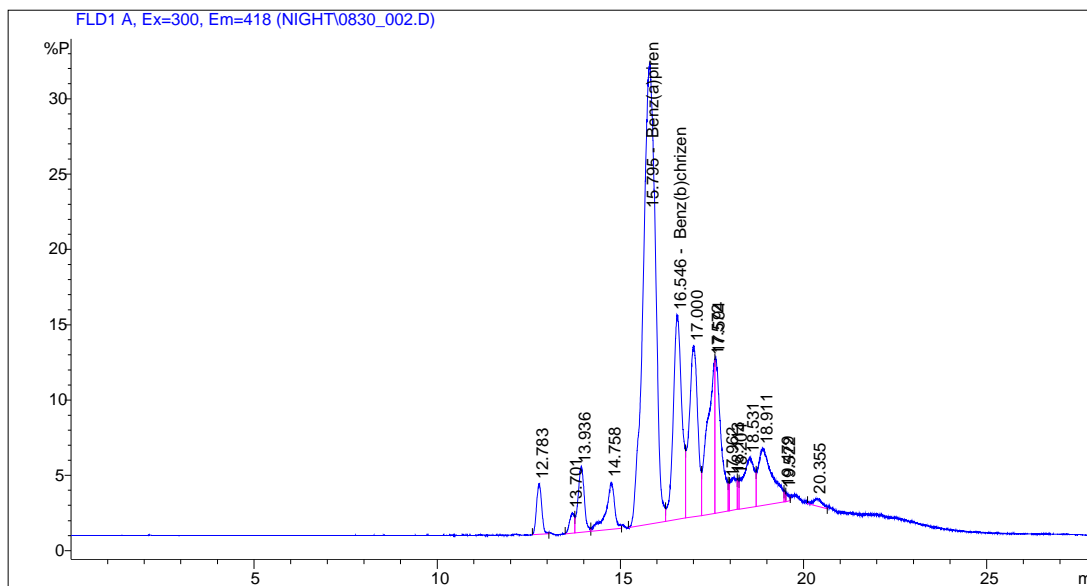


Рис. 5. Хроматограма олії соняшникової з вмістом бенз[а]пірену та інших ПАВ за ДСТУ 4689:2006, отримані методом ВЕРХ (флуоресцентний детектор)

Для оцінки точності отриманих результатів нами використано проби з добавками та внутрішньолабораторні контрольні зразки з відомою масовою часткою бенз[а]пірену на рівні максимально допустимих. Нами вибрано зразок із вмістом бенз[а]пірену 2,7 мкг/кг результати досліджень наведено на рис. 6.

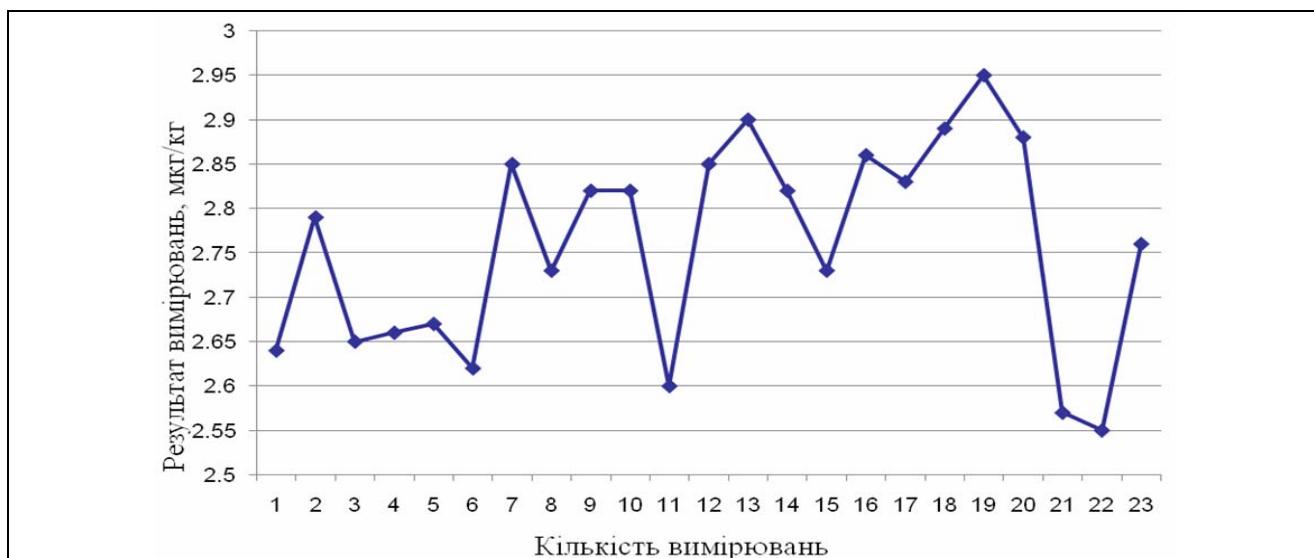


Рис. 6. Результати досліджень контрольного зразка олії соняшникової за допомогою аналізатора Agilent 1200

За результатами проведених 23 досліджень внутрішньо-лабораторного контрольного зразка визначено відносне середньоквадратичне відхилення (СКВ), що дорівнює 4,2 %. Отриманий результат свідчить про те, що відтворюваність результатів досліджень, отриманих за допомогою донорно-акцепторної хроматографії, порівняно з іншими методами, дозволяє зменшити похибку вимірювань більше ніж у десять разів.

Висновки

В результаті аналізу результатів проведеної валідації інструментальних методів та методик контролю бенз[а]пірену в технології олієжирової сировини, рослинних олій, олієжирових і олієжировмісних продуктів виявлено потребу в наявності ефективних і точних методів визначення вмісту ПАВ в рослинних оліях та олієжировмісних продуктах. Встановлено, що використання аналізатора Agilent 1200 за допомогою донорно-акцепторної хроматографії забезпечує підвищення точності та достовірності результатів досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. New EU rules on PAH levels in food, mainly on benzo(a)pyrene: IP/04/1211. – Brussels, 2004. – 1 p.
2. **Lacoste F.** Undesirable Compounds And Contaminants In Fats And Oils In Fats And Oils Processing And Utilization // French Institute for Fats and Oils PESSAC: France AOCS / IUPAC Workshop, 6 – 8 December, 2004. –Tunis, 2004. – P. 2.
3. **Lijinsky W., Ross AE.** Production of carcinogenic polynuclear hydrocarbons in the cooking of food // Food Cosmet Toxicol. – 1967. – Vol. 5. – P. 343-347.
4. **Lo M.T, Sandi E.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (polynuclears) in foods // Residue Rev. – 1978. – Vol. 69. – P. 35-86.
5. **Dennis M. J., Massey R. C., Cripps G. [et al.]** Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereals, fats and other food products // Food Addit. Contam. – 1991. – Vol. 8. – P. 517-530.
6. **Григоренко Л. Т.** Исследование загрязнения пищевых растительных масел 3,4 бензпиреном и изыскание путей выведения из них: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. техн. наук : спец. 05.02.08 «Химия». – Л., 1973. – 20 с.

7. **Lodovici M., Dolara P., Casalini C. [et al.]** Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet // Food Addit Contam. – 1995. – Vol. 12. – P. 703-713.
8. **Dennis M.J., Massey R.C., McWeeny D.J. [et al]** Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets // Food Chem Toxicol. – 1983. – Vol. 21. – P. 569-574.
9. Содержание 3,4-бензпирена в семенах подсолнечника и продуктах их переработки / [Григоренко Л. Т., Дикун П. П., Калинина И. А. и др.] ; под ред. В. П. Ржехина // Труды ВНИИЖ, 1970. – вып. 27. – С. 32-41.
10. **Кобервейн Ю. М., Кошеватская Л. А., Иванова А. А. [и др.]** К вопросу о накоплении 3,4—бензпирена в семенах подсолнечника при сушке // Масложировая промышленность. – 1976. – № 3. – С. 17-19.
11. **Grimmer G., Hilderbrandt A.** Content of polycyclic hydrocarbons in crude vegetable oils // Chem. and Ind. – 1967. – № 47. – P. 2000-2002.
12. Setting maximum levels contaminants in foodstuffs: Commission Regulation (EC) No 466/2001. - [of 8 March 2001]. – OJ L 77, 16.3.2001. – P. 109
13. **Голодняк В., Граница Н., Григорова Л. [и др.]** К вопросу о регламентации содержания 3,4 бензпирена в растительном масле и жирах // Збірник праць УкрНДІОЖ УААН. – 2007. – випуск 1. – С. 107.
14. **Голодняк В., Граница Н., Григорова Л. [и др.]** О проблеме содержание 3,4 бензпирена в растительном масле и жирах // Олійно-жировий комплекс. – 2007. – № 3. – С. 55.
15. Продукти харчові. Методи визначення масової частки бенз[а]пірену : ДСТУ 4689:2006. – [Чинний від 2006-01-01]. – К. : Держспоживстандарт України, 2006. – 231 с. - (Національний стандарт України).

¹ Науково-дослідний центр випробувань продукції ДП “Укрметртестстандарт”, м. Київ

² Науково-виробнича компанія Алсі-Хром, м. Київ

Надійшло до редакції
17.10.2014