

Određivanje PAH4 jedinjenja u dimljenom mesu i dimljenim proizvodima od mesa – razrada metode

Dinović-Stojanović Jasna¹, Stišović Jelena², Popović Aleksandar², Nikolić Dragica¹, Janković Saša¹

S a d r ž a j: Dimljeno meso i proizvodi od mesa zauzimaju važno mesto u ishrani stanovništva u Srbiji. S obzirom, da tokom dimljenja tj. procesom sagorevanja drveta nastaju policiklični aromatični ugljovodonici (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAH), koji su klasifikovani kao karcinogena i mutagena jedinjenja, proučavanje ovih jedinjenja uvek zaokuplja pažnju javnosti. Na osnovu podataka, koji su rezultat novih bioloških i toksikoloških naučnih istraživanja, evropska naučna komisija o zagađivačima u lancu ishrane je u junu 2008. godine predložila da se suma sadržaja benzo[a]pirena, benzo[a]antracena, benzo[b]fluorantena i hrizena, tj. PAH4 jedinjenja koristi kao marker prisustva drugih PAH jedinjenja u različitoj hrani. Ovi predlozi postali su deo zakonske regulative, kako Evropske unije, tako i Srbije. Zakonska regulativa Srbije, koja je u saglasnosti sa propisima EU, od 1. septembra 2014. godine definiše maksimalno dozvoljenu količinu (MDK) za sumu sadržaja PAH4 jedinjenja (12 µg/kg), kao i za sadržaj benzo[a]pirena (2 µg/kg) u dimljenom mesu i proizvodima od mesa. U ovom radu razvijena je metoda za određivanje benzo[a]pirena, benzo[a]antracena, benzo[b]fluorantena i hrizena tj. PAH4 jedinjenja u dimljenom mesu i proizvodima od mesa. Za ekstrakciju lipida i lipofilnih jedinjenja iz uzoraka korišćena je ubrzana ekstrakcija pomoću rastvarača. Ekstrakcija na čvrstoj fazi je korišćena kao postupak za uklanjanje molekula lipida iz ispitanih uzoraka. Identifikacija i kvantifikacija benzo[a]pirena, benzo[a]antracena, benzo[b]fluorantena i hrizena rađena je korišćenjem visokoeфикаsne tečne hromatografije sa fluorescentnim detektorom (HPLC-FL). Primenjeni su različiti uslovi HPLC analize (mobilna faza, HPLC kolona, temperatura peći, protok mobilne faze) u cilju postizanja optimalnih uslova za kvalitativnu i kvantitativnu analizu PAH4 jedinjenja.

Кljučне речи: PAH4 jedinjenja, benzo[a]antracen, hrizen, benzo[b]fluoranten, benzo[a]piren.

Uvod

Policiklični aromatični ugljovodonici, tj. PAH jedinjenja (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAH) pripadaju grupi perzistentnih organskih zagađivača (Persistent Organic Pollutants, POP), tj. klasi organskih jedinjenja koja su, u različitoj meri, otporna na fotolitičku, biološku i hemijsku degradaciju.

Najznačajniji prirodni izvori nastanka ovih jedinjenja su šumski požari i vulkanske erupcije (Nikolaou i dr., 1984). Najvećim delom PAH jedinjenja dospevaju u životnu sredinu od antropogenih izvora zagađenja, kao što je automobilski saobraćaj (Lim i dr., 2007), sagorevanje organskog materijala na poljoprivrednim zemljištima (Conde i dr., 2005), sagorevanje različite vrste drveta (Djinovic-Stojanovic i dr., 2013), industrija nafte (Rao i dr., 2008), itd. Sagorevanje drveta tokom procesa dimljenja mesa je najznačajniji izvor kontaminacije

ove hrane PAH jedinjenjima. Sadržaj PAH jedinjenja u dimljenim proizvodima od mesa, zavisi od više faktora, kao što su vrsta drveta, dostupnost kiseonika tokom procesa dimljenja, temperatura na kojoj se generiše dim i vreme dimljenja (SCF, 2002). Takođe, utvrđeno je, da je u različitim vrstama mesa dimljenim pod istim uslovima sadržaj PAH jedinjenja različit (Djinovic i dr., 2008).

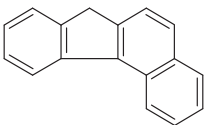
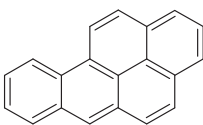
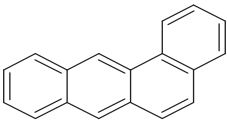
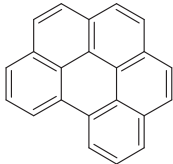
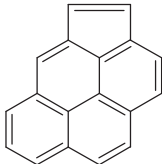
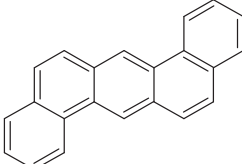
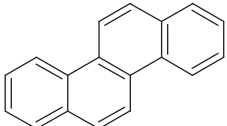
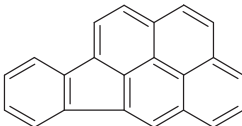
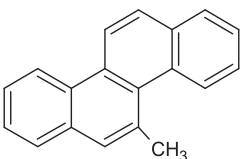
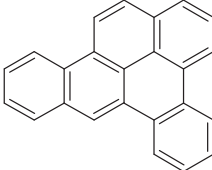
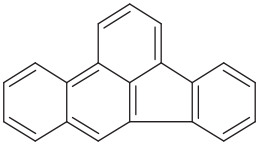
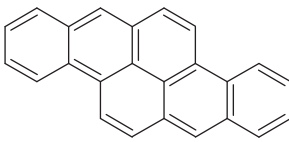
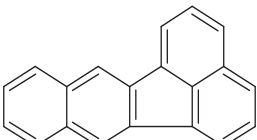
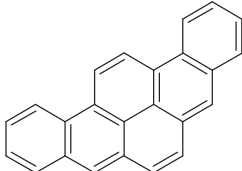
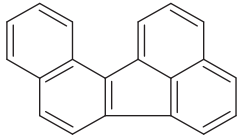
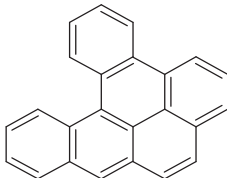
Proučavanje policikličnih aromatičnih jedinjenja u dimljenom mesu i proizvodima od mesa zaokuplja posebnu pažnju naučne javnosti, s obzirom na činjenicu da su neka PAH jedinjenja klasifikovana kao karcinogena i mutagena (IARC, 2010). Svetska zdravstvena organizacija, u okviru Internacionalne agencije za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer, IARC), proučava biološku aktivnost različitih jedinjenja. Na osnovu dobijenih rezultata, izdaju se monografije (IARC, 1987, 1989, 1996, 2010) u kojima se proučavana jedinjenja klasifikuju

Napomena: Rezultati su proistekli iz rada na realizaciji projekata ev. br. III 46009, koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

¹Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Kačanskog 13, 11000 Beograd, Republika Srbija;

²Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Studentski trg, 11000 Beograd, Republika Srbija.

Autor za kontakt: Dinović-Stojanović Jasna, jasna@inmesbgd.com

| | | | |
|---|---|---|---|
| Benzo[c]fluoren/ benzo [c]fluorene, BcL , - |  | Benzo[a]piren/ benzo[a]pyrene, BaP Grupa/Group 1 |  |
| Benzo[a]antracen/ benz[a]anthracene, BaA Grupa/Group 2B |  | Benzo[g,h,i]perilen/ Benzo[g,h,i]perylene, BgP - |  |
| Ciklopenta[c,d]piren/ Cyclopenta[c,d]pyren, CPP Grupa/Group 2A |  | Dibenzo[a,h]antracen/ Dibenz[a, h]anthracene, DhA Grupa/Group 2A |  |
| Hrizen/Chrysene, CHR Grupa/Group 2B |  | Indeno[1,2,3-cd]piren/ Indeno[1,2,3-cd]pyrene, IcP Grupa/Group 2B |  |
| 5-metilhrizen/ 5-methyl-chrysene, 5MC Grupa/Group 2B |  | Dibenzo[a,e]piren/ Dibenzo[a,e]pyrene, DeP - |  |
| Benzo[b]fluoranten/ Benzo [b]fluoranthene, BbF Grupa/Group 2B |  | Dibenzo[a,h]piren/ Dibenzo[a,h]pyrene, DhP Grupa/Group 2B |  |
| Benzo[j]fluoranten/ Benzo [j]fluoranthene, BjF Grupa/Group 2B |  | Dibenzo[a,i]piren/ Dibenzo[a,i]pyrene, DiP Grupa/Group 2B |  |
| Benzo[k]fluoranten/ Benzo [k]fluoranthene, BkF Grupa/Group 2B |  | Dibenzo[a,l]piren/ Dibenzo[a,l]pyrene, DlP Grupa/Group 2A |  |

Slika 1. Nazivi, strukturne formule i skraćenice 16 EU prioritetnih PAH jedinjenja

Figure 1. The names, structural formulas and abbreviations of 16 EU priority PAHs

u četiri grupe karcinogenosti po čoveka (Grupa 1 – Karcinogena jedinjenja; Grupa 2A – Verovatno karcinogena jedinjenja; Grupa 2B – Moguće karcinogena jedinjenja; Grupa 3 – Jedinjenja koja nisu klasifikovana kao karcinogena i Grupa 4 – Verovatno

nekarcinogena jedinjenja). Na slici 1 dati su nazivi, strukturne formule, skraćenice i relativne molekulske mase (M_r) 16 PAH jedinjenja koje je Komisija Evropske unije označila kao prioriteta (16 EU prioriteta PAH jedinjenja) (*European Commission*,

Tabela 1. MDK za PAH jedinjenja
Table 1. MRLs for PAH compounds

| Tačka/ Item | Proizvod/ Product | Benzo[a]piren MDK, [µg/kg]/ Benzo[a]pyrene, MRL, [µg/kg] | Suma benzo[a]pirena, benzo[a]antracena, benzo[b] fluorantena i hrizena, MDK, [µg/kg]/ Sum of benzo[a]pyrene, benzo[a]anthracene, benzo[b] fluoranthene and chrysene, MRL, [µg/kg] |
|----------------|--|--|--|
| 6.1.1. | Ulja i masti (isključujući kakao puter i kokosovo ulje) namenjena za neposrednu ljudsku potrošnju ili kao sastojak u hrani/ <i>Oils and fats (excluding cocoa butter and coconut oil) intended for direct human consumption or as an ingredient in food</i> | 2,0 | 10,0 |
| 6.1.2. | Kakao u zrnu ili proizvodi od kakao zrna/ <i>Cocoa beans or cocoa beans products</i> | 5,0 | 35,0 do 31.3.2015. godine/35.0 before 31st March 2015; 30,0 od 1.4.2015. godine/30.0 from 1st April 2015. |
| 6.1.3. | Kokosovo ulje namenjeno za neposrednu ishranu ljudi ili kao sastojak u hrani/ <i>Coconut oil intended for direct human consumption or as an ingredient in food</i> | 2,0 | 20,0 |
| 6.1.4. | Dimljeno meso i dimljeni proizvodi od mesa/ <i>Smoked meat and smoked meat products</i> | 5,0 do 31.8.2014. godine/5.0 before 31st August 2014; 2,0 od 1.9.2014. godine/2.0 from 1st September 2014 | 30,0 do 31.8.2014. godine/30.0 before 31st August 2014; 12,0 od 1.9.2014. godine/12.0 from 1st September 2014 |
| 6.1.5. | Meso dimljene ribe i dimljeni proizvodi ribarstva, osim proizvoda iz tačke 6.1.6. i 6.1.7. Maksimalne količine za dimljene rakove važe za mišićno meso sa dodacima i grudi, a u slučaju dimljenih kraba i rakova sličnim krabama (<i>Brachyura</i> i <i>Anomura</i>) se odnosi na mišićno meso iz dodataka/ <i>The meat of smoked fish and smoked fishery products, other than products referred to in point 6.1.6. and 6.1.7. Maximum amounts of smoked crabs apply for muscle meat with additives and breast, and in the case of smoked crab and crayfish similar to crabs (Brachyura and Anomura) refers to muscle meat from supplements</i> | 5,0 do 31.8.2014. godine/5.0 before 31st August 2014; 2,0 od 1.9.2014. godine/2.0 from 1st September 2014 | 30,0 do 31.8.2014. godine/30.0 before 31st August 2014; 12,0 od 1.9.2014. godine/12.0 from 1st September 2014 |
| 6.1.6. | Dimljene papaline i konzervirane dimljene papaline (<i>Sprattus sprattus</i>); školjke (sveže, ohlađene ili zamrznute); termički obrađeno meso i termički obrađeni proizvodi od mesa namenjeni za neposrednu ishranu ljudi/ <i>Smoked sprats and canned smoked sprats (Sprattus sprattus); shellfish (fresh, chilled or frozen); heat-treated meat and heat treated meat products intended for direct human consumption</i> | 5,0 | 30,0 |
| 6.1.7. | Školjke (dimljene)/ <i>Shells (smoked)</i> | 6,0 | 35,0 |

2005, 2006). Takođe, kod svakog PAH jedinjenja na slici 1 navedeni su podaci o trenutnoj IARC klasifikaciji karcinogenosti (IARC, 2010).

Evropska naučna komisija o zagađivačima u lancu ishrane je 9. juna 2008. godine od radnog tela Evropske unije o bezbednosti hrane (EFSA, European Food Safety Authority) usvojila novo mišljenje o policikličnim aromatičnim ugljovodonicima u hrani, gde je zaključeno da se benzo[a]piren više ne može smatrati pogodnim markerom za proveru prisustva PAH jedinjenja u hrani (EFSA, 2008). Predloženo je da suma sadržaja PAH4 ili PAH8 jedinjenja bude pokazatelj prisustva PAH jedinjenja u hrani. Grupa PAH4 obuhvata: BaP, BaA, BbF i CHR, dok grupa PAH8 obuhvata: BaP, BaA, BbF, CHR, BkF, BgP, DhA i IcP. EFSA je na osnovu rezultata naučnih ispitivanja u vezi sa kontaminacijom hrane PAH jedinjenjima zaključila da suma PAH8 jedinjenja ne bi obezbedila mnogo više informacija u poređenju sa sumom PAH4 jedinjenja (EFSA, 2008) i predložila da se suma sadržaja benzo[a]pirena, benzo[a]antracena, benzo[b]fluorantena i hrizena, tj. PAH4 jedinjenja koristi kao marker prisustva drugih PAH jedinjenja.

Regulativa Komisije Evropske unije broj 835/2011 (European Commission, 2011) od 19. avgusta 2011. godine propisala je maksimalno dozvoljene količine (MDK) za benzo[a]piren, kao i za sumu benzo[a]pirena, benzo[a]antracena, benzo[b]fluorantena i hrizena u različitim vrstama hrane. Pravilnik (Sl. glasnik RS, br. 25/2010, 28/2011 i 20/2013) koji je bio na snazi do 12. marta 2014. godine nije definisao MDK vrednost za sumu PAH4 jedinjenja u dimljenom mesu i dimljenim proizvodima od mesa, dok je MDK vrednost za benzo[a]piren bila 5 µg/kg. Aktuelni Pravilnik (Službeni glasnik RS, br. 29/14), koji je u potpunosti u saglasnosti sa Regulativom Komisije Evropske unije broj 835/2011 (European Commission, 2011) u pogledu MDK

vrednosti za PAH jedinjenja, definišu se MDK vrednosti za sumu PAH4 jedinjenja, kao i za BaP u dimljenom mesu i dimljenim proizvodima od mesa (tabela 1). Prema ovom Pravilniku (Službeni glasnik RS, br. 29/14), koji je stupio na snagu 13. marta 2014, vrednost MDK za sumu PAH4 jedinjenja do 31. avgusta 2014. godine iznosila je 30 µg/kg, dok je vrednost MDK za BaP iznosila 5 µg/kg. Novi, rigorozniji zahtevi važe od 1. septembra 2014. godine, gde MDK vrednost za sumu PAH4 jedinjenja iznose 12 µg/kg, a MDK vrednost za BaP iznosi 2 µg/kg.

Dimljeni proizvodi od mesa zauzimaju važno mesto, kako u proizvodnji, tako i u ishrani stanovništva u Srbiji. Cilj ovog rada bio je razvijanje metode za istovremenu analizu (identifikaciju i kvantifikaciju) benzo[a]antracena, hrizena, benzo[b]fluorantena i benzo[a]pirena u dimljenom mesu i dimljenim proizvodima od mesa u skladu sa zahtevima Pravilnika (Službeni glasnik RS, br. 29/14) koji je stupio na snagu 13. marta 2014.

Materijal i metode

Reagensi i ostali materijali

Svi korišćeni rastvarači bili su HPLC čistoće. U toku eksperimentalnog rada korišćeni su: acetoni-tril (Sigma Aldrich, Germany), metilen-hlorid (J.T. Baker, USA), n-heksan (Sigma Aldrich, Germany), voda HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Germany), smeša za sušenje (poly(acrylic acid), partial sodium salt-graft-poly(ethylene oxide), cross-linked) (Sigma Aldrich, Germany), blanko mast (Oma's SCHMALZ, Schachinger, Germany), glass Fiber Filter _ Cellulose (Dionex, 19.8 mm, 100 PCS), mega SPE kolonice (punjene sa 5 g silika faze, 20 mL) (Phenomenex, USA), PTFE filter (Whatman) veličine pora 1 µm.

Standardi benzo[a]antracena (BaA), hrizena (CHR), benzo[b]fluorantena (BbF) i benzo[a]-pirena

Tabela 2. Sadržaji pojedinačnih PAH4 jedinjenja (µg/kg) na različitim MDK nivoima obogaćenosti blanko uzoraka masti.

Table 2. The contents of individual PAH4 compounds (µg/kg) at different MRL levels of enriched blank samples of fat.

| MDK/MRL | Sadržaj (µg/kg)/Content (µg/kg) | | | | |
|---------|---------------------------------|------|-----|-----|------------------------|
| | BaA | CHR | BbF | BaP | suma PAH4/ PAH4 sum |
| 0,25 | 0,75 | 0,75 | 1 | 0,5 | 3 |
| 0,5 | 1,5 | 1,5 | 2 | 1 | 6 |
| 1 | 3 | 3 | 4 | 2 | 12 |
| 1,5 | 4,5 | 4,5 | 6 | 3 | 18 |

(BaP) bili su analitičke čistoće proizvođača Dr. Ehrenstorfer, Germany, kupljeni u čvrstom stanju. Standardni rastvori pravljani su rastvaranjem čvrstih supstanci u acetonitrilu.

Priprema uzoraka za HPLC analizu i HPLC analiza

Ubrzana ekstrakcija pomoću rastvarača (Accelerated solvent extraction, ASE)

S obzirom na činjenicu da ne postoje uzorci dimljenih proizvoda od mesa koji ne sadrže PAH jedinjenja, blanko uzorci masti su korišćeni za obogaćivanje PAH jedinjenjima. Obogaćeni blanko uzorci masti ubrzano su ekstrahovani n-heksanom na aparatu ASE 200 Dionex (Sunnyvale, USA), na temperaturi od 100 °C i pritisku od 10 MPa, tokom dva sukcesivna ciklusa (statično vreme – 10 min, vreme čišćenja – 120 s). Uzorci masti su obogaćivani na različitim MDK nivoima (0,5 MDK, 1 MDK i 1,5 MDK). MDK za sumu PAH4 jedinjenja od 1. septembra 2014. godine iznosi 12 µg/kg, a za benzo[a]piren 2 µg/kg (tabela 1). U tabeli 2 dati su sadržaji pojedinačnih PAH jedinjenja, na različitim MDK vrednostima, na kojima su obogaćivani blanko uzorci masti.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (Solid phase extraction, SPE)

Ekstrakcija na čvrstoj fazi je korišćena kao postupak za uklanjanje molekula lipida iz ispitanih uzoraka. Prečišćavanje je urađeno pomoću mega SPE kolonice, zapremine 20 mL, koje sadrže 5 g silika faze. Od pripremljenog uzorka nakon ASE ekstrakcije uzeto je 1 ml rastvora i naneto

na kolonu, nakon ispiranja i kondicioniranja mega SPE kolonice (Moret & Conte, 2002). PAH4 smeša se eluira sa smešom n-heksan / dihlormetan 70:30 (v/v). Rastvarač iz eluata je uparen u struji azota na 40°C, a suvi ostatak je rekonstituisan u 500 µl acetonitrila.

HPLC analiza

Pripremljen rastvor PAH4 jedinjenja nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi, analiziran je visokoefikasnom tečnom hromatografijom korišćeni fluorescentni detektor (High-Performance Liquid Chromatographic, Fluorescence detector, HPLC/FL). HPLC uređaj (Shimadzu, Japan) se sastoji od pumpe (Solvent Delivery Module LC-20AB), autosamplera (SIL-20A/20AC), peći (Column Oven CTO-20°/20AC) i fluorescentnog detektora (Spectrofluorometric detector RF-10Ax). U toku rada korišćene su različite kolone i biće specificirane u delu rezultati i diskusija.

Rezultati i diskusija

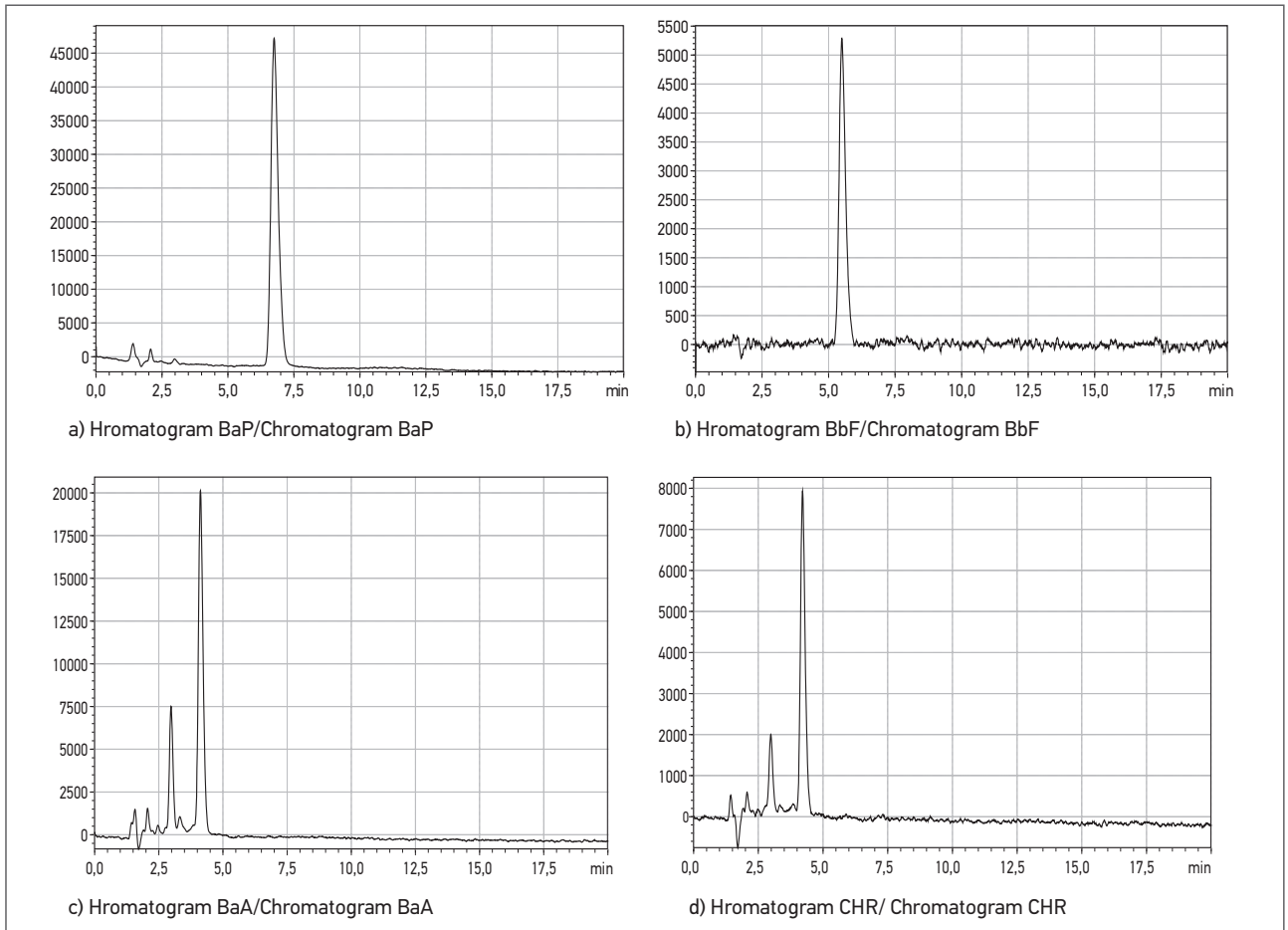
Rezultati razvijanja metode za određivanje PAH4 jedinjenja u dimljenom mesu i dimljenim proizvodima od mesa prikazani su u vidu hromatograma uz odgovarajuću diskusiju. Pored hromatograma dati su uslovi HPLC analize pod kojima su dobijeni dati hromatogrami.

HPLC analiza-1

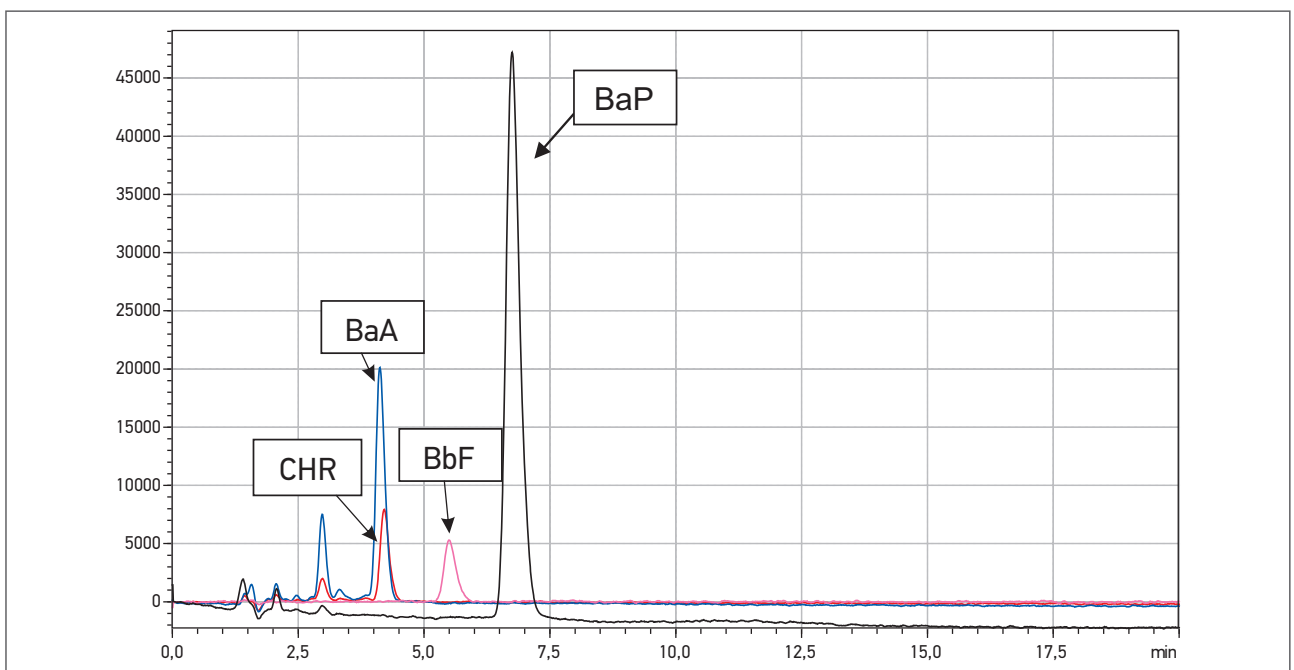
HPLC analiza-1 izvođena je pri uslovima koji su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. Uslovi pri kojima je izvođena HPLC analiza-1
Table 3. Conditions in which the HPLC analysis-1 was performed

| Kolona/Column | Pathfinder AS, Silica 100, 5.0 µm RP, 150 x 4,6 mm |
|--|---|
| <i>Vreme trajanja analize/</i> Duration of the analysis (min) | 10 |
| <i>Injektovana zapremina/</i> Injected volume (µl) | 50 |
| <i>Protok mobilne faze/</i> Flow of mobile phase (ml/min) | 1,2 |
| <i>Pritisak/pressure (MPa)</i> | 0,0–35,0 |
| <i>Talasne dužine (nm) (ekscitacija/emisija)/</i> Wavelengths (nm) (excitation /emission) | BaA i CHR – 275/385, BaP – 260/410, BbF – 256/446 |
| <i>Temperatura peći/Oven temperature (°C)</i> | 25–85 |
| <i>Mobilna faza/Mobile phase</i> | ACN |



Slika 2. Hromatogrami pojedinačnih PAH4 jedinjenja pri uslovima HPLC analize-1
Figure 2. The chromatograms of individual PAH4 compounds at the conditions of HPLC analysis-1



Slika 3. Poređenje hromatograma BaP, BbF, BaA i CHR pri uslovima HPLC analize-1
Figure 3. Comparison of chromatograms BaP, BbF, BbA and CHR in conditions of HPLC analysis-1

Na slici 2 prikazani su hromatogrami pojedinačnih PAH4 jedinjenja pri uslovima HPLC analize-1, dok je na slici 3 prikazano poređenje hromatograma BaP, BaF, BaA i CHR.

Na osnovu dobijenih hromatograma pojedinačnih jedinjenja (slika 2), vidi se da su pod primenjenim uslovima HPLC analize-1, pikovi zadovoljavajućeg intenziteta, kao i da su retencijska vremena svih jedinjenja manja od 10 minuta. Međutim, poređenjem hromatograma ovih jedinjenja (slika 3) uočava se da se pikovi BaA i CHR preklapaju, što ukazuje na to da se ova dva jedinjenja u smeši pod primenjenim uslovima HPLC analize ne mogu razdvojiti i kvantifikovati. Iz tih razloga neophodno je bilo promeniti uslove HPLC analize u cilju pojedinačne identifikacije i kvantifikacije PAH4 jedinjenja.

HPLC analiza-2

HPLC analiza-2 izvođena je pri uslovima koji su prikazani u tabeli 4.

Na slici 4 prikazani su hromatogrami pojedinačnih PAH4 jedinjenja pri uslovima HPLC analize-2, dok je na slici 5 prikazano poređenje hromatograma BaP, BbF, BaA i CHR.

Promenom mobilne faze, tj. uvođenjem polarne mobilne faze (ACN/H₂O, 70/30, v/v) u odnosu na HPLC analizu-1, dobijaju se znatno lošiji rezultati, koji se ogledaju u nemogućnosti identifikacije BaA i BbF (slike 4a, 4b). Takođe, pik BaP je niskog intenziteta (slika 4c) i preklapa se sa pikom CHR (slika 5). Neustaljenost bazne linije je, takođe,

nedostatak koji se javlja primenom gore navedenih uslova. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da smeša acetonitrila i vode nije dobro odabrana mobilna faza, pri datim HPLC uslovima analize. Iz tih razloga acetonitril je ponovo korišćen kao mobilna faza, ali je promenjen protok i temperatura peći kao što je prikazano u uslovima HPLC analize-3.

HPLC analiza-3

HPLC analiza-3 izvođena je pri uslovima koji su prikazani u tabeli 5.

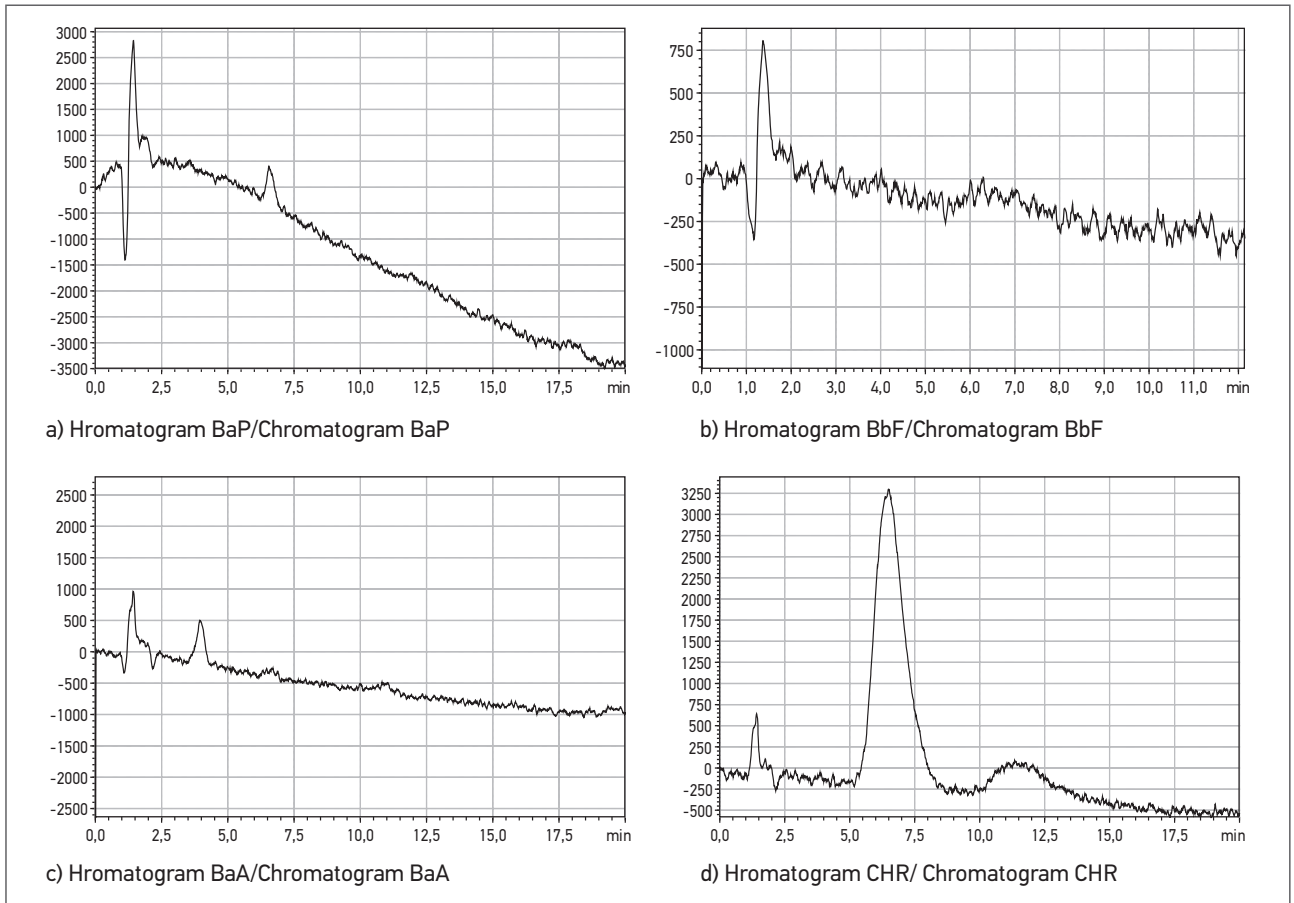
Na slici 6 prikazani su hromatogrami pojedinačnih PAH4 jedinjenja pri uslovima HPLC analize-3, dok je na slici 7 prikazano poređenje pojedinačnih hromatograma BaP, BbF, BaA i CHR.

Analizom dobijenih hromatograma pojedinačnih PAH4 jedinjenja može se zaključiti da su intenziteti pikova na zadovoljavajućem nivou. U poređenju sa hromatogramima dobijenim pod uslovima HPLC analize-1 u kojoj je korišćena ista mobilna faza, primećuje se da su retencijska vremena pomena pomerena ka višim vrednostima (slika 6), što je posledica smanjenog protoka mobilne faze. Upoređivanjem hromatograma sva četiri PAH jedinjenja, primećuje se da se pikovi koji potiču od BaA i CHR preklapaju, što onemogućava njihovu identifikaciju i kvantifikaciju (slika 7). Iz svega navedenog može se zaključiti da uslovi HPLC analize-3 nisu odgovarajući za uspešnu analizu PAH4 jedinjenja, pa je u skladu sa tim bilo neophodno dalje menjati uslove analize.

Tabela 4. Uslovi pri kojima je izvođena HPLC analiza-2

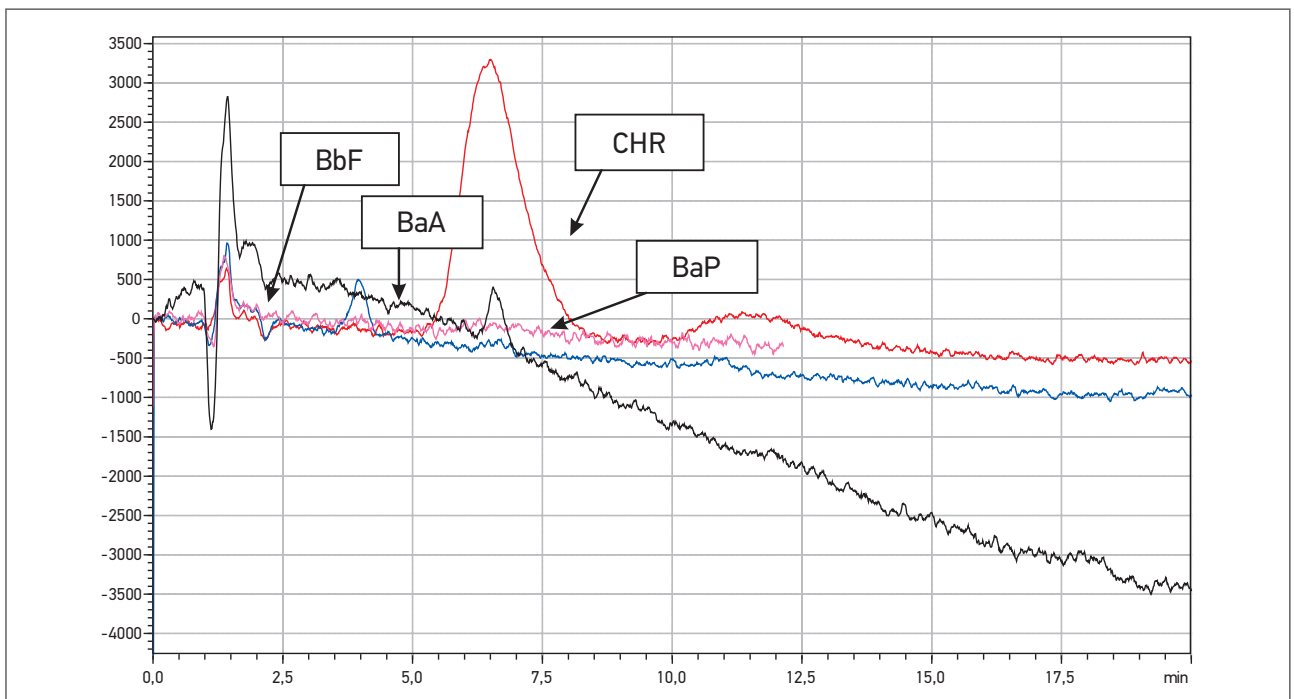
Table 4. Conditions in which the HPLC analysis-2 was performed

| <i>Kolona/Column</i> | Pathfinder AS, Silica 100, 5.0 µm RP, 150 x 4,6 mm |
|--|---|
| <i>Vreme trajanja analize/ Duration of the analysis (min)</i> | 10 |
| <i>Injektovana zapremina/ Injected volume (µl)</i> | 50 |
| <i>Protok mobilne faze/ Flow of mobile phase (ml/min)</i> | 1,2 |
| <i>Pritisak/pressure (MPa)</i> | 0,0–35,0 |
| <i>Talasne dužine (nm) (ekscitacija/emisija)/ Wavelengths (nm) (excitation / emission)</i> | BaA i CHR – 275/385, BaP – 260/410, BbF – 256/446 |
| <i>Temperatura peći/Oven temperature (°C)</i> | 25–85 |
| <i>Mobilna faza/Mobile phase</i> | ACN/H ₂ O (70/30, v/v) |



Slika 4. Hromatogrami pojedinačnih PAH4 jedinjenja pri uslovima HPLC analize-2

Figure 4. The chromatograms of individual PAH4 compounds at the conditions of HPLC analysis-2

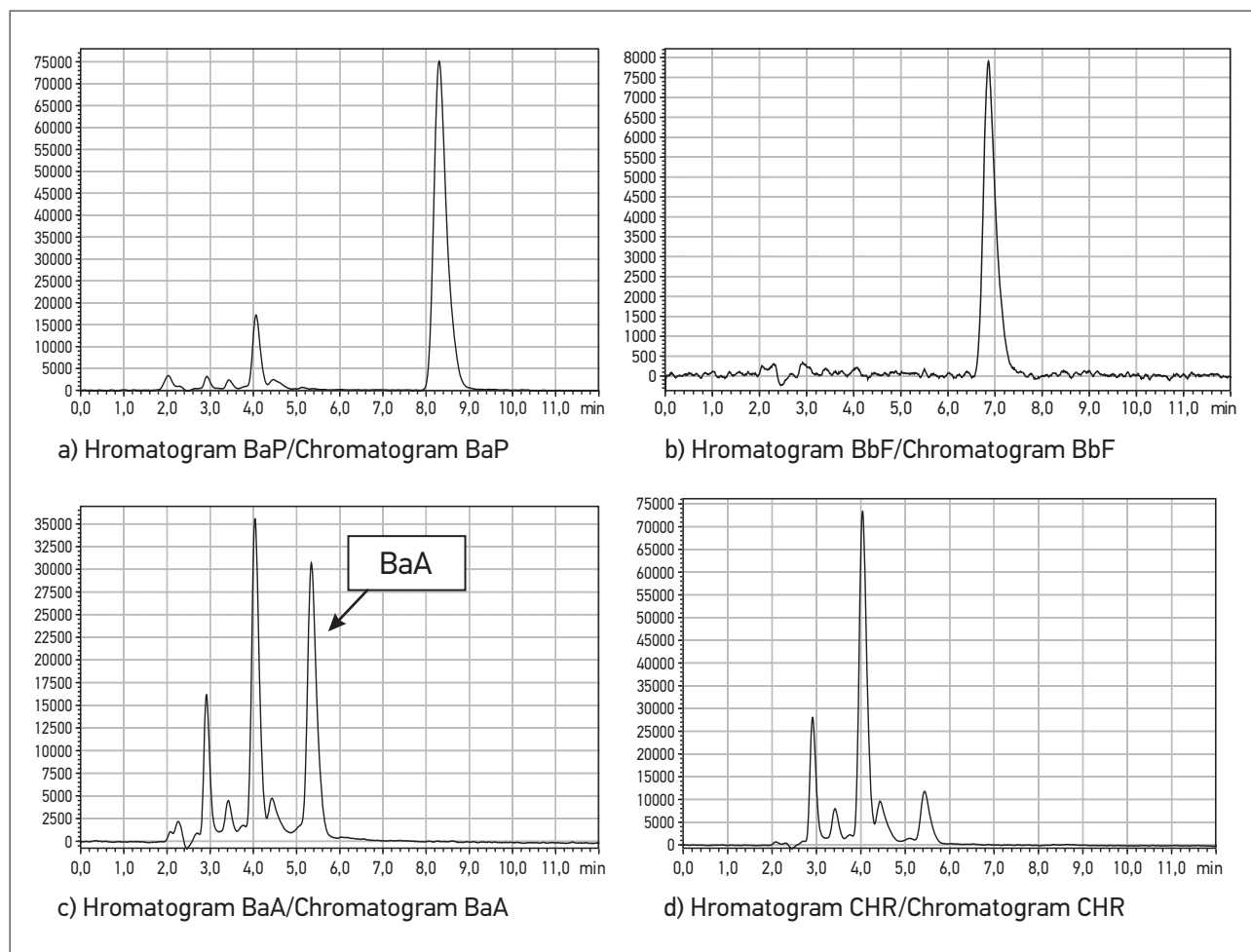


Slika 5. Poređenje hromatograma BaP, BbF, BaA i CHR pri uslovima HPLC analize-2

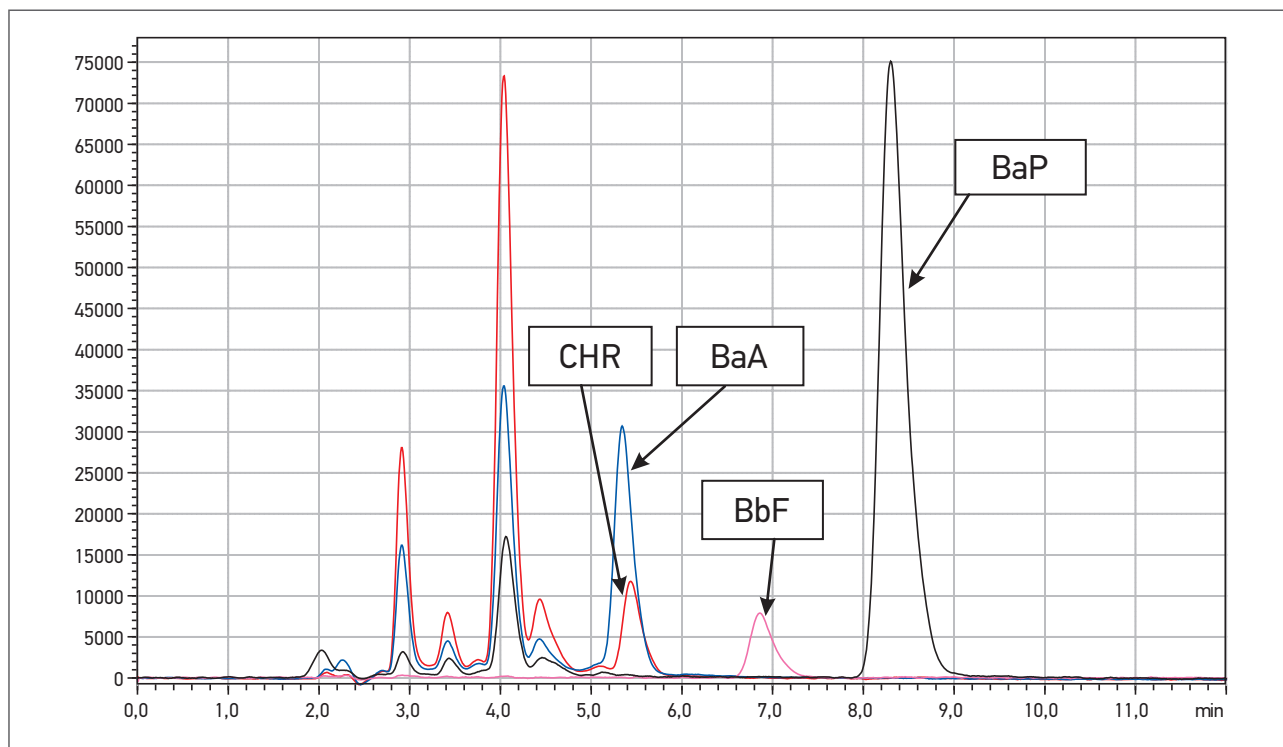
Figure 5. Comparison of chromatograms BaP, BbF, BbA and CHR in conditions of HPLC analysis-2

Tabela 5. Uslovi pri kojima je izvođena HPLC analiza-3
Table 5. Conditions in which the HPLC analysis-3 was performed

| Kolona/Column | Pathfinder AS, Silica 100, 5.0 µm RP, 150 x 4,6 mm |
|--|--|
| Vreme trajanja analize/ Duration of the analysis (min) | 10 |
| Injektovana zapremina/ Injected volume (µl) | 50 |
| Protok mobilne faze/ Flow of mobile phase (ml/min) | 0,8 |
| Pritisak/pressure (MPa) | 0,0–35,0 |
| Talasne dužine (nm) (ekscitacija/emisija)/ Wavelengths (nm) (excitation / emission) | BaA i CHR – 275/385, BaP – 260/410, BbF – 256/446 |
| Temperatura peći/Oven temperature (°C) | 35–85 |
| Mobilna faza/Mobile phase | ACN |



Slika 6. Hromatogrami pojedinačnih PAH4 jedinjenja pri uslovima HPLC analize-3
Figure 6. The chromatograms of individual PAH4 compounds at the conditions of HPLC analysis-3



Slika 7. Poređenje hromatograma BaP, BbF, BaA i CHR pri uslovima HPLC analize-3.

Figure 7. Comparison of chromatograms BaP, BbF, BbA and CHR in conditions of HPLC analysis-3

HPLC analiza-4

HPLC analiza-4 izvođena je pri uslovima koji su prikazani u tabeli 6.

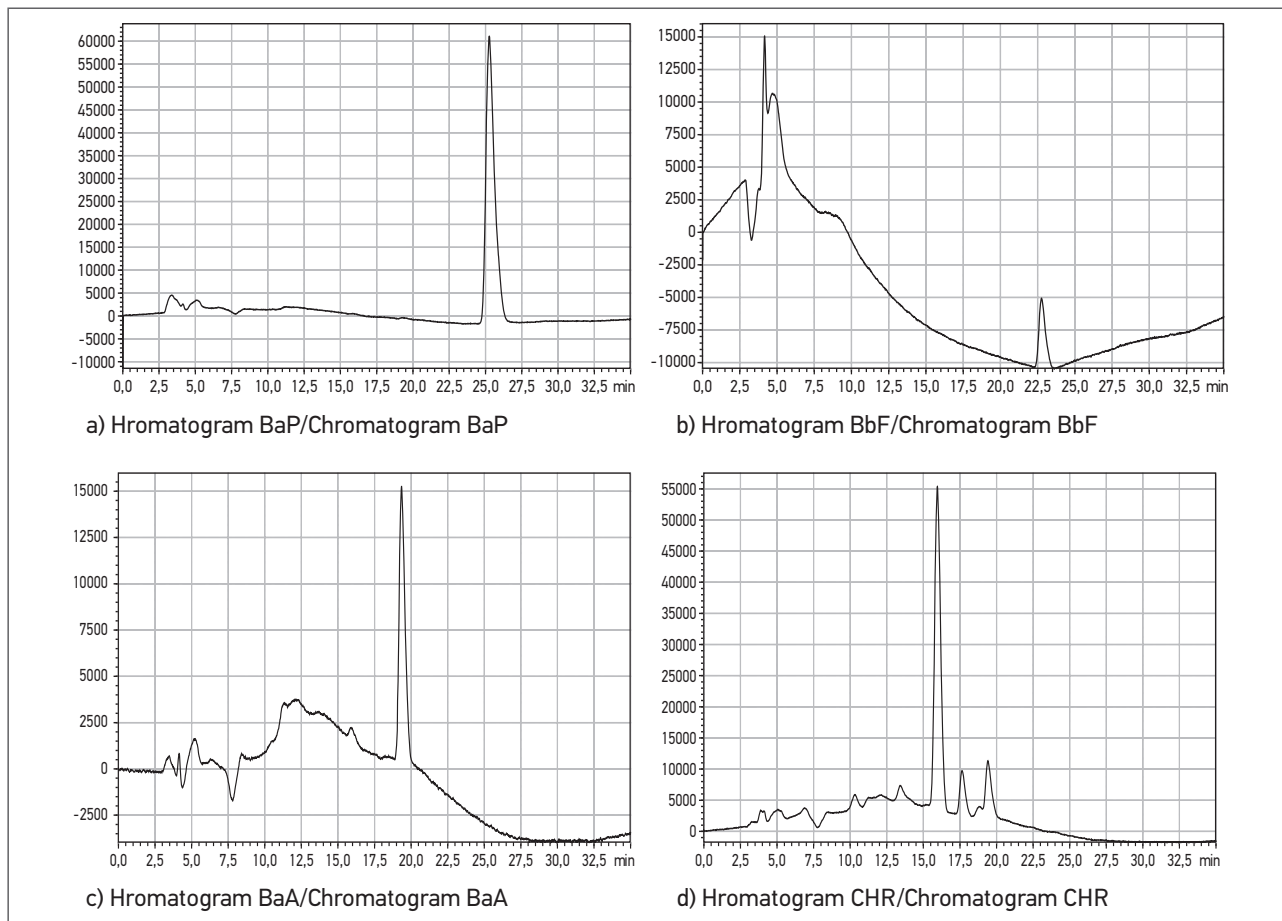
Na slici 8 prikazani su hromatogrami pojedinačnih PAH4 jedinjenja pri uslovima HPLC analize-4, dok je na slici 9 prikazano poređenje hromatograma BaP, BbF, BaA i CHR.

Povećanje polarosti mobilne faze (A (30%) – H₂O/MeOH, 20/80, v/v; B (70%) – ACN) i smanjenje protoka (0,65 ml/min) uz korišćenje iste kolone nije rezultiralo do razdvajanja željenih jedinjenja (slika 9). Zato je bilo potrebno promeniti kolonu i izabrati takve uslove koje će omogućiti uspesno razdvajanje BaA, BbF, CRH i BaP.

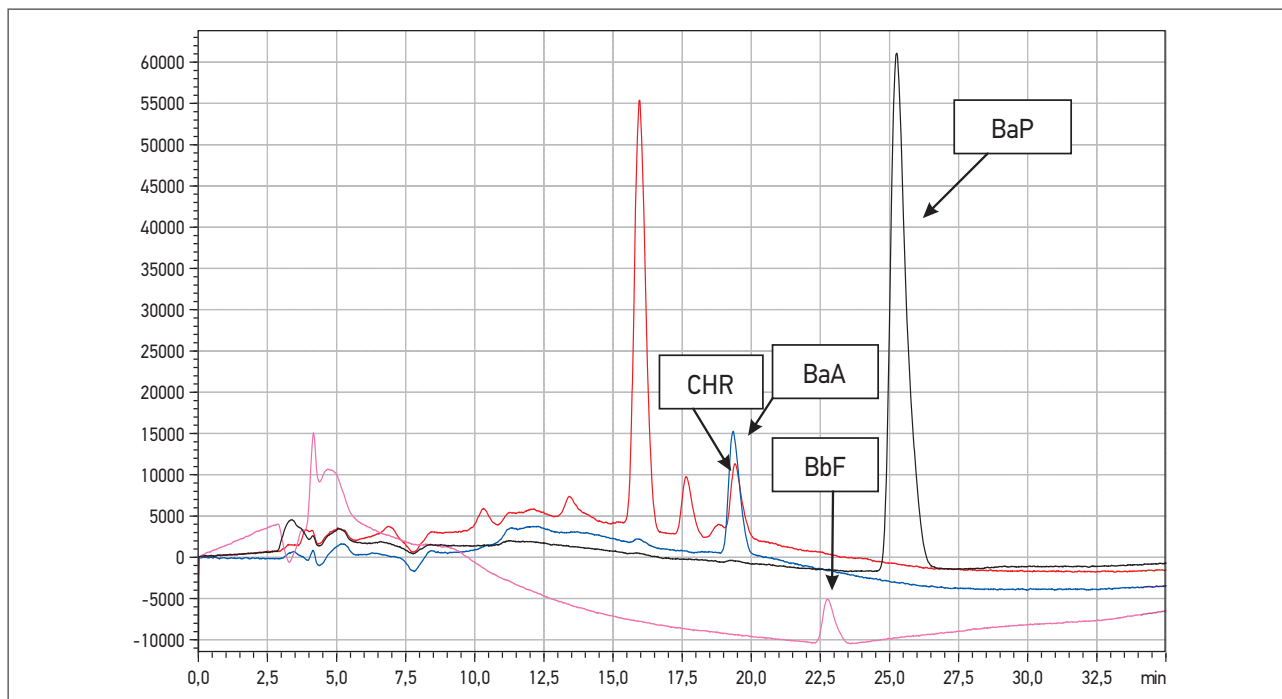
Tabela 6. Uslovi pri kojima je izvođena HPLC analiza-4

Table 6. Conditions in which the HPLC analysis-4 was performed

| Kolona/Column | Pathfinder AS, Silica 100, 5.0 µm RP, 150 x 4,6 mm |
|--|---|
| Vreme trajanja analize/ Duration of the analysis (min) | 30 |
| Injektovana zapremina/ Injected volume (µl) | 50 |
| Protok mobilne faze/ Flow of mobile phase (ml/min) | 0,65 |
| Pritisak/pressure (MPa) | 0,0–35,0 |
| Talasne dužine (nm) (ekscitacija/emisija)/ Wavelengths (nm) (excitation / emission) | BaA i CHR – 275/385, BaP – 260/410, BbF – 256/446 |
| Temperatura peći/Oven temperature (°C) | 35–85 |
| Mobilna faza/Mobile phase | A (30%) – H ₂ O/MeOH (20/80, v/v), B (70%) – ACN |



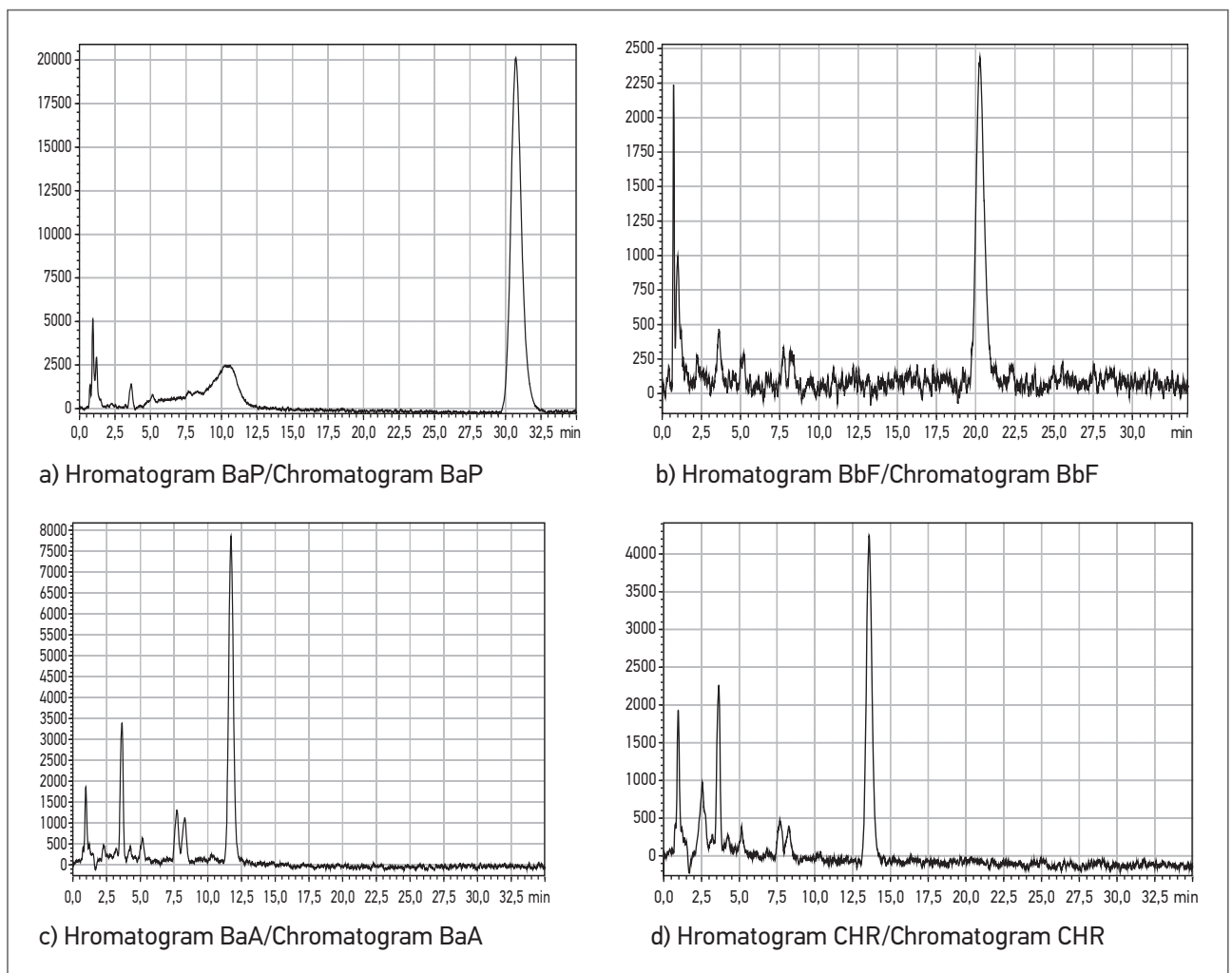
Slika 8. Hromatogrami pojedinačnih PAH4 jedinjenja pri uslovima HPLC analize-4
Figure 8. The chromatograms of individual PAH4 compounds at the conditions of HPLC analysis-4



Slika 9. Poređenje hromatograma BaP, BbF, BaA i CHR pri uslovima HPLC analize-4
Figure 9. Comparison of chromatograms BaP, BbF, BbA and CHR in conditions of HPLC analysis-4

Tabela 7. Uslovi pri kojima je izvođena HPLC analiza-5
Table 7. Conditions in which the HPLC analysis-5 was performed

| Kolona/Column | Envirosep PP 5 μm PP, LC column 125 \times 4.6 mm |
|--|--|
| Vreme trajanja analize/ Duration of the analysis (min) | 35 |
| Injektovana zapremina/ Injected volume (μl) | 50 |
| Protok mobilne faze/ Flow of mobile phase (ml/min) | 1,2 |
| Pritisak/pressure (MPa) | 0,0–35,0 |
| Talasne dužine (nm) (ekscitacija/emisija)/ Wavelengths (nm) (excitation / emission) | BaA i CHR – 275/385, BaP – 260/410, BbF – 256/446 |
| Temperatura peći/Oven temperature ($^{\circ}\text{C}$) | 25–85 |
| Mobilna faza/Mobile phase | ACN/H ₂ O (70/30, v/v) |



Slika 10. Hromatogrami pojedinačnih PAH4 jedinjenja pri uslovima HPLC analize-5
Figure 10. The chromatograms of individual PAH4 compounds at the conditions of HPLC analysis-5

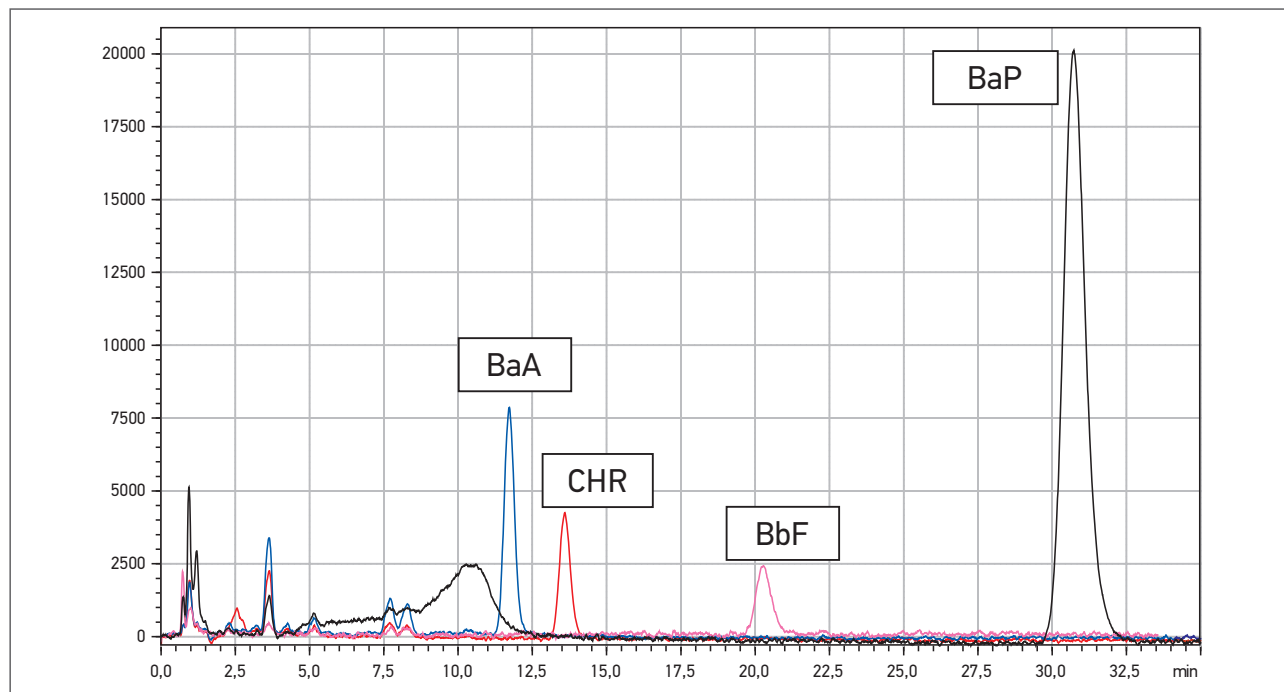
HPLC analiza-5

HPLC analiza-5 izvođena je pri uslovima koji su prikazani u tabeli 7.

Na slici 10 prikazani su hromatogrami pojedinačnih PAH4 jedinjenja pri uslovima HPLC

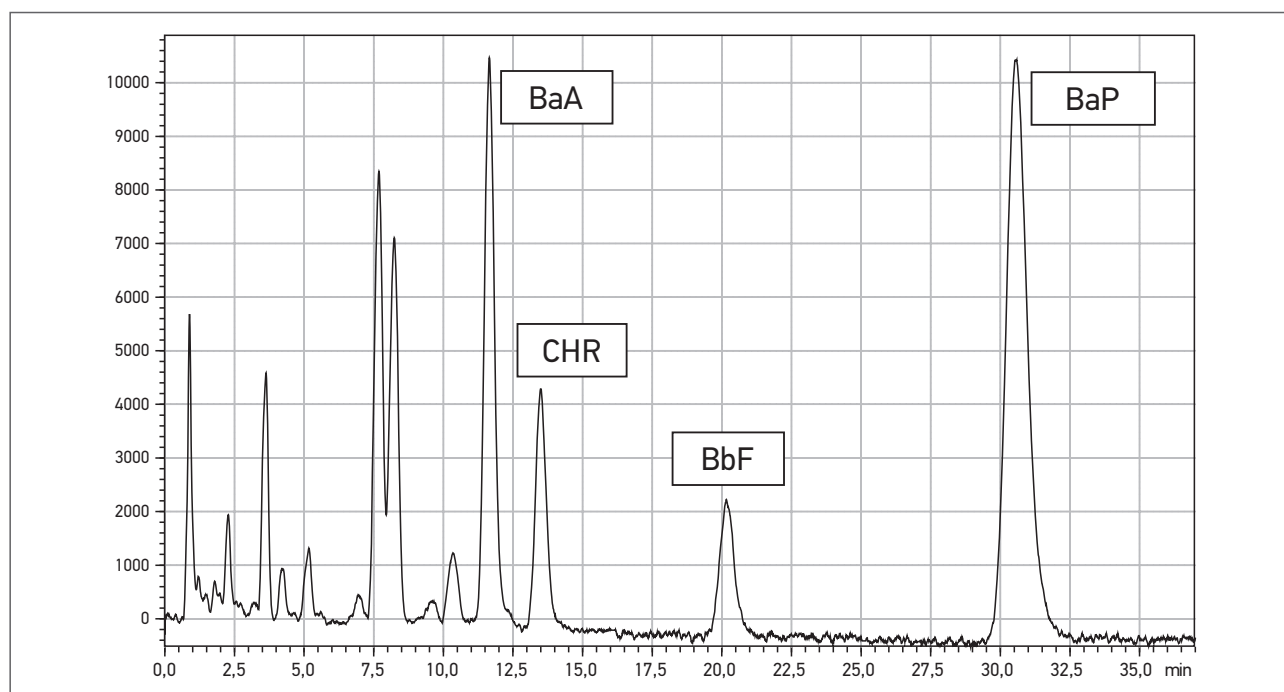
analize-5, dok je na slici 11 prikazano poređenje hromatograma BaP, BbF, BaA i CHR.

Poređenjem hromatograma pojedinačnih standarda BaA, CHR, BbF i BaP (Slika 11), koji su dobijeni pri uslovima HPLC analize-5, uočava se da se



Slika 11. Poređenje hromatograma BaP, BbF, BaA i CHR pri uslovima HPLC analize-5

Figure 11. Comparison of chromatograms BaP, BbF, BbA and CHR in conditions of HPLC analysis-5



Slika 12. Hromatogram smeše PAH4 jedinjenja pri uslovima HPLC analize-5

Figure 12. The chromatogram of the mixture of PAH4 compounds in conditions of HPLC analysis-5

pikovi ovih jedinjenja ne preklapaju. Analizom smeše PAH4 jedinjenja pri istim uslovima analize (slika 12), analizirana jedinjenja su uspešno razdvojena i mogu se kvantifikovati. Uslovi HPLC analize-5 se razlikuju od ostalih, pre svega, po koloni (Envirosep PP). Kolona Envirosep PP uspešno razdvaja BaA i CHR (slika 12), što se u prethodnim uslovima HPLC analize nije moglo postići.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se BaA, CHR, BbF i BaP, pri uslovima HPLC analize-5, uspešno mogu identifikovati i kvantifikovati (slika 12) i da se ovi uslovi HPLC analize mogu primeniti u procesu validacije metode za

određivanje PAH4 jedinjenja u dimljenim proizvodima od mesa.

Zaključak

U cilju određivanja PAH4 jedinjenja u dimljenom mesu i dimljenim proizvodima od mesa, tokom procesa razrade metode zaključeno je da se benzo[a]antracena, hrizena, benzo[b]fluorantena i benzo[a]pirena (PAH4 jedinjenja) mogu uspešno izolovati iz uzoraka, a zatim identifikovati i kvantifikovati. Razrada ove metode je neophodan korak u procesu validacije metode.

Literatura

- Conde F. J., Ayala J. H., Afonso A. M., Gonzalez V., 2005.** Emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from combustions agricultural and silvicultural debris. *Atmospheric Environment*, 39, 6654–6663.
- Djinovic J., Popovic A., Jira W., 2008.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different types of smoked meat products from Serbia. *Meat Science*, 80, 449–456.
- Djinovic-Stojanovic J., Popovic A., Spiric A., Jira W., 2013.** Emission of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Beech Wood Combustion, *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 35, 4, 328–336.
- EFSA, 2008.** European Food Safety Authority, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain, *The EFSA Journal*, 724, 1–114.
- European Commision, 2005.** Commission Regulation No 208/2005 of 4 February 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons. *Official Journal of the European Union*, L34, 3–5.
- European Commision, 2006.** Commission Regulation No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L364, 5–24.
- European Commision, 2011.** Commission Regulation (EU) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L215, 4–8.
- IARC, 1987.** IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs, 1–42, 7, 389, Lyon, France.
- IARC, 1989.** IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 46, 41, Lyon, France.
- IARC, 1996.** IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 65, 33, Lyon, France.
- IARC, 2010.** IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures, 92, Lyon, France.
- Lim McR. C. H., Ayoko G. A., Moravska L., Ristovski J. D., Jayaratne E. R., 2007.** Influence of fuel composition on polycyclic aromatic hydrocarbon emissions from a fleet of in-service passenger cars. *Atmospheric Environment*, 41, 150–160.
- Moret S., Conte L. S., 2002.** A rapid method for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in vegetable oils. *Journal of Separation Science*, 25, 96–100.
- Nikolaou K., Masclet E., Mouvie, G., 1984.** PAH stability scale established in situ in an urban region. *The Science of the Total Environment*, 36, 383–388.
- Rao P. S., Ansari M. F., Pipalatkhar P., Kumar A., Nema P., Devotta S., 2008.** Measurement of particulate phase polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) around a petroleum refinery. *Environmental Monitoring & Assessment*, 137, 387–392.
- SCF, 2002.** Scientific Committee on Food, Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food, Brussels, Belgium.
- Sl. glasnik RS, br. 25/2010, 28/2011 i 20/2013.** Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja.
- Sl. glasnik RS, br. 29/2014.** Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja.

Determination of PAH4 compounds in smoked meat and meat products – elaboration of the method

Dinović-Stojanović Jasna, Stišović Jelena, Popović Aleksandar, Nikolić Dragica, Janković Saša

S u m m a r y: Smoked meat and smoked meat products represent a significant part of the human diet in Serbia. The process of smoking, i.e. wood combustion, is one of the most important sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Considering the carcinogenic and mutagenic properties of some PAHs, these compounds have been in the spotlight of scientific interest. The EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM Panel) reviewed the available data on occurrence and toxicity of PAHs in food. In 2008, the CONTAM Panel concluded that benzo[a]pyrene is not a suitable indicator for the occurrence of PAHs in food. Based on the currently available data relating to occurrence and toxicity, the CONTAM Panel concluded that the sum of benzo[a]pyrene, chrysene, benz[a]anthracene and benzo[b]fluoranthene (PAH4) are the most suitable indicators of PAHs in food.

These proposals have become part of the legislation both of EU and Serbia. From 1st September 2014, maximum residue limits (MRL) both for benzo[a]pyrene (2 µg/kg) and sum of PAH4 compounds (12 µg/kg), in smoked meat and meat products, were defined by the legislation of Serbia, which is in accordance with EU regulation.

In this paper, the method has been developed for the determination of benzo[a]pyrene, chrysene, benz[a]anthracene and benzo[b]fluoranthene (PAH4 compounds) in smoked meat and smoked meat products. Accelerated solvent extraction (ASE) was used for extraction of lipids and lipophilic compounds. Solid Phase Extraction (SPE) was used in order to remove lipids from analysed samples. High-performance liquid chromatographic with fluorescence detection (HPLC-FL) was applied for identification and quantification of benzo[a]pyrene, chrysene, benz[a]anthracene and benzo[b]fluoranthene. Different conditions of HPLC-FL analysed were applied (mobile phase, HPLC column, oven temperature, flow) in order to achieve optimal conditions for qualitative and quantitative analysis of PAH4 compounds.

Key words: *PAH4 compounds, benz[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[a]pyrene.*

Rad primljen: 23.11.2014.

Rad prihvaćen: 25.11.2014.