

Benzo[a]piren, benzo[a]antracen, benzo[b]fluoranten i hrizen u dimljenom mesu i dimljenim proizvodima od mesa – Validacija metode

Jasna M. Đinović-Stojanović¹, Jelena M. Stišović², Aleksandar R. Popović², Dragica M. Nikolić¹, Saša D. Janković¹

¹Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, Srbija

²Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Izvod

U ovom radu prikazani su rezultati validacije metode za određivanje benzo[a]pirena, benzo[a]antracena, benzo[b]fluorantena i hrizena, tj. PAH4 jedinjenja (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAH) u dimljenom mesu i dimljenim proizvodima od mesa. Metoda je zasnovana na ekstrakciji lipida i lipofilnih jedinjenja ubrzanom ekstrakcijom rastvaračima, prečišćavanju dobijenog ekstrakta i kvalitativnom i kvantitativnom određivanju PAH4 jedinjenja, HPLC tehnikom sa fluorescentnim detektorom. Tokom validacionog procesa, ispunjeni su kriterijumi propisani Regulativom Komisije EU br. 836/2011, kao što su LOD, LOQ, ponovljivost, preciznost u uslovima ponovljivosti, specifičnost i prinos. Metoda se uspešno može primeniti za svakodnevnu analizu PAH4 jedinjenja u u dimljenom mesu i dimljenim proizvodima od mesa.

Ključne reči: PAH4 jedinjenja, benzo[a]antracen, hrizen, benzo[b]fluoranten, benzo[a]piren, dimljeno meso i dimljeni proizvodi od mesa, validacija.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

NAUČNI RAD

UDK 637.5.034:547.6:543:66.061.3

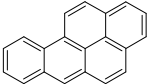
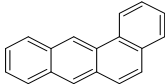
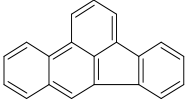
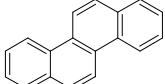
Hem. Ind. 70 (3) 299–305 (2016)

doi: 10.2298/HEMIND150331035D

Benzo[a]piren, benzo[a]antracen, benzo[b]fluoranten i hrizen su policiklični aromatični zagađivači, tj. PAH jedinjenja, koja u mesu i proizvode od mesa, najčešće dospevaju procesom sagorevanja drveta tokom dimljenja. Dimljenje mesa i proizvoda od mesa jedna je od najstarijih tehnologija konzervisanja, koja se primenjuje od davnina. Dimljenje se definiše kao proces prodiranja isparljivih komponenti, nastalih termalnom razgradnjom drveta, u meso i proizvode od mesa [1]. Dim koji nastaje sagorevanjem drveta sadrži veliki broj hemijskih jedinjenja, od kojih mnoga negativno utiču na ljudsko zdravlje [2,3]. Činjenica da neka PAH jedinjenja

imaju mutagene i karcinogene osobine, podstakla su mnoge naučnike u svetu da se bave raznovrsnim proučavanjima policikličnih aromatičnih ugljovodonika [4–9].

Internacionalna agencija za istraživanje raka [10] klasifikuje benzo[a]piren kao karcinogeno jedinjenje (Grupa 1), a benzo[a]antracen, benzo[b]fluoranten i hrizen kao moguće karcinogena jedinjenja (Grupa 2B), (slika 1). Ova četiri jedinjenja (PAH4 jedinjenja), su u izveštaju evropske komisije o zagađivačima u lancu ishrane, predložena za markere prisustva drugih policikličnih aromatičnih ugljovodonika u hrani [11]. Prvo bitno je Evropska Unija [12,13] predložila zemljama

Benzo[a]piren, BaP Grupa 1		Benzo[a]antracen, BaA Grupa 2B	
Benzo[b]fluoranten, BbF Grupa 2B		Hrizen, CHR Grupa 2B	

Slika 1. Nazivi, strukturne formule i skraćenice PAH4 jedinjenja.

Figure 1. Titles, chemical structures and abbreviations of the PAH4 compounds.

Prepiska: J.M. Đinović-Stojanović, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Kačanskog 13, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: jasna@inmesbgd.com

Rad primljen: 31. mart, 2015

Rad prihvaćen: 4. jun, 2015

članicama, da se u različitim namirnicama, ispita sadržaj takozvanih 16 EU prioriternih PAH jedinjenja (benzo[c]fluoren, benzo[a]antracen, ciklopenta[c,d]piren, hrizen, 5-metilhrizen, benzo[b]fluoranten, benzo[j]fluoranten, benzo[k]fluoranten, benzo[a]piren, benzo[g,h,i]perilen, dibenzo[a,h]antracen, indeno[1,2,3-cd]pi-

ren, dibenzo[*a,e*]piren, dibenzo[*a,h*]piren, dibenzo[*a,i*]piren, dibenzo[*a,l*]piren). Benzo[*a*]piren je, takođe, prvobitno bio korišćen kao marker i indikator prisustva i karcinogenosti PAH jedinjenja u analiziranim uzorcima.

Regulativom komisije Evropske Unije od 19. avgusta 2011 [14] odlučeno je da se benzo[*a*]piren više ne može smatrati pogodnim markerom i indikatorom PAH jedinjenja, a u tu svrhu, umesto benzo[*a*]pirena, koristi se suma sadržaja PAH4 jedinjenja (benzo[*a*]piren, benzo[*a*]antracen, benzo[*b*]fluoranten i hrizen). Takođe, Komisija je propisala i maksimalno dozvoljene količine (MDK) za benzo[*a*]piren i sumu PAH4 u različitim namirnicama i one su i sastavni deo propisa Republike Srbije (tabela 1) [15].

Cilj ovog rada bio je validacija metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje benzo[*a*]antracena, hrizena, benzo[*b*]fluorantena i benzo[*a*]pirena u dimljenom mesu i dimljenim proizvodima od mesa u skladu sa zahtevima Pravilnika Republike Srbije [15] koji je stupio na snagu 13. marta 2014. Ovaj rad predstavlja nastavak našeg prethodnog istraživanja [16].

EKSPERIMENTALNI DEO

Plan validacije metode

Validacija metode urađena je po postupku koji je zasnovan na odluci EU 657/2002 [17]. S obzirom da su PAH jedinjenja lipofilna, kao matriks na kome će vršiti validacija izabrana je svinjska mast, za koju je analizom

utvrđeno da ne sadrži ostatke jedinjenja koja podležu validacionom procesu (blanko uzorak masti). Smeša standarda PAH4 jedinjenja kojom su obogaćivani blanko uzorci masti pripremljena je tako da suma PAH4 jedinjenja, kao i sadržaj BaP budu jednaki MDK vrednostima propisane ovim pravilnikom, koja važe od 1. septembra 2014. godine (tabela 1). U tabeli 2 dati su teoretski sadržaji BaA, CHR, BbF i BaP u dimljenom mesu i dimljenim proizvodima od mesa u $\mu\text{g}/\text{kg}$ na različitim MDK nivoima obogaćenosti blanko uzoraka masti. Tokom validacije metode, određivani parametri bili su specifičnost, ponovljivost, intra-laboratorijska reproducibilnost, limit detekcije, limit kvantifikacije i prinos, u skladu sa EU Regulativom br. 836/2011 [18].

Tabela 2. Teoretski sadržaji pojedinačnih PAH4 jedinjenja ($\mu\text{g}/\text{kg}$) na različitim MDK nivoima
Table 2. Theoretical content of the PAH4 compounds ($\mu\text{g}/\text{kg}$) on different MRL levels

MDK / $\mu\text{g kg}^{-1}$	Jedinjenje				
	BaA	CHR	BbF	BaP	suma PAH4
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

Reagensi i ostali materijali

Tokom procesa validacije metode korišćeni su: acetonitril (Sigma Aldrich, Germany), metilen-hlorid (J.T.

Tabela 1. MDK (maksimalno dozvoljene količine) za PAH jedinjenja
Table 1. MRL (maximum residue level) for the PAH4 compounds

Tačka	Proizvod	Benzo[<i>a</i>]piren MDK / $\mu\text{g kg}^{-1}$	Suma benzo[<i>a</i>]pirena, benzo[<i>a</i>]antracena, benzo[<i>b</i>]fluorantena i hrizena, MDK / $\mu\text{g kg}^{-1}$
6.1.1.	Ulja i masti (isključujući kakao puter i kokosovo ulje) namenjena za neposrednu ljudsku potrošnju ili kao sastojak u hrani	2,0	10,0
6.1.2.	Kakao u zrnu ili proizvodi od kakao zrna	5,0	35,0 do 31.3.2015. godine; 30,0 od 1.4.2015. godine.
6.1.3.	Kokosovo ulje namenjeno za neposrednu ishranu ljudi ili kao sastojak u hrani	2,0	20,0
6.1.4.	Dimljeno meso i dimljeni proizvodi od mesa	5,0 do 31.8.2014. godine; 2,0 od 1.9.2014. godine	30,0 do 31.8.2014. godine; 12,0 od 1.9.2014. godine
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	5,0 do 31.8.2014. godine; 2,0 od 1.9.2014. godine	30,0 do 31.8.2014. godine; 12,0 od 1.9.2014. godine
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	5,0	30,0
6.1.7.	Školjke (dimljene)	6,0	35,0

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 . Svi korišćeni rastvarači bili su HPLC čistoće. Standardi PAH4 jedinjenja, bili su analitičke čistoće proizvođača Dr. Ehrenstorfer, Germany.

Priprema uzoraka za HPLC analizu i HPLC analiza

Ubrzana ekstrakcija pomoću rastvarača (accelerated solvent extraction, ASE)

Blanko uzorak pripremljen je tako, što je ekstrakciona ASE ćelija od 33 ml, napunjena smešom za sušenje. Matriksi obogaćeni PAH4 jedinjenjima pripremani su na sledeći način: 2,00 g blanko masti pomešano je sa istom ili većom masom smeše za sušenje. Tako pripremljen uzorak stavljen je u ASE ćeliju, i u nju je dodata određena zapremina PAH4 smeše, poznate koncentracije. Obogaćivanje je vršeno na nivou od 0,5 MDK, 1 MDK ili 1,5 MDK. Nakon obogaćivanja, ASE ćelije su dopunjavane smešom za sušenje. Ekstrakcija uzorka rađena je na aparatu ASE 200 Dionex (Sunnyvale, USA), uz korišćenje n-heksana kao rastvarača, na temperaturi od 100 °C i pritisku od 10 MPa. Nakon ekstrakcije rastvarač je uparen u struji azota, u N-uparivaču sa kabinetom na 50 °C. Nakon uparavanja, ASE viala su ostavljane u eksikator preko noći, a zatim su obogaćeni uzorci matriksa iz ASE viala preneti n-heksanom u normalni sud od 10 ml.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (solid phase extraction, SPE)

Ekstrakcija na čvrstoj fazi je korišćena kao postupak za uklanjanje molekula lipida iz ispitivanih uzoraka. Prečišćavanje je vršeno pomoću mega SPE kolonice. Od pripremljenog uzorka nakon ASE ekstrakcije uzimano je 1 ml i nanošeno na kolonu, nakon ispiranja i kondicioniranja mega SPE kolonice [19].

HPLC analiza

HPLC ispitivanja izvođena su korišćenjem visokoefikasne tečne hromatografije sa fluorescentnim detektorom, korišćenjem HPLC uređaja (Shimadzu, Japan), koji se sastoji od pumpe LC-20AB, autosamplera SIL-20A, degazera DGU-20A5, peći CTO-20A i fluorescentnog detektora RF-10AXL. Uslovi HPLC analize utvrđeni su u prethodnom istraživanju [16], kolona: Phenomenex, Envirosep PP 5 μm PP, LC column 125 mm \times 4.6 mm; predkolona: Security Guard Cortridges C 18 4 mm \times 3,0 mm ID; vreme trajanja analize: 35 min; injektovana zapremina: 50 μl ; protok mobilne faze: 1,2 ml/min; pritisak u koloni: 0,0–35,0 MPa; talasne dužine (ekscitacija/emisija): BaA i CHR – 275/385 nm,

BbF – 256/446 nm, BaP – 260/410 nm; T peći 25–85 °C; mobilna faza: ACN/H₂O=70/30).

Statistička obrada podataka

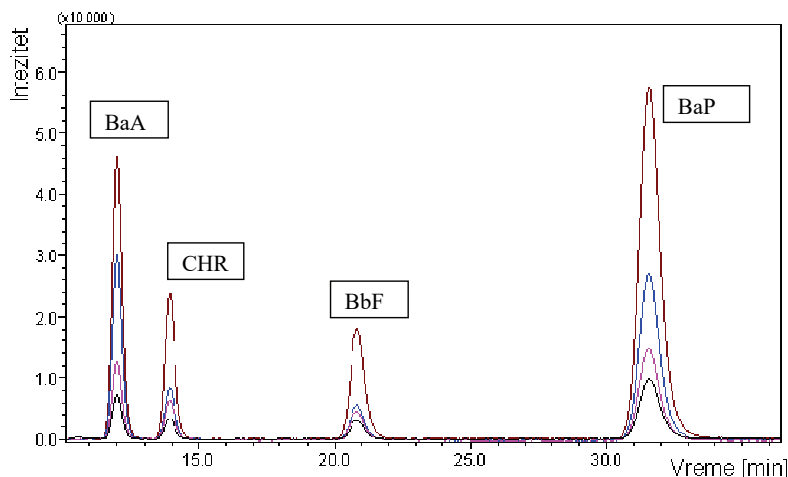
Statistička evaluacija dobijenih rezultata urađena je korišćenjem statističkog programa Minitab 16, primenom analize varijansi (ANOVA One-Way) i Tukey HSD post hoc testa za određivanje statistički značajnih razlika ($p < 0,05$) između srednjih vrednosti prinosa PAH4 jedinjenja, za odgovarajuće merene vrednosti.

REZULTATI I DISKUSIJA

Ispitani su blanko uzorci masti u cilju potvrde specifičnosti metode (odsustva interferenci). 20 blanko uzoraka masti pripremljeno je za HPLC analizu kao što je opisano u eksperimentalnom delu. Na osnovu dobijenih hromatograma ispitanih uzoraka utvrđeno je da je metoda specifična, tj. na retencionim vremenima analiziranih jedinjenja ne pojavljuju se interference koje bi onemogućavale identifikaciju i kvantifikaciju BaA, CHR, BbF i BaP. Na slici 2 prikazani su hromatogrami standardne smeše PAH4 jedinjenja na nivoima obogaćenosti blanko uzorka masti od 0,25, 0,5, 1 i 1,5 MDK. Na osnovu ovih hromatograma određena je linearnost u pet tačaka, uključujući i nulu, za svako ispitano PAH4 jedinjenje ($r^2_{\text{BaA}} = 0,997$; $r^2_{\text{CHR}} = 0,997$; $r^2_{\text{BbF}} = 0,994$; $r^2_{\text{BaP}} = 0,993$; $p < 0,05$ -za sve korelacije). Kalibracija se izvodila pre svakog validacionog eksperimenta.

Blanko uzorci masti ($n = 20$), obogaćeni su PAH4 smešom na nivou 1 MDK. Na osnovu dobijenih rezultata nakon HPLC analize izračunata je granica odluke – C_{α} . Granica odluke je granična vrednost na i iznad koje se, sa α verovatnoćom greške (α – procenat lažno pozitivnih rezultata), može zaključiti da uzorak nije u skladu sa propisima [17]. Prinosi analiziranih jedinjenja bili su u opsegu od 76,6 do 100,0% za BaA, od 98,4 do 102,3% za CHR, od 98,5 do 100,0% za BbF i od 98,2 do 103,3% za BaP. Granica odluke se računa tako što se za ispitanih 20 obogaćenih uzoraka blanko masti izračuna standardna devijacija (Sd) sadržaja pojedinačnog jedinjenja u uzorku, pomnoži sa 1,64 i doda vrednosti MDK. Izračunata vrednost za C_{α} iznosi 12,46 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Sposobnost detekcije određena je na sledeći način. Blanko uzorci masti ($n = 20$) obogaćeni su PAH4 smešom na nivou C_{α} , a zatim je na osnovu dobijenih rezultata nakon HPLC analize izračunata je vrednost za C_{β} , tj. sposobnost detekcije. Sposobnost detekcije je najmanja količina supstance koju je moguće detektovati, identifikovati ili kvantifikovati u uzorku, sa β verovatnoćom greške (β – procenat lažno negativnih rezultata). U slučaju supstanci za koje je utvrđena maksimalno dozvoljena količina (MDK vrednost), sposobnost detekcije je koncentracija na kojoj se metodom mogu, sa statističkom sigurnošću od $1-\beta$, detektovati koncentracije na MDK vrednosti. Na osnovu dobijenih



Slika 2. Hromatogrami standarda PAH4 jedinjenja na nivou 0,25, 0,5, 1 i 1,5 MDK.

Figure 2. Chromatograms of standard solutions of the PAH4 compounds at the level of 0.25, 0.5, 1 and 1.5 MRL.

rezultata utvrđeno je da se prinosi analiziranih jedinjenja kreću u opsegu od 86,7 do 100,1% za BaA, od 99,0 do 100,5% za CHR, od 98,8 do 100,5% za BbF i od 99,7 do 100,3% za BaP. Sposobnost detekcije – $Cc\beta$, se računa tako što se za ispitanih 20 obogaćenih uzoraka blanko masti, tokom trećeg dana validacije, izračuna standardna devijacija (Sd) sadržaja pojedinačnog jedinjenja u uzorku, pomnoži sa 1,64 i doda vrednost $Cc\alpha$. Izračunata vrednost za $Cc\beta$ iznosi 12,76 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

U cilju ispitivanja ponovljivosti, tri dana je po 6 blanko uzoraka masti obogaćeno PAH4 smešom na nivoima od 0,5, 1 i 1,5 MDK. U tabeli 3 date su izra-

čunate vrednosti prinosa nakon HPLC analize. Na osnovu dobijenih rezultata izračunata je vrednost za koeficijent varijacije (Cv) i ispitana je ponovljivost. Uobičajeno je da se teorijska vrednost koeficijenta varijacije izračunava iz Horovicove jednačine [20]. Međutim, za niske sadržaje (npr. 10 ili 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) Horovicova jednačina daje neprihvatljivo visoke vrednosti za Cv , pa se u tim slučajevima koristi Tompsonov model izračunavanja [21]. Koeficijent varijacije prinosa, za niske sadržaje, prema Tompsonovoj jednačini treba da bude manji od 22%.

Korišćenjem dobijenih podataka izračunat je koefi-

Tabela 3. Prinosi obogaćenih blanko uzoraka masti ($n = 6$) tokom tri dana validacije metode u cilju ispitivanja ponovljivosti

Table 3. Recovery of spiked fat blank samples ($n = 6$) during three days of validation of the method in order to test the repeatability

Proračun	Obogaćenost matriksa	PAH4	Prinos, (SV \pm SD) ^a / %		
			Ia	IIa	IIIa
Ia, IIa, IIIa – dani	0,5 MDK	BaA	100,1 \pm 0,7	100,7 \pm 1,4	99,8 \pm 0,3
		CHR	102,4 \pm 3,0 ^b	99,4 \pm 0,8 ^b	99,5 \pm 0,4 ^c
		BbF	100,5 \pm 2,9	97,6 \pm 2,7	99,7 \pm 0,8
		BaP	91,0 \pm 8,9	96,4 \pm 4,4	97,3 \pm 5,0
	1 MDK	BaA	108,6 \pm 5,1 ^b	100,0 \pm 0,1 ^c	99,9 \pm 0,4 ^c
		CHR	97,1 \pm 1,9 ^b	99,7 \pm 0,4 ^c	99,9 \pm 0,1 ^c
		BbF	96,3 \pm 2,3 ^b	99,6 \pm 0,5 ^c	99,9 \pm 0,1 ^c
		BaP	104,2 \pm 5,0	103,3 \pm 6,1	100,0 \pm 0,3
	1,5 MDK	BaA	99,8 \pm 0,4	99,8 \pm 0,1	100,1 \pm 0,3
		CHR	99,6 \pm 0,5	99,9 \pm 0,5	99,8 \pm 0,3
		BbF	99,6 \pm 0,2	99,7 \pm 0,7	99,8 \pm 0,2
		BaP	96,3 \pm 4,1	96,9 \pm 4,8	97,7 \pm 3,3
		BaA	CHR	BbF	BaP
Cv_{srednje} / %		3,17	1,72	1,94	6,16
HORRAT, definisan regulativom 836/2011		< 2	< 2	< 2	< 2
HORRAT, izračunat	0,5 MDK	1,000	0,999	1,001	1,008
	1 MDK	0,996	1,002	1,002	0,996
	1,5 MDK	1,000	1,000	1,000	1,005

^asrednja vrednost \pm standardna devijacija; ^{a,b}vrednosti u istom redu koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Vrednosti koje se statistički značajno ne razlikuju nisu obeležene slovnim oznakama

cijent varijacije prinosa (tabela 3), za svako ispitano jedinjenje, na svim nivoima obogaćenosti uzoraka. Na osnovu dobijenih vrednosti, koje su znatno ispod 22%, može se zaključiti da je postignuta dobra ponovljivost. U skladu sa Regulativom Komisije EU br. 836/2011 [18], a u cilju ispitivanja ponovljivosti izračunata je $HORRAT_r$ vrednost (tabela 3). Izračunate $HORRAT_r$ vrednosti za sva četiri ispitana jedinjenja ispunjavaju propisane uslove.

Preciznost u uslovima ponovljivosti ispitana je na isti način kao i ponovljivost. U toku tri dana, po 6 blanko uzoraka masti obogaćeno je PAH4 smešom, na nivoima od 0,5, 1 i 1,5 MDK. U tabeli 4 date su izračunate vrednosti prinosa nakon HPLC analize tako pripremljenih uzoraka. Cilj je bio da se izračuna koeficijent varijacije (C_v) svih rezultata, koji, prema Tompsonovoj jednačini treba da bude manji od 22%, i na taj način ispita preciznost u uslovima ponovljivosti.

Na osnovu dobijenih vrednosti za koeficijent varijacije prinosa, može se zaključiti da je postignuta dobra intralaboratorijska reproducibilnost. U skladu sa Regulativom Komisije EU br. 836/2011 [18], dobra intra-laboratorijska reproducibilnost je postignuta ukoliko je izračunata $HORRAT_R$ vrednost (tabela 4) manja od 2. Izračunate $HORRAT_R$ vrednosti za ispitana PAH4 jedinjenja ispunjavaju propisane uslove.

Statističkom obradom rezultata, koji su dobijeni u cilju ispitivanja ponovljivosti (tabela 3), kao i u cilju ispitivanja preciznosti u uslovima ponovljivosti (tabela 4), ustanovljeno je da postoji statistički značajna raz-

lika ($p < 0,05$) između srednjih vrednosti prinosa za određena PAH jedinjenja na istom nivou obogaćenosti matriksa (tabele 3 i 4).

Nakon završene in-house validacije, izračunate su vrednosti za limit detekcije (Limit of detection, LOD) i limit kvantifikacije (Limit of quantification, LOQ) za PAH4 jedinjenja. LOD je izračunat kao trostruka vrednost šuma koji se javlja na retencionom vremenu traženog jedinjenja, u blanko uzorku masti, preračunat na sadržaj jedinjenja, izražen u $\mu\text{g}/\text{kg}$. LOQ predstavlja osam puta veću vrednost od vrednosti šuma na retencionom vremenu analiziranog PAH4 jedinjenja, u blanko uzorku masti, izražen u $\mu\text{g}/\text{kg}$. LOD i LOQ vrednosti dobijene za PAH4 jedinjenja (BaA, CHR, BbF i BaP) prikazane su u tabeli 5.

Tabela 5. Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) PAH4 jedinjenja

Table 5. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the PAH4 compounds

PAH4	$LOD / \mu\text{g kg}^{-1}$	$LOQ / \mu\text{g kg}^{-1}$
BaA	0,23	0,87
CHR	0,25	0,82
BbF	0,19	0,50
BaP	0,03	0,07

ZAKLJUČAK

Tabela 4. Prinosi obogaćenih blanko uzoraka masti ($n = 6$) tokom tri dana validacije metode u cilju ispitivanja preciznosti u uslovima ponovljivosti

Table 4. Recovery of spiked fat blank samples ($n = 6$) during three days of validation of the method in order to test the within-laboratory reproducibility

Propračun	Obogaćenost matriksa	PAH4	Prinos, ($SV \pm SD$) ^a / %		
			Ib	IIb	IIIb
Ib, IIb, IIIb – dani	0,5 MDK	BaA	100,0±0,3	99,7±0,4	99,7±0,3
		CHR	99,8±0,5	99,7±0,3	99,8±0,5
		BbF	99,6±0,2 ^b	99,5±0,3 ^b	99,0±0,3 ^c
		BaP	90,9±10,8	94,6±5,2	96,0±5,9
	1 MDK	BaA	100,0±0,2 ^b	99,6±0,4 ^c	99,7 ±0,2 ^{b,c}
		CHR	99,8±0,1	99,7±0,3	99,7±0,1
		BbF	99,3±1,2	99,0±1,6	99,9±0,2
		BaP	99,8±0,3	99,7±0,1	99,9±0,2
	1,5 MDK	BaA	99,9±0,2	99,5±0,3	99,5±0,3
		CHR	99,6±0,4	99,6±0,2	99,8±0,3
		BbF	99,8±0,3	99,7±0,2	99,8±0,4
		BaP	96,6±5,1	96,6±5,2	97,4±4,0
$C_{v\text{srednje}} / \%$		BaA	CHR	BbF	BaP
		0,33	0,32	0,72	5,74
$HORRAT_r$, definisan regulativom 836/2011		< 2	< 2	< 2	< 2
$HORRAT_r$, izračunat	0,5 MDK	1,000	1,000	1,001	1,010
	1 MDK	1,000	1,000	1,001	1,000
	1,5 MDK	1,001	1,000	1,000	1,005

^aSrednja vrednost ± standardna devijacija; ^{b,c}vrednosti u istom redu koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Vrednosti koje se statistički značajno ne razlikuju nisu obeležene slovnim oznakama

Na osnovu rezultata in-house validacije metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje PAH4 jedinjenja (benzo[a]piren, benzo[a]antracen, benzo[b]fluoranten, hrizen) u dimljenom mesu i dimljenim proizvodima od mesa potvrđeni su zahtevi (specifičnost, ponovljivost, preciznost u uslovima ponovljivosti, prinos, LOD i LOQ) definisani Regulativom Komisije EU br. 836/2011. U svakodnevnoj analitičkoj praksi metoda se uspešno može primeniti za analizu PAH4 jedinjenja u u dimljenom mesu i dimljenim proizvodima od mesa.

Napomena

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

LITERATURA

- [1] L. Tóth, *Chemie der Riiucherung*, Verlag Chemie, Berlin, 1983.
- [2] D. Castro, K. Slezakova, C. Delerue-Matos, M.C. Alvim-Ferraz, S. Morais, M.C. Pereira, Polycyclic aromatic hydrocarbons in gas and particulate phases of indoor environments influenced by tobacco smoke: Levels, phase distributions, and health risks, *Atmos. Environ.* **45** (2011) 1799–1808.
- [3] O. Oguntoko, A. Adebulehin, H. Annegarn, Biomass Energy Utilisation, Air Quality and the Health of Rural Women and Children in Ido LGA, South-Western Nigeria, *Ind. Built Environ.* **22** (2013) 528–534.
- [4] G.D. Charles, M.J. Bartels, T.R. Zacharewski, B.B. Gollapudi, N.L. Freshour, E.W. Carney, Activity of benzo(a)pyrene and its hydroxylated metabolites in an estrogen receptor- α receptor gene assay, *Toxicol. Sci.* **55** (2000) 320–326.
- [5] P. Šimko, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives, *J. Chromatogr., B* **770** (2002) 3–18.
- [6] M. Lodovici, M. Venturini, E. Marini, D. Grechi, P. Dolara, Polycyclic aromatic hydrocarbons air levels in Florence, Italy, and their correlation with other air pollutants, *Chemosphere* **50** (2003) 377–382.
- [7] K. Straif, R. Baan, Y. Grosse, B. Secretan, F. El Ghissassi, V. Coglianò, Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (on behalf of the WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group), *Lancet Oncol.* **6** (2005) 931–932.
- [8] W. Jira, K. Ziegenhals, K. Speer, PAH in smoked meat products according to EU standards, *Fleischwirtschaft Int.* **4** (2006) 11–17.
- [9] J. Djinovic-Stojanovic, A. Popovic, A. Spiric, W. Jira, Emission of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Beech Wood Combustion, *Energ. Sources Part A* **35** (2013) 328–336.
- [10] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures, Vol. 92, Lyon, 2010.
- [11] European Food Safety Authority (EFSA), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain, *EFSA J.* **724** (2008) 1–114.
- [12] European Commission, Commission Recommendation 2005/108/EC of 4 February 2005 on the further investigation into the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in certain foods, *O. J. EU L* **34** (2005) 43–45.
- [13] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Summary and Conclusion. Sixty-Fourth meeting, Rome, 8-17 February, 2005, *JECFA/64/SC*, <http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en/>
- [14] European Commission, 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, *O. J. EU L* **215** (2011) 4–8.
- [15] Službeni glasnik Republike Srbije, 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.
- [16] J. Đinović-Stojanović, J. Stišović, A. Popović, D. Nikolić, S. Janković, Određivanje PAH4 jedinjenja u dimljenom mesu i dimljenim proizvodima od mesa – razrada metode, *Tehnologija mesa* **55** (2014) 184–198.
- [17] European Commission, Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC establishes criteria and procedures for the validation of analytical methods to ensure the quality and comparability of analytical results generated by official laboratories, *O. J. EU L* **221** (2002) 8–36.
- [18] European Commission, Commission Regulation (EU) 836/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 333/2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs Text with EEA relevance, *O. J. EU L* **215** (2011) 9–16.
- [19] S. Moret, L.S. Conte, A rapid method for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in vegetable oils, *J. Sep. Sci.* **25** (2002) 96–100.
- [20] W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents, *J. AOAC Int.* **63** (1980) 1344–1354.
- [21] M. Thomposon, Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Anal. Commun.* **125** (2000) 385–386.

SUMMARY

Benzo[*a*]pyrene, benz[*a*]anthracene, benzo[*b*]fluoranthene and chrysene in smoked meat and smoked meat products - validation of the method

Jasna M. Djinovic-Stojanovic¹, Jelena M. Stisovic², Aleksandar R. Popovic², Dragica M. Nikolic¹, Sasa D. Jankovic¹

¹*Institute of Meat Hygiene and Technology, Kacanskog 13, 11000 Belgrade, Serbia*

²*Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12-16, 11000 Belgrade, Serbia*

(Scientific paper)

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are products of the incomplete combustion or pyrolysis of organic material and they are among the most harmful compounds. During process of meat smoking, wood combustion is one of the most important sources of PAH compounds, which can be adsorbed by the surface of meat. The EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM Panel) recommended to the member states of European Union to use the sum of benzo[*a*]pyrene (BaP), benz[*a*]anthracene (BaA), benzo[*b*]fluoranthene (BbF) and chrysene (CHR), (PAH4 compounds), as a marker for the occurrence and impact of carcinogenic PAHs in food, instead of benzo[*a*]pyrene. The maximum content of BaP and sum of all four compounds (PAH4) has been established by European Commission Regulation No. 835/2011. For smoked foods, from 1st September 2014, the maximum BaP content was lowered to 2 µg/kg, while the content of PAH4 is allowed to 12 µg/kg. The new maximum residue limits (MRL) both for BaP and sum of PAH4 compounds in smoked meat and meat products were defined by the legislation of Serbia, as well, and it is in accordance with EU regulation. The aim of this paper was the validation of the method for identification and determination of benzo[*a*]pyrene, chrysene, benz[*a*]anthracene and benzo[*b*]fluoranthene 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 PAH4 compounds. Fluorescence detector operated at excitation/emission wavelength 275/385 nm for BaA and CHR, 256/446 nm for BbF and 260/410 nm for BaP, respectively. On the base of experimental results, it is possible to conclude as follows: The in-house validation procedure of the method meets all criteria (applicability, specificity, repeatability, reproducibility, recovery, LOD and LOQ) set out by EU Regulation No. 836/2011. The method is suitable for operative control of PAH4 content in smoked meat products.

Keywords: PAH4 compounds • Benz[*a*]anthracene • Chrysene • Benzo[*b*]fluoranthene • Benzo[*a*]pyrene • Smoked meat and smoked meat products • Validation