

Validacija GC-MS metode za određivanje policikličkih aromatskih ugljikovodika u dimljenim kobasicama

Kovačević, Vedrana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:814721>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-18**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Vedrana Kovačević

**VALIDACIJA GC-MS METODE ZA ODREĐIVANJE POLICIKLIČKIH
AROMATSKIH UGLJIKOVODIKA U DIMLJENIM KOBASICAMA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za biokemiju i toksikologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Opasnosti vezane uz hranu

Tema rada: je prihvaćena na XI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2017/2018. održanoj 28. rujna 2018.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Krešimir Mastanjević

Ko-mentor: doc. dr. sc. Bojan Šarkanj

Validacija GC-MS metode za određivanje policikličnih aromatskih ugljikovodika u dimljenim kobasicama

Vedrana Kovačević, 453-DI

Sažetak: Cilj ovog rada je validirati GC-MS metodu za određivanje policikličnih aromatskih ugljikovodika u dimljenim kobasicama. Prema mišljenju europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) metoda treba uključivati 16 najznačajnijih policikličnih aromatskih ugljikovodika. Na temelju iskorištenja smo odabrali i validirali metodu po Kartalović i sur. (2015). Ključni parametri validacije su bili linearnost, ponovljivost, obnovljivost, granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ). Budući da su zadovoljeni svi kriteriji GC-MS metoda je primjenjiva za određivanje 16 policikličnih aromatskih ugljikovodika u dimljenim kobasicama.

Ključne riječi: policiklični aromatski ugljikovodici, validacija, GC-MC metoda

Rad sadrži: 34 stranice
4 slike
3 tablice
27 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | | |
|----|--------------------------------------|---------------|
| 1. | doc.dr.sc. Ante Lončarić | predsjednik |
| 2. | izv.prof.dr.sc. Krešimir Mastanjević | član-mentor |
| 3. | doc.dr.sc. Bojan Šarkanj | član-komentor |
| 4. | dr.sc. Tihomir Kovač, znan. sur. | zamjena člana |

Datum odbrane: 03. srpanj 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENT CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Biochemistry and Toxicology
Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek, Croatia

Graduate program Food engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food Technology

Course title: Food Hazards

Thesis subject: was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. XI held on 28th of September 2018.

Mentor: Krešimir Mastanjević, PhD, associate prof.

Co-mentor: Bojan Šarkanj, PhD, assistant prof.

Validation of GC-MS Method for Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Smoked Sausages

Vedrana Kovačević, 453-DI

Summary: The aim of this paper is to validate the GC-MS method for determining polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked sausages. In the opinion of the European Food Safety Authority (EFSA) the method should include the 16 most significant polycyclic aromatic hydrocarbons. Based on utilization we have selected and validated the method by Kartalović et al. (2015). The key validation parameters were linearity, repeatability, renewability, detection limit (LOD) and quantification limit (LOQ). Since all GC-MS criteria have been met, the method is applicable to the determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked sausages.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons, validation, GC-MS method

Thesis contains: 34 pages

4 figures

3 tables

27 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | | |
|----|--|----------------------|
| 1. | Ante Lončarić, PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. | Krešimir Mastanjević, PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. | Bojan Šarkanj, PhD, assistant prof. | member-co-supervisor |
| 4. | Tihomir Kovač, PhD, scientific associate | stand in |

Defense date: July 3, 2019

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

SADRŽAJ:

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 2 |
| 2.1 POLIČIKLIČNI AROMATSKI UGLJIKOVODONICI | 5 |
| 2.1.1. Kemijska i fizikalna svojstva PAH-ova | 8 |
| 2.1.2. Prisutnost PAH-ova u hrani i djelovanje na smanjenje količine PAH-ova u hrani | 8 |
| 2.1.3. Toksičnost PAH-ova i toleriranidnevni unos..... | 10 |
| 2.2. VALIDACIJA | 12 |
| 2.3 PLINSKA KROMATOGRAFIJA-MASENA SPEKTROMETRIJA (GC-MS) | 16 |
| 2.3.1. Princip rada..... | 16 |
| 2.3.2. Primjena | 17 |
| 2.3.3. Prednosti i nedostaci | 18 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 19 |
| 3.1. ZADATAK..... | 20 |
| 3.2. MATERIJALI | 20 |
| 3.3. METODA | 20 |
| 3.3.1. Parametri plinske kromatografije - masene spektrometrije..... | 20 |
| 3.3.2. Metode ekstrakcije PAH-ova | 21 |
| 3.3.3. Validacija metode..... | 22 |
| 5. ZAKLJUČAK | 29 |
| 6. LITERATURA | 31 |

KRATICE POJMOVA

GC-MS -plinska kromatografija-masena spektrometrija

PAH - policiklički aromatski ugljikovodici

EFSA - Europska agencija za sigurnost hrane

IARC –Internacionalna agencija za istraživanje raka

LOD – granica detekcije

LOQ – granica kvantifikacije

TIC –total-ion Current

ACN – acetonitril

NAF – naftalen

ACI – acenaftilen

ACE – acenaften

FLU – fluoren

FEN – fenantren

ANT – antracen

FLE – fluoranten

PRI – piren

B[a]A – benzo[a]antracen

KRI – krizen

B[b]F – benzo[b]fluoranten

B[k]F – benzo[k]fluoranten

B[a]P – benzo[a]piren

dB[a,h]A – dibenzo[a,h]antracen

I[1,2,3-c,d]P – indeno[1,2,3-c,d]piren

B[g,h,i]P – benzo[g,h,i]perilen

1.UVOD

Postoji mnogo spojeva koji nas okružuju i koji imaju kancerogena svojstva, a jedni od njih su svakako policiklički aromatski ugljikovodici (PAH-ovi). To su organski spojevi koji se sastoje od više povezanih benzenskih prstenova. PAH-ovi su prisutni svuda u okolišu stoga se mogu naći u vodi, zraku, tlu i hrani. Prilikom procesiranja hrane također može doći do nastanka štetnih kemijskih spojeva kao što su i PAH-ovi. Prema IARC-u benzo [a] piren spada u prvu grupu organskih kancerogenih spojeva.

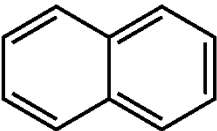
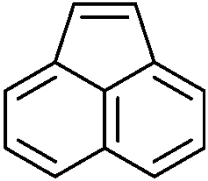
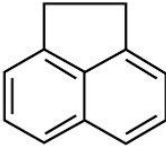
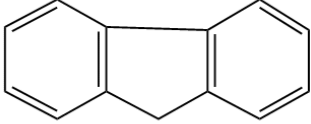
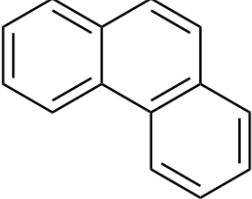
PAH-ovi imaju različitu molekulsku masu, ovisno o broju benzenskih prstenova. Također PAH-ovi veće molekulske mase su u krutom stanju na sobnoj temperaturi, dok je naftalen u plinovitom stanju. PAH-ovi imaju više rezonantnih struktura, a rezonantne strukture ovise o broju prstenova. Još jedno svojstvo PAH-ova je da nisu topivi u vodi, ali su dobro topivi u uljima/mastima, te su također osjetljivi na svjetlosti i termostabilni.

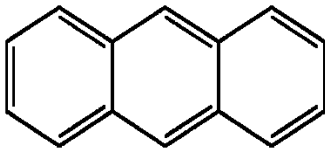
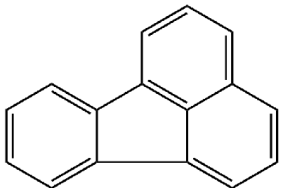
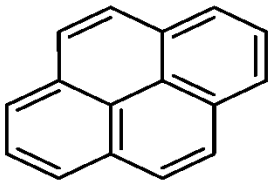
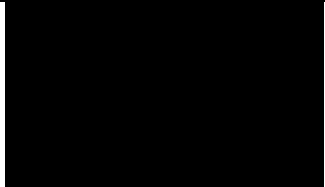
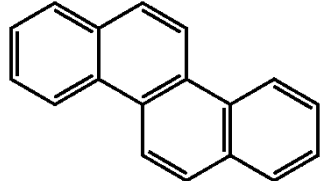
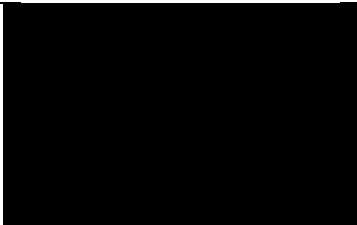
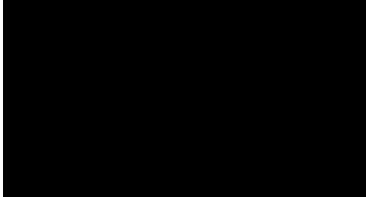
2.TEORIJSKI DIO

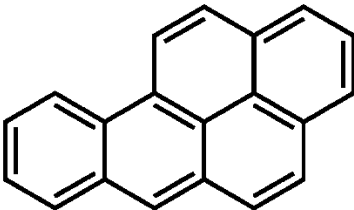
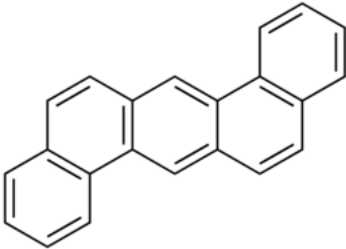
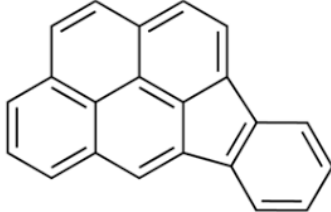
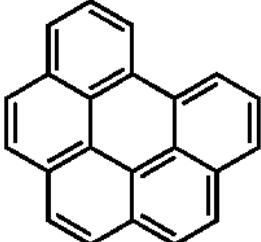
2.1 POLIČIKLIČNI AROMATSKI UGLJIKOVODONICI

Policiklični aromatski ugljikovodici (PAH) su organski spojevi ugljika i vodika povezani u jedan ili više benzenskih i srodnih prstenova. Nekadašnji naziv policikličnih aromatskih ugljikovodika bio poliareni ili polinuklearni ciklični ugljikovodici, međutim taj naziv se već dugo ne koristi (Harvey, 1991). Prema mišljenju europske agencije za sigurnost hrane (EFSA-e) najčešće proučavani i analizirani PAH-ovi su: naftalen, acenaftilen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten, piren, benzo [a] antracen, krizen, benzo [b] fluoranten, benzo [k] fluoranten, benzo [a] piren, dibenzo [a,h] antracen, indeno [1,2,3-c,d] piren, te benzo [g,h,i] perilen (EFSA, 2008).

Tablica 1 Strukture 16 najznačajnijih PAH-ova prema mišljenju EFSA-e

| NAZIV SPOJA, KRATICA | STRUKTURNA FORMULA |
|----------------------|---|
| Naftalen, NAF |  |
| Acenaftilen, ACI |  |
| Acenaften, ACE |  |
| Fluoren, FLU |  |
| Fenantren, FEN |  |

| NAZIV SPOJA, KRATICA | STRUKTURNA FORMULA |
|---------------------------|---|
| Antracen, ANT |  |
| Fluoranten, FLE |  |
| Piren, PRI |  |
| Benzo[a]antracen, B[a]A |  |
| Križen, KRI |  |
| Benzo[b]Fluoranten, B[b]F |  |
| Benzo[k]fluoranten, B[k]F |  |

| NAZIV SPOJA, KRATICA | STRUKTURNA FORMULA |
|--------------------------------------|---|
| Benzo[a]piren, B[a]P |  |
| Dibenzo[a,h]antracen, dB[a,h]A |  |
| Indeno[1,2,3-c,d]piren I[1,2,3-c,d]P |  |
| Benzo[g,h,i]perilen B[g,h,i]P |  |

Tijekom termičkog procesiranja namirnica bogatih ugljikohidratima i mastima, može doći do kemijskih reakcija koje dovode do promjene kemijske strukture i nastanka nepoželjnih spojeva, kao što su PAH-ovi (Harvey, 1991). Prva istraživanja o štetnosti PAH-ova datiraju iz 1775. godine kada je Percivall Pott ukazao na štetnosti čađi i povezanosti između raka testisa i izloženosti čađi tijekom djetinjstva (Luch, 2005). Kasnija istraživanja dokazuju povezanost između raka kože i izloženosti čađi, posebice kod benzo[a]pirena. Internacionalna agencija za istraživanje raka (IARC) je 1987. godine zaključila da je benzo[a]piren kancerogen spoj. Ključan događaj u razvoju raka je da se PAH-ovi metaboliziraju tako da nastaju reaktivni spojevi intermedijari koji se mogu vezati za nukleinske kiseline. Prisutnost PAH-ova je velika i nalaze se u tlu, vodi, zraku i hrani stoga nije ni čudno što postoji toliko istraživanja na temu PAH-ova (Harvey, 1991).

2.1.1. Kemijska i fizikalna svojstva PAH-ova

PAH-ovi su organski ugljikovodici koji sadrže dva ili više kondenziranih benzenskih prstenova.

Naftalen je najjednostavniji složeni aromatski ugljikovodik, iako po nekim autorima ne spada u PAH-ove jer sadrži samo dva kondenzirana benzenska prstena. Fenantren i antrecen također spadaju u najjednostavnije PAH-ove jer sadrže tri kondenzirana benzenska prstena (Harvey, 1991) Po svojim svojstvima i toksičnosti i benzen bih mogao spadati u PAH-ove, ali ne spada budući da sadrži samo jedan prsten. Molekulska masa PAH-ova se kreće od 128,17 g/mol (naftalen) do 252 g/mol (benzo[a]piren) (NRC, 1983a).

Također PAH-ovi su slabo topivi u vodi, ali su zato dobro topivi u uljima/mastima, što utječe na mjesto zadržavanja i taloženja u okolišu. PAH-ovi su također osjetljivi na svjetlost, ali su termorezistentni.

Budući da apsorbiraju u UV spektru, jako specifično se može razaznati svaki prsten i izomer budući da apsorbira jedinstveno u jednom dijelu spektra. Također fluoesciraju zbog prisustva velikog broja dvostrukih veza sa rezonirajućim elektronima (Harvey, 1991).

2.1.2. Prisutnost PAH-ova u hrani i djelovanje na smanjenje količine PAH-ova u hrani

PAH-ove po podrijetlu razlikujemo po tome da li se nalaze u sirovoj hrani (prijenos iz okoliša, vode ili tla) i PAH-ovi koji nastaju u hrani nakon termičkog procesiranja. Neki od PAH-ova koji se najčešće nalaze u hrani su: benz[a]piren, benz[a]antracen, krizen, dibenz[a,h]antracen, piren, antracen, fluoranten i benz[b]fluoranten. Prema uredbi Europske komisije br. 835/2011 benz[a]piren se koristi kao marker za prisutnost i učinak kancerogenih PAH-ova u hrani. Također je Znanstveni odbor za prehranu (eng. *Scientific Committe on Food*) donio je odluku kako nije dovoljno uzimati samo u obzir prisutnost benz[a]pirena, već da bih trebali uzimati i još četiri specifične tvari PAH-ova (benz[a]piren, benz[a]antracen, benzo[b]fluoranten i krizen).

Glavni načini nastajanja PAH-ova u procesiranoj hrani su pečenje, sušenje, dimljenje, prženje i pečenje na roštilju (Šarkanj i sur, 2010). U dimljenom mesu i ribi je nađena najveća količina PAH-ova koja iznosi do 200 µg/kg, dok je u mesu koje je pečeno na roštilju nađeno 130 µg/kg. Prije termičke obrade količina PAH-ova u hrani je od 0,01 do 0,1 µg/kg. Namirnice koje sadrže najviše PAH-ova su: žitarice, ulja, margarin, sušeno voće i dimljeni proizvodi (SFC, 2002).

Glavni način kontaminacije mesa i ribe PAH-ovima je dimljenje i sušenje (Harvey, 1991). Također sama količina PAH-ova u namirnici ovisi o duljini trajanja termičke obrade namirnice, udaljenosti namirnice od izvora topline, načinu pripreme namirnice, količine kisika i temperaturi tretiranja namirnice (Šarkanj i sur., 2010). Bitnu ulogu za stvaranje PAH-ova imaju temperatura dimljenja, vrsta i vlažnost drveta. Dimljenjem proizvoda nastaju specifična organoleptička svojstva koja su povezana s: derivatima fenola, karbonilima, derivatim furana, esterima, organskim kiselinama i pirolima. Dim nastaje nepotpunim izgaranjem tvari, uz prisustvo kisika. Temperature spaljivanja materijala iz kojih nastaje dim za celulozu je 180-300°C, hemicelulozu 260-350°C, te lignin 300-500°C (Harvey, 1991). Na količinu PAH-ova također utječe i izbor drveta, pa se tako najveća količina kancerogenih PAH-ova dobije dimljenjem s drvetom topole, a znatno manje dimljenjem drvetom bukve, trešnje i hrasta. Kod dimljenja ribe tradicionalnim načinom količina PAH-ova je 1,2 µg/kg (NRC 1983b).

Povišenjem temperature termičkog tretmana linearno se povećava i količina PAH-ova nastalih tijekom pirolize, pogotovo kada je temperatura između 400-1000°C, a temperatura dimljenog materijala 50°C. Također, o vlažnosti drveta ovisi i količini nastalih PAH-ova, te se ona može smanjiti povećanjem vlažnosti drveta te nižom temperaturom izgaranja. PAH-ovi mogu nastati i ako mast iz namirnice kapa u vatru. Najmanja količina PAH-ova nastaje ako se meso priprema na pari i iznosi 0,3 µg/kg (Harvey 1991, EFSA 2008, SCF 2002). Prema odredbi Europske komisije dopuštena količina benz[a]pirena u dimljenom mesu i dimljenim mesnim proizvodima, mišićnom mesu dimljene ribe i dimljenim proizvodima ribarstva je 2,0 µg/kg, a benz[a]piren, benz[a]antracen, benz[b]fluoranten i krizen spoja 12 µg/kg (Europska komisija, 2011).

Žitarice sadrže niske količine PAH-ova koje dopijevaju najčešće iz tla ili kontaminacijom usjeva. Trenutno ne postoje njihove propisane dopuštene vrijednosti koje su regulirane odredbom Europske komisije, iako bih trebale zbog njihove češće konzumacije. Također i prženje kave može uzrokovati stvaranje PAH-ova i to u koncentraciji od 0,025 do 17 µg/L. Sama količina PAH-ova u kavi ovisi o stupnju prženja kave kao i o samim kultivarima.

Zrna kaka su također podložni stvaranju PAH-ova, jer tijekom obrade zrna prolaze sušenje, pečenje, prženje i fermentaciju. Najveća količina benz[a]pirena u kakaovom zrnu je 5,0 µg/kg, a četiri PAH spoja 30,0 µg/kg (Europska komisija, 2011).

Biljna ulja i masti također sadrže PAH-ove i bitna su jer se koriste i kao dodatak drugih prehrambenih proizvoda, koji se svakodnevno konzumiraju. Kontaminacija ulja PAH-ovima nastaje tijekom sušenja biljnog materijala ili od otapala koji se koristi za ekstrakciju. Također sama količina PAH-ova se može smanjiti deodorizacijom ulja ili korištenjem aktivnog ugljena kao adsorbenta. Istraživanja su dokazala da je količina PAH-ova u maslinovom ulju veća kod onih maslina kojima su zasadi blizu prometnica, zbog ispušnih plinova automobila (Hopia i sur, 1982). Navedeno potvrđuje da PAH-ovi mogu iz zraka i tla mogu prijeći u biljke. Kod masti i ulja dopuštena količina benz[a]pirena je 2,0 µg/kg, a zbroj četiri koncentracije PAH ne

smije iznositi više od 10,0 µg/kg. Prirodno veće prisustvo benz[a]antracena i krizena se nalazi u kokosovom ulju, ali se može lako ukloniti tijekom rafinacije. Prema uredbi Europske komisije kokosovo ulje može sadržavati najviše 2,0 µg/kg benz[a]pirena i za četiri PAH-a 20,0 µg/kg (Europska komisija, 2011).

Kod povrća dolazi do kontaminacije s PAH-ovima putem zraka ili tla. Količina PAH-ova u povrću najviše ovisi o tipu povrća, godišnjem dobu i udaljenosti od zagađivača zraka, a kreće se između 0,01 do 1,0 mg/kg.

Odabirom pripreme namirnice ili obrade u postrojenju, čuvanjem i upotrebom začina i konzervansa možemo donekle smanjiti i regulirati količinu PAH-ova u namirnici. Količina PAH-ova u namirnici se može smanjiti ako se namirnica kuha, a ne prži ili peče. Kuhanje pri niskim temperaturama ili na pari ima znatno manju količinu PAH-ova. Ako se meso peče na roštilju treba se paziti na to da li mast curi i kaplje na vatru kao i da nije direktno na plamenu. Kod proizvoda koje se dime ne možemo primjenom drugog tehnološkog postupka dobiti proizvod istih senzorskih svojstva. Stoga se koriste tekući dodaci okusa, koji hrani koja nije dimljena mogu dati taj okus dimljenog. Tekući dodaci se pročišćavaju i na taj način sadrže smanjenu količinu PAH-ova. Takav proizvod ima okus dimljenog iako je pripremljen na drugačiji način (Phillips, 1999)

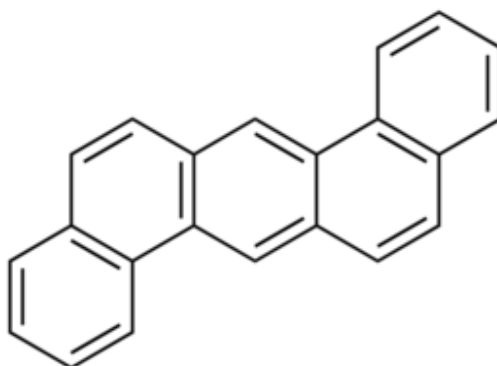
Količina PAH-ova se može smanjiti ukoliko je meso u ambalaži polietilena i do 50% pri termičkoj obradi. Također ukoliko se meso prije pečenja predgrijava na pari ili u mikrovalnoj pećnici može se smanjiti količina PAH-ova. Smanjenju količine PAH-ova mogu imati i začini ili neki dodaci koji imaju antioksidacijska djelovanja. Mariniranje pileline u soku od limuna smanjilo je količinu PAH-ova za 72%, a kod govedine za 39% (Farhadian i sur., 2011). Začini poput đumbira, češnjaka i začinskog bilja mogu smanjiti kancerogena svojstva PAH-ova. Fotodegradacijom možemo smanjiti količine PAH-ova, jer su PAH-ovi osjetljivi na svjetlost. Na taj način se pod djelovanjem UV svijetla mogu ukloniti iz vode. Smanjenjem temperature kod proizvodnje također smanjuje količina PAH-ova. Djelovanjem enzima (biokataliza) dolazi također do smanjenja količine PAH-ova. Veze unutar molekula se destabiliziraju djelovanjem oksigenaza, dehidrogenaza i lingolitičkih enzima (Bansal i Kim, 2015).

2.1.3. Toksičnost PAH-ova i tolerirani dnevni unos

Toksičnost PAH-ova može biti akutna i kronična. Akutna toksičnost ovisi o više čimbenika kao što su dob, spol, načinu i vremenu izloženosti, kao i o zdravstvenom stanju osobe. Neki od simptoma akutne toksičnosti su iritacija oka, mučnina, povraćanje, dijareja i upalni procesi. U zavisnosti od strukture PAH-ova neki mogu izazvati samo alergiju, a neki mogu izazvati i iritaciju na koži. Akutna toksičnost PAH-ova je dokazana na psima, koji su tijekom 7 dana bili izloženi 10,5 g naftalena, pri čemu je došlo do pojave anemije i neurofizioloških poremećaja (SCF, 2002, Zuelzer i Apt, 1949).

Kod kronične toksičnosti ljudi su obično izloženi na radnim mjestima, i najčešći način izlaganja i apsorpcije je udisanjem, iako može biti i oralna i dermalna apsorpcija (Kim i sur., 2003). Također kronična izloženost PAH-ovima je i kod aktivnih i pasivnih pušača. Kod osoba koji su izloženi duže PAH-ovima (na radnom mjestu) dokazano je veća prisutnost raka kože, pluća, probavnog trakta i mokraćnog mjehura. Radnici koji rade u industrijama prerade metala, prisutnost ugljena i koks su uz izloženost PAH-ovima izloženi i nekim drugim kemijskim spojevima koji mogu da reagirati s PAH-ovima. Također PAH-ovi imaju štetan utjecaj na hormone, reproduktivan i imunološki sustav.

Kancerogenost PAH-ova prvi put je uočena krajem 18. stoljeća, kada je Sir Percivall Pott londonski kirurg uočio veću pojavu raka sktoruma kod dimnjačara, budući da su oni izloženi udisanju veće količine PAH-ova. Kancerogenost PAH-ovima je uočena kod konzumacije mate čaja i to rak jednjaka, dušnika, grkljana, pluća, bubrega i mokraćnog mjehura i to kod populacije Južne Amerike, gdje se taj napitak često konzumira. Nije objašnjen mehanizam kancerogenosti mata čaja, iako su apsorbirani PAH-ovi u jednjaku kancerogeni. Pronađen je 21 PAH spoj u mate čaju i to u rasponu koncentracija od 536 do 2906 mg/g suhog lišća. Prvi PAH spoj kojem je dokazana kancerogenost je dibenz[a,h]antracen (**slika 1**). Dokazano je kako čađa, ugljen i katran imaju kancerogena svojstva, a ispitivanjima i studijama su ta svojstva pripisana djelovanjem PAH-ova.



Slika 1 Strukturna formula dibenz[a,h]antracen

Kod određivanja i objašnjavanja kancerogenog spoja bitna je i genotoksičnost. Prvo istraživanje o povezanosti PAH-ova s genotoksičnošću je bilo kod radnika koji su bili izloženi PAH-ovima. Češće mutacije u hipoksantin fosforibosiltransferazi (HRPT) lokusu u limfocita su imali radnici koji rade u ljevaonicama željeza. Također testiranje genotoksičnosti je provedena na stanicama *E.coli* uz mješavinu metaboličkih aktivatora i pokazala se visoka genotoksičnost. Laboratorijska istraživanja na glodavcima su također dokazala genotoksičnost i to sa spojevima krizen, benz[a]antracen i benz[a]piren. Dokazi o genotoksičnosti su ograničeni jer su svi dobiveni *in vitro* studijama.

Zbog svojstva lipofilnosti PAH-ovi su spojevi koji mogu prijeći membrane, od kojih je i placentalna membrana. PAH-ovi mogu utjecati na DNA, i uzrokovati oštećenje ploda. To je dokazano na pokusnim životinjama tako što su im tijekom trudnoće davani benz[a]antracen, naftalen i benz[a]piren i došlo je do defekata ploda i smanjene porođajne mase (EFSA, 2008). Nekoliko istraživanja na ljudima je dokazalo kako trudnice koje su izložene PAH-ovima, rađaju djecu smanjene porođajne mase i da se plod u prvim mjesecima trudnoće slabo razvija. Ako su žene tijekom trudnoće izložene većim količinama PAH-ova, javlja se kod djece do 3 godine smanjenje kvocijenta inteligencije, a kod djece od 6 do 8 godina se javljaju problemi u ponašanju ili astma (Edwards i sur., 2010; Perera i sur, 2011; Wang, 2010). Potrebna su daljnja istraživanja kako bih se dokazalo jer rezultati mogu biti uvjetovani genetskom predispozicijom roditelja. Također je dokazano da PAH-ovi iz cigareta uništavaju male oocite, i da utječu na raniju menopauzu, za razliku od žena koje ne puše.

Toksičnost PAH-ova se također aktivira pomoću svjetlosti. Ovisno o molekularnoj masi PAH-ovi apsorbiraju svjetlost valnih duljina od 320 do 800 nm. PAH-ovi s tri ili četiri prstena apsorbiraju valne duljine svjetlosti u UVA (320-400 nm), dok oni s više aromatskih prstena apsorbiraju valne duljine svjetlosti u VIS (400-800 nm). PAH-ovi pod utjecajem svjetlosti prelaze u viši energetski nivo gdje mogu reagirati s kisikom ili drugim molekulama i tvoriti slobodne radikale koji mogu uzrokovati smrt stanica. Slobodni radikali najčešće djeluju na strukturu DNA, lipide i membranske proteine što uzrokuje lipidnuperoksidaciju i propadanja membrana. Fototoksičnost PAH-ova je inače izražena u vodenom okolišu i opasna je za životinje koje žive pod vodom, zbog lomljenja svjetlosti i transparentnosti vode.

Prema istraživanjima provedenim u Velikoj Britaniji (Phillips, 1999) prosječni dnevni unos po osobi iznosi 3,70 µg ukupnih PAH-ova. Prema rezultatima upitnika koji je proveden u SAD-u 2001. godine dokazano je da najviše PAH-ova dolazi iz žitarica i kruha s 23%, meso pečeno na roštilju s 21%, povrće s 11-13% dok je najmanji unos iz ulja i masti. Dokazano je da unos PAH-ova povećava rizik od pojave raka $2,85 \times 10^{-6}$ puta kod opće populacije, $2,93 \times 10^{-6}$ za muškarce i $2,68 \times 10^{-6}$ za žene (Bansal i Kim, 2015). Da bih došli do vrijednosti dnevnog unosa PAH-ova moramo znati prehrambene navike stanovništva u određenoj populaciji i znati vrijednosti analiza PAH-ova u konzumiranim namirnicama.

2.2. VALIDACIJA

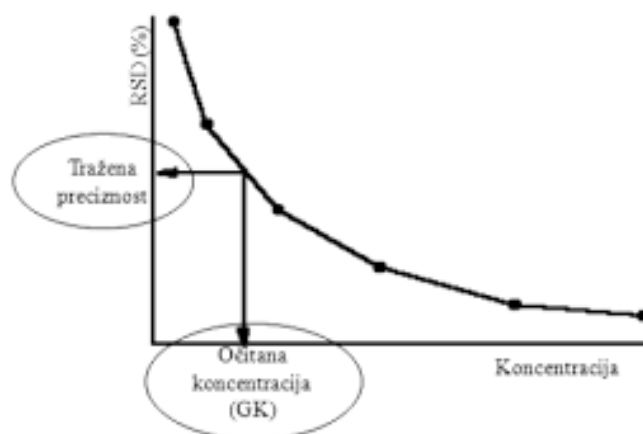
„Validacija pokazuje da analitička metoda ispunjava kriterije koje se odnose na odgovarajuće značajke njene učinkovitosti“ (EZ, 2002). Potvrdom Codex Alimentarius ISO ili IUPAC, validacija se također može provesti među laboratorijskim ispitivanjem ili ispitivanjem u jednom laboratoriju odnosno unutarnja validacija. Validacija se sastoji od 7 parametara validacije, a to su: linearnost, granica detekcije, preciznost, točnost, specifičnost/selektivnost

i područje primjene. Preciznost se može provoditi na četiri razine kao preciznost mjerenja, preciznost pripreme (ponovljivost), međupreciznost i međulaboratorijska ponovljivost.

„Linearnost je sposobnost metode da se dobiju rezultati ispitivanja koji su izravno proporcionalni analitu koncentracije unutar danog raspona“ (Dekker, 1997). Linearnost se procjenjuje matematički i grafički. Matematički se izražava preko jednadžbe pravca ($y = ax + b$) i izračuna koeficijent korelacije r . Nagib pravca (a) je parametar koji ukazuje na osjetljivost metode, odsječak pravca (b) ukazuje na sustavnu pogrešku, a koeficijent korelacije se uspostavlja kriterij $r \geq 0,99$. Kod niskih koncentracija se prihvaća $r \geq 0,98$. Kod grafičkog načina se primjenjuju dva načina. Prvi grafički prikaz odstupanja regresijskog pravca prema koncentraciji ili logaritmu koncentracije. Drugi grafički način je prikaz na osi y i odgovarajućih koncentracija na osi x logaritamske skale. Linija koju smo dobili treba biti vodoravna u cijelom linearnom području, a linearno područje prestaje gdje linija siječe paralelne linije.

Granica detekcije (LOD) je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Procjena signala može biti statistička, vizualna i s pomoću omjera signal/šum. Statističke granice detekcije se određuju na bazi standardne devijacije signala i nagiba prema jednadžbi: $GD = 3,3 \sigma / a$, gdje je a nagib, a σ standardna devijacija regresijskog pravca. Vizualna procjena se određuje razrjeđivanjem otopine uzorka ili cijepljenjem otopine uzorka odgovarajućom količinom analita. Procjenjuje se najmanji signal, a može se primijeniti kod ne instrumentnih i instrumentnih metoda. Procjena omjera signal/šum može se primijeniti samo na analitičke metode s baznom linijom, a prihvatljivi omjer je 3:1.

Granica kvantifikacije (LOQ) je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Granicu kvantifikacije možemo odrediti razrjeđivanjem otopine uzorka ili cijepljenjem uzorka odgovarajućom koncentracijom analita. Ona je također i koncentracija najnižeg kalibracijskog standarda. Pomoću omjera signal / šum procjenjuje se granica detekcije, a prihvatljiv omjer je 10 :1. Ako metoda zahtjeva da ima zadanu preciznost na granici kvantifikacije, onda se napravi više uzoraka poznate koncentracije u području oko moguće granice kvantifikacije. Onda se svaki uzorak izmjeri pet do šest puta i izračunaju se standardne devijacije za svaku koncentraciju, nakon toga ide grafički prikaz. Iz grafičkog prikaza se odredi točna koncentracija na granici kvantifikacije s određenom preciznošću. Granica kvantifikacije je bitna kada se određuju analiti u niskim koncentracijama koje mogu štetiti ljudima i okolišu.



Slika 2 Određivanje granice kvantifikacije s određenom točnošću (Lazarić, 2012)

Preciznost predstavlja slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog uzorka pri propisanim uvjetima eksperimenta. Također preciznost predstavlja raspršenost pojedinačnih uzoraka oko aritmetičke sredine. Izražava se kao standardna devijacija, relativna standardna devijacija ili standardnom pogreškom aritmetičke sredine. Provodi se pet do šest mjerenja s jednom do tri različite koncentracije. Ispituje se koristeći homogene, mjerodavne uzorke. Ako ne možemo dobiti homogen uzorak, koriste se umjetno pripremljeni uzorci. Ovisno o uvjetima u kojima se preciznost određuje, može se izraziti kao ponovljivost, među preciznost, obnovljivost. Uvjeti ponovljivost uključuje jedan laboratorij, istog analitičara, istu aparaturu, te kratko razdoblje provođenja metode, uzorci moraju biti svježije pripremljeni kao i standardi, reagensi i mobilna faza. Među preciznost je odstupanje rezultata dobivenih istom metodom istom laboratoriju u dužem vremenskom razdoblju ali sa izmijenjenim parametrima (različiti analitičari, instrumenti, kolone). Pripremi se šest otopina iste koncentracije s istim propisima koje analizira drugi analitičar, drugi dan na drugome uređaju. Na ovaj način se ispituje hoće li metoda dati iste rezultate nakon razvoja u različitim laboratorijima pod propisanim uvjetima. Obnovljivost je vrsta preciznosti dobivena između više laboratorija. Ona se provodi tako da alikvot homogenog uzorka analiziraju različiti analitičari u različitim laboratorijima, pri radnim uvjetima i radnoj okolini koja se razlikuje od laboratorija do laboratorija ali su još uvijek unutar specifičnih parametara metode.

Točnost pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Kako bih smo to dokazali napravimo analizu uzorka poznate koncentracije i usporede se izmjerene i stvarne vrijednosti. Točnost je također mjera pouzdanosti analitičke metode. Može se ispitati tako što usporedimo rezultate metode sa rezultati druge metode koja je potvrđena kao točna. Također se može ispitati analizom uzorka poznate koncentracije i usporedbom dobivene mjerne vrijednosti sa pravom, već poznatom vrijednosti.

Specifičnost i selektivnost su svojstva metode da odredi željeni analit u prisutnosti određenih komponenata u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima. Za metodu kažemo da je specifična kada se može odrediti samo jedan specifičan analit. Metoda za koju kažemo da je selektivna je metoda kojom se određuje više komponenti istodobno, ali pod uvjetom da te komponente ne smetaju jedna drugoj.

2.3 PLINSKA KROMATOGRAFIJA-MASENA SPEKTROMETRIJA (GC-MS)

Plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS) predstavlja kombinaciju dviju jako moćnih analitičkih tehnika. To je vrlo suvremen proces u kojem se objedinjuju značajke plinske kromatografije (razdvajanje smjesa) i masene spektrometrije (analiza pojedinačnih sastojaka). Glavna snaga GC-MS je mogućnost identifikacije nepoznatih spojeva korištenjem kemijske i elektron-izolacijske baze podataka.

Plinska kromatografija omogućava razdvajanje komponenata iz smjese različitih komponenata. Prvi put je predstavljena 1952. godine. U plinskoj kromatografiji mobilna faza je plin dok stacionarna faza može biti čvrsta ili tekuća. Primjenjuje se za analizu plinovitih tvari ili lako hlapljivih tvari koje isparavaju na radnoj temperaturi kolone (do 400°C), a pritom da ne dođe do njihove razgradnje. Plinska kromatografija se nametnula kao vodeća metoda analize, budući da je veliki broj tvari koje zadovoljavaju ovaj kriterij. Glavni dijelovi kromatografske kolone su injektor, detektor i kromatografska kolona. Mobilna faza odnosno plinovi koji se koriste su helij, dušik, argon, vodik ili ugljikov dioksid. Zbog različitih kemijskih svojstava spojevi se razdvajaju u različitom vremenu.

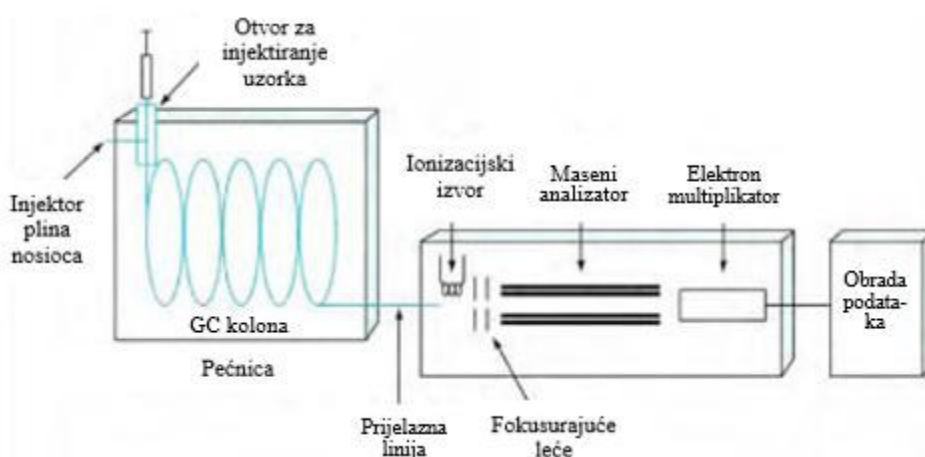
Masenom spektrometrijom se određuje molekulska masa uzorka. "Otac masene spektrometrije" je J. Thomson koji je 1913. godine dokazao kako različiti izotopi imaju različitu molekulsku masu od 20 do 22 g/mol. Kod masene spektrometrije ioni se razdvajaju prema odnosu mase i naboja te se detektiraju, dok se signal pohranjuje u bazi podataka.

2.3.1. Princip rada

Plinski kromatograf se sastoji od injektora, detektora i kolone koje su povezani sa kontroliranom pećnicom koja ima sposobnost da ne dođe do pregrijavanja kolone (**Slika 3**). Plinska kromatografija se bazira na distribuciji analita između dvije faze zbog temperature i njihove hlapljivosti. Kada se injektira u kolonu, uzorak se razdvaja između stacionarne i mobilne faze. Različiti spojevi se različito vežu na stacionarnu fazu, u zavisnosti od njihove strukture. Dok mobilna faza omogućava kretanje kroz kolonu. Kapilarne kolone se koriste, do je ograničavajući faktor maksimalni protok u vakuumskom sustavu spektrometra.

Direktno povezivanje kromatografske kolone s masenom spektrometrom upravo omogućava kapilarna plinska kromatografija zbog smanjenja brzina protoka. Plinoviti uzorak se usmjerava do izvora iona. Izvor iona daje potrebnu energiju za ionizaciju aktivnih molekula, i

održava se na dovoljno velikoj temperaturi. Elektronsku ionizaciju i kemijsku ionizaciju koristimo kod GC-MS analizama. Ioni se razdvajaju kada ulaze iz izvora u maseni analizator. Maseni analizatori koji se koriste u GC-MS analizama su magnetski sektor i kvadrupol. Ioni koji su razdvojeni putuju od analizatora do masenog detektora. Najpopularniji detektor koji se koristi je tzv. „electronmultiplier“, on mora imati brz odgovor koji treba prevesti male struje iona u signale koji se mogu snimiti. Podaci se prikazuju u obliku kromatogramu, najčešći korišten format je TIC (eng. *Total-ion Current*) kromatogram, čiji signal predstavlja zbroj ionske struje za pikove detektirane u masenom spektru.



Slika 3 Shematski prikaz GC-MS uređaja (FAO/WHO, 2006)

2.3.2. Primjena

Navedenu metodu je idealno koristiti za razdvajanje hlapljivih komponenti iz neke smjese.

Također idealno ju je koristiti za:

- kvantitativnu i kvalitativnu analizu hlapljivih organskih sastojaka smjese,
- identifikaciju tragova nečistoća u tekućinama i plinovima,
- testiranje ostalih otapala,
- prisutnost i količina zagađivača te
- evaluaciju difuzije ekstrakata plastike.

2.3.3. Prednosti i nedostaci

Neke od prednosti GC-MS analize su preciznost, visoka osjetljivost, pouzdanost, selektivnost i mala količina uzoraka potrebna za analizu.

Glavni nedostatak je visoka temperatura injektora zbog čega se prilikom prolaska kroz kolonu plinskog kromatografa neke termički labilne tvari mogu razgraditi. Zbog toga se za ovu analizu koriste tvari koje mogu podnijeti višu temperaturu (300-400°C), a pri tome da se ne razgrade. Također, jedan od nedostataka je dugotrajnost i cijena postupka, posebno za kvantitativne analize (Sultović i sur, 2011).

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada je validirati GC-MS metodu za određivanje 16 PAH-ova u sušenoj kobasici, koji su najznačajniji prema mišljenju Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA). Ispitati će se tri različite mješavine soli brze, jednostavne, jeftine, učinkovite, robustne i sigurne (QuEChERS) metode za ekstrakciju te se za validaciju odabrati mješavina soli koja će dati najbolje rezultate iskorištenja pri testiranoj matrici. Ostatak postupka validacije provesti poštujući upute za validaciju kvantitativnih metoda, prema Odluci komisije o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (EZ 657/2002) za GC-MS analize.

3.2. MATERIJALI

Prilikom analize korištena je dimljena slavonska kobasica. Koristili su se uzorci dimljenih kobasica s i bez ovitka.

Kemikalije koje su potrebne:

- ultra čista deionizirana voda,
- acetonitril (ACN),
- magnezij sulfat anhidrid (MgSO_4),
- natrij acetat (CH_3COONa),
- Primarni i sekundarni amini (PSA),
- C18-i,
- standardna otopina PAH standarda (502 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 16 PAH-ova).

3.3. METODA

3.3.1. Parametri plinske kromatografije - masene spektrometrije

Parametri GC-MS-a su bili jednaki za sve ispitivane metode, kako bi se adekvatno mogle usporediti efikasnosti metoda za ekstrakciju PAH-ova. Agilent 7890B/5977A MSD se koristio kao uređaj za detekciju. GC parametri koji su se koristili su: kolona HP-5M, 30 m x 0,25 μm . Injektor je radio u modu bez razdvajanja uzorka (*splitless mode*) pri 280°C, a injektiralo se 5 μL uzorka. Temperaturni program za razdvajanje koji se koristio je bio: 0,4 min zadržavanja na 50°C; podizanje od 50°C do 195°C brzinom od 25°C/min, te zadržavanje od 1,5 min na 195°C. Podizanje temperature od 195°C do 265°C brzinom od 8°C/min, i zatim podizanje na 315°C brzinom od 20°C/min, te zadržavanje tijekom 1,25 min. Temperatura masenog detektora bila je 280°C. Verifikacija pikova bila je preko retencijskog vremena i molekulske mase pojedinog PAH-a.

3.3.2. Metode ekstrakcije PAH-ova

U ovom diplomskom radu uspoređene su tri različite metode za ekstrakciju PAH-ova iz dostupne literature, kako bi se odabrala metoda koja najviše odgovara uzorcima slavonske kobasice na kojima je istraživanje provedeno.

Metoda za ekstrakciju PAH-ova u dimljenoj šunki:

Odvaže se točno 3,00 g prethodno usitnjenog i homogeniziranog uzorka u epruvetu za centrifugu od 50 mL. Svakom odvaganim uzorku doda se 12 mL deionizirane vode i 15 mL ACN, te se ekstrahira vorteksom 1 minutu. Zatim se u epruvete doda 6,00 g $MgSO_4$ i 1,50 g CH_3COONa te centrifugira na 1000 x g tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi. Gornji sloj (1 mL) od pipetira se u dSPE kivetu koja sadrži 150 mg $MgSO_4$, 50 mg PSA i 50 mg C18 i nakon toga vorteksira 1 minutu. dSPE kivetu centrifugiramo pri 1800 x g tijekom 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Pročišćeni ekstrakt iz kivete od pipetira u vialu i provede analiza na GC/MS (Kartalović i sur., 2015).

Metoda za ekstrakciju PAH-ova iz tla

Odvaže se točno 10,0 g prethodno usitnjenog i homogeniziranog uzorka u epruvetu za centrifugu od 50 mL. Svakom odvaganim uzorku doda se 30 mL ekstrakcijskog otapala (acetonitril/voda =2:1 (v/v)) te se ekstrahira jednominutnim mućkanjem. Slijedila je dodatna ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim se u epruvete doda 8 g $MgSO_4$ i 2 g NaCl te snažno promiješa rukom tijekom 1 minute. Slijedi centrifuga pri 1500 x g tijekom 10 minuta a sobnoj temperaturi. Nakon odvajanja slojeva 1,5 mL organskog sloja se prebaci u eppice od 2 mL sa 150 mg $MgSO_4$ i 50 mg PSA. Nakon 5 minuta trešnje rukom, ekstrakti se centrifugiraju pri 5000 x g tijekom 10 min pri sobnoj temperaturi. Točno 1 mL pročišćenog ekstrakta se odpipetira u vialu i provede analiza na GC/MS (Cvetković i sur., 2016).

Metoda za ekstrakciju PAH-ova u mariniranoj i prženoj peradi

Odvaže se točno 5,00 g prethodno usitnjenog i homogeniziranog uzorka u epruvetu za centrifugu od 50 mL. Doda se 10 mL deionizirane vode i promućka rukom 1 minutu. Nakon toga se doda 10 mL acetonitrila i mućka dodatnu minutu. Zatim se doda 6 g $MgSO_4$ i 1,5 g CH_3COONa , te promućka još jednu minutu. Slijedi centrifugiranje pri 1800 x g tijekom 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja se 6 mL supernatanta prebaci u epruvete od 15 mL sa 400 mg PSA, 1,2 g $MgSO_4$ i 400 mg C18 za pročišćavanje. Slijedi dodatna centrifuga pri 1800 x g tijekom 5 minuta, na sobnoj temperaturi, nakon čega se supernatant odpipetira u vialu i provede analiza na GC/MS (Kao i sur., 2012).

3.3.3. Validacija metode

Prilikom validacije određivani su sljedeći parametri: iskorištenje, preciznost, selektivnost, primjenljivost, ponovljivost, obnovljivost, linearnost, limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ), sukladno uputama u Odluci Komisije o primjeni direktive Vijeća o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata EZ 2002/657(EZ, 2002). Kalibracija je rađena u sljedećih 10 koncentracija: 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 ng/mL pomoću standarda prethodno pomiješanih svih 16 PAH-ova.

3.3.3.1. Iskorištenje

Provjera iskorištenja rađena je na jednakoj matrici analita u kojem se metoda validira. Zbog nepostojanja matrice bez analita, odnosno potvrđenog referentnog materijala, prvo se napravilo mjerenje u uzorku bez dodanog standarda analita, a zatim se ponovilo mjerenje nakon dodatka standarda. Iskorištenje je definirano kao: „postotak stvarne koncentracije tvari izdvojene tijekom analitičkog postupka. Ako potvrđeni referenti materijal ne postoji, određuje se tijekom validacije“ (EZ, 2002). Sva mjerenja su napravljena u šest ponavljanja pri tri različite koncentracije kako bi se dobila i relativna standardna devijacija. Iskorištenje je mjereno pri koncentraciji koja je bila barem 1x, 2x i 5x viša od LOQ kako ne bi na samo iskorištenje utjecala detekcija analita te da bi bili bliže očekivanim koncentracijama analita (Šarkanj i sur., 2018).

3.3.3.2 Preciznost

Preciznost je stupanj podudarnosti između rezultata nezavisnih ispitivanja dobivenih pod propisanim (unaprijed određenim) uvjetima. Izražava se kao standardna devijacija rezultata, a izračunavala se u ispitivanjima ponovljivosti i obnovljivosti.

3.3.3.3. Specifičnost

Specifičnost je sposobnost razlučivanja između analita i njima srodnih tvari. Provjerila se tijekom određivanja iskorištenja. Matriks se obogatio analitom te su se usporedili rezultati prije i nakon obogaćivanja. Za neke komponente nije bilo dostupne matrice bez analita (naftalen), zbog čega se u tom slučaju usporedila ekstrakcijska otopina sa analitom.

3.3.3.4. Ponovljivost

Ponovljivost se ispitala obogaćivanjem matrice analitom pri koncentracijama od 1x, 2x i 5x viša od LOQ, u 6 replika, i sve je ponovljeno tri puta sukladno uputama Odluci Komisije o primjeni direktive Vijeća o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata EZ 2002/657 (EZ, 2002).

3.3.3.5. Obnovljivost

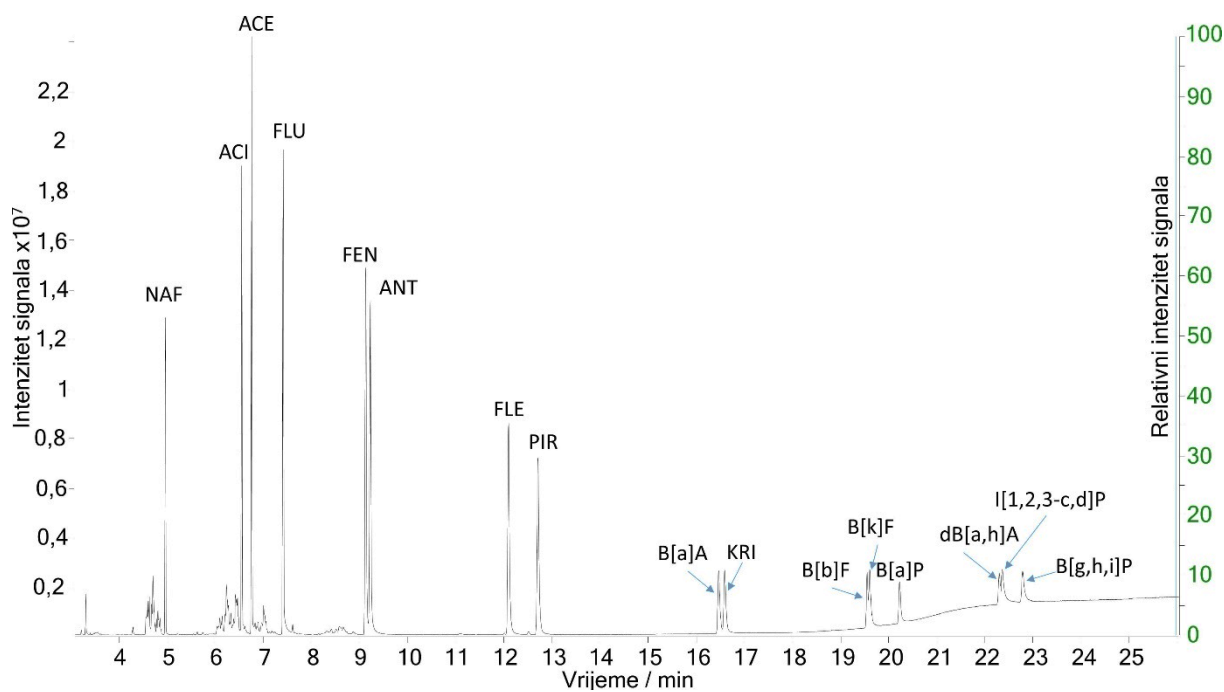
Obnovljivost se ispitala obogaćivanjem matrice analitom pri koncentracijama od 1x, 2x i 5x viša od LOQ, u 6 replika, i sve je ponovljeno tri puta u tri različita dana i tri različita analitičara sukladno uputama Odluci Komisije o primjeni direktive Vijeća o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata EZ 2002/657 (EZ, 2002).

3.3.3.6. Limit detekcije i kvantifikacije

Limiti detekcije i kvantifikacije su određeni kao 3 puta i 10 puta standardna devijacija šuma matrice ili ekstrakcijskog otapala tamo gdje nije bilo matrice bez analita (naftalen) sukladno uputama Odluci Komisije o primjeni direktive Vijeća o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata EZ 2002/657 (EZ, 2002) i Uredbi komisije o izmjeni Uredbe EZ br. 333/2007 u pogledu analite anorganskog arsena, olova i policikličkih aromatskih ugljikovodika i određenih izvedbenih kriterija za analizu (EZ, 2016). Izračunate vrijednosti su još naknadno korigirane tijekom mjerenja ukoliko je šum bio viši kod mjerenog analita (Šarkanj i sur., 2018).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Prije ispitivanje optimalne metode ekstrakcije i konačne validacije metode, sama metoda se postavila na GC-MS-u kako bi se provjerili adekvatni GC parametri za eluiranje, temperaturni program, retencijska vremena i način ubrizgavanja s obzirom na očekivane koncentracije u matriksu. Dobivena je prilagođena optimalna metoda koja je opisana u materijalima i metodama, a kromatogram sa naznačenim PAH-ovima prikazan je slikom 4.



Slika 4. GC-MS kromatogram metode za mjerenja PAH-ova

Nakon provedene usporedbe iskorištenja, prikazanih u **Tablici 2** odabrana je metoda po Kartalović i sur. (2015) zbog najboljeg iskorištenja na ispitivanoj matrici, te je nastavljena puna validacija metode. Kod svih metoda uočen je trend smanjenja iskorištenja kod kompleksnijih PAH-ova u odnosu na one s manjom molekulskom masom. Također kod onih PAH-ova koji se nisu dobro razdvajali na kromatogramu (zbog sličnih svojstava poput molekulske mase i vrelišta) postoji viša devijacija rezultata u odnosu na PAH-ove koji su dobro razdvojeni na kromatogramu.

Tablica 2 Usporedba iskorištenja triju ispitivanih metoda za ekstrakciju PAH-ova iz uzoraka slavonske kobasice

| Iskorištenje za PAH-ove | Kartalović i sur. (2015) | Cvetković i sur. (2016) | Kao i sur (2012) |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|
| Naftalen | 98% ±1% | 57% ± 2% | 45% ± 3% |
| Acenaftilen | 96% ±3% | 56% ± 4% | 48% ± 5% |
| Acenaften | 97% ±3% | 51% ± 6% | 51% ± 8% |
| Fluoren | 95% ± 2% | 53% ± 3% | 41% ± 7% |
| Fenantren | 93% ±7% | 47% ± 5% | 46% ± 13% |
| Antracen | 88% ± 9% | 45% ± 6% | 41% ± 11% |
| Fluoranten | 89% ±4% | 56% ± 10% | 49% ± 6% |
| Piren | 93% ± 2% | 52% ± 6% | 38% ± 4% |
| Benzo[a]antracen | 87% ±5% | 44% ± 4% | 36% ± 7% |
| Krizen | 84% ±7% | 58% ± 11% | 33% ± 9% |
| Benzo[b]Fluoranten | 86% ±13% | 39% ± 9% | 31% ± 12% |
| Benzo[k]fluoranten | 82% ±16% | 42% ± 8% | 31% ± 11% |
| Benzo[a]piren | 89% ±4% | 59% ± 6% | 38% ± 6% |
| Dibenzo[a,h]antracen | 79% ±14% | 55% ± 16% | 36% ± 13% |
| Indeno[1,2,3-c,d]piren | 78% ±12% | 46% ± 12% | 32% ± 17% |
| Benzo[g,h,i]perilen | 88% ±8% | 44% ± 9% | 37% ± 7% |

Nakon što se odabrala metoda s najboljim iskorištenjima (Kartalović i sur., 2015), nastavljena je validacija da se provjeri da li je metoda odgovarajuća namjeni. Parametri validacije su sažeti u **Tablici 3**. Performanse koje su dobivene gotovom validiranom metodom sukladne su pravilnicima i uredbama europske zajednice: Odluci Komisije o primjeni direktive Vijeća o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata EZ 2002/657 (EZ, 2002); Uredbi komisije o izmjeni Uredbe EZ br. 333/2007 u pogledu analite anorganskog arsena, olova i policikličkih aromatskih ugljikovodika i određenih izvedbenih kriterija za analizu (EZ, 2016) gdje su definirani termini LOQ-a kao deseterostruka standardna devijacija od srednje vrijednosti

dobivene slijepom probama matrice; te Uredbi komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani koja propisuje maksimalnu količinu benzo[a]pirena u dimljenom mesu i dimljenim mesnim proizvodima od 5 µg/kg mokre težine (EZ, 2006), zbog čega se pazilo da je limit detekcije metode ispod navedenog limita. Preciznost metode u ponovljivim i obnovljivim uvjetima je zadovoljavajuća jer je prema pravilniku (EZ, 2002) propisana do 20 % za analite u koncentracijama ≥ 10 µg/kg do 100µg/kg. Budući da su mjerene koncentracije, ovisno o analitu, bile i niže (od 3.3 – 16.5 µg/kg), uvjet se smatra zadovoljenim. Validirana metoda se pokazala kao specifična jer nije pokazivala pikove analita kada oni nisu bili u matrici ili ekstrakcijskom otapalu.

Metoda je sukladna Odluci Komisije o primjeni direktive Vijeća o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata EZ 2002/657 (EZ, 2002) prikladna za potvrdnu metodu za organske rezidue i kontaminante budući da zadovoljava sve propisane uvijete.

Tablica 3 Performanse validirane metode

| Analit | m/z | Retencijsko vrijeme/ min | Linearnost | Ponovljivost % | Obnovljivost % | LOD ng/mL | LOQ ng/mL |
|------------------------|-------|-----------------------------|------------|-------------------|-------------------|--------------|--------------|
| Naftalen | 128,1 | 4,9 | 0,989 | 2 | 5 | 1 | 3,3 |
| Acenaftilen | 152,1 | 6,6 | 0,985 | 5 | 5 | 1 | 3,3 |
| Acenaften | 154,4 | 6,9 | 0,962 | 3 | 5 | 1 | 3,3 |
| Fluoren | 166,2 | 7,5 | 0,997 | 7 | 8 | 1 | 3,3 |
| Fenantren | 178,2 | 9,2 | 0,994 | 5 | 6 | 1 | 3,3 |
| Antracen | 178,2 | 9,4 | 0,994 | 6 | 9 | 3 | 10 |
| Fluoranten | 202,3 | 12,2 | 0,999 | 6 | 11 | 3 | 10 |
| Piren | 202,3 | 12,8 | 0,999 | 7 | 10 | 1 | 3,3 |
| Benzo[a]antracen | 228,3 | 16,4 | 0,996 | 8 | 9 | 1 | 3,3 |
| Krizen | 228,3 | 16,6 | 0,998 | 3 | 7 | 1 | 3,3 |
| Benzo[b]fluoranten | 252,3 | 19,5 | 0,996 | 16 | 18 | 3 | 10 |
| Benzo[k]fluoranten | 252,3 | 19,6 | 0,985 | 17 | 19 | 3 | 10 |
| Benzo[a]piren | 252,3 | 20,3 | 0,992 | 5 | 9 | 1 | 3,3 |
| Dibenzo[a,h]antracen | 276,3 | 22,4 | 0,990 | 11 | 15 | 5 | 16,5 |
| Indeno[1,2,3-c,d]piren | 278,4 | 22,5 | 0,989 | 12 | 16 | 5 | 16,5 |
| Benzo[g,h,i]perilen | 276,3 | 22,8 | 0,990 | 11 | 13 | 5 | 16,5 |

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu je provedena validacija GC-MS metode za određivanje 16 PAH-ova u dimljenim kobasicama. Budući da je prisutnost PAH-ova u hrani učestala, i da su oni izuzetno opasni za ljudsko zdravlje, bitno ih je redovito kontrolirati u hrani pogotovo u područjima gdje se takva hrana konzumira.

S obzirom na validacijske parametre, najboljom se pokazala metoda po Kartalović i sur. (2015). Na osnovu rezultata istraživanja dobivenih u ovom radu, može se izvesti zaključak da uzimajući u obzir linearnost, ponovljivost, obnovljivost, LOD i LOQ zadovoljavaju zakonske odredbe, te je metoda GC-MS sa QuEChERS pročišćavanjem pogodna za određivanje 16 PAH-ova u sušenim kobasicama.

6. LITERATURA

- Bansal V, Kim KH: Review of PAH contamination in food products and their health hazards. National center for biotechnology information. *Environment International* 84:26–38, 2015.
- Cvetković JS, Mitić VD, Stankov Jovanović VP, Dimitrijević MV, Petrović GM, Nikolić-Mandić SD, Stojanović GS: Optimization of the QuEChERS extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Methods* 8:1711-1720, 2016.
- Dyremark A, Westerholm R, Overik E, Gustavson JA: Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from charcoal grilling. *Atmospheric Environment*, 29:1553-1558, 1995.
- Edwards SC, Jerdychowski MB, Caman D, Kieltyka A, Mortz E, Flak E, Li Z, Wang Z, Ranh V, Perera F: Prenatal Exposure to Airborne PAH's and Children's Intelligence at 5 Years of Age in a Prospective Cohort Study in Poland. *Environmental Health Perspectives* 118:1326-1331, 2010.
- EFSA, European Food Safety Authority: Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on PAH's in Food, *EFSA journal*, 2008.
- EZ, Europska zajednica: Odluka komisije od 12. kolovoza 2002 o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata. *Europska zajednica* 2002/657/EZ, 2002.
- EZ, Europska zajednica: Uredba komisije (EU) 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani. *Europska zajednica* 2006/1881/EZ, 2006.
- EZ, Europska zajednica: Uredba komisije (EU) 2016/582 od 15. travnja 2016. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 333/2007 u pogledu analize anorganskog arsena, olova i policikličkih aromatskih ugljikovodika i određenih izvedbenih kriterija za analizu. *Europska zajednica* 2016/582/EZ, 2016.
- FAO/WHO (2006) Combined Compendium of Food Additive Specifications, Food and Agriculture Organization of the United Nations i World Health Organization, Rome, <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0691e/a0691e.pdf>>. Pristupljeno 27. kolovoza 2016.
- Farhadian A, Jinap S: Effects of marinating on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene and fluoranthene) in grilled beef meat. *Food Control* 124:141-146, 2012.
- Harvey, RG: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Chemistry and carcinogenicity. Cambridge Monographs on Cancer Research, University Press, Cambridge, 1991.
- Hopia A, Pyysalo H, Wickstrom K: Margarines, butter and vegetableoils as sources of PAH's. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 63:889–893, 1986.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Validation of

- analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1), International Conference on Harmonisation, Geneva, 1996.
- Kao TH, Chen S, Chen CJ, Huang CW, Chen, BH: Evaluation of analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons by the QuEChERS method and gas chromatography-mass spectrometry and their formation in poultry meat as affected by marinating and frying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(6):1380-1389, 2012.
- Kartalović B, Okanović D, Babić J, Djordjević V, Janković S, Cirković M: Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked ham. *Procedia Food Science* 5:144-147, 2015.
- Kitson GF, Larsen SB, McEwen NC: *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*, Academic Press, 1996.
- Lazarić K, Gašljević V: *Validacija analitičkih metoda*. Hrvatsko mjeriteljsko društvo, Zagreb, 2012.
- Luch A: *The Carcinogenic Effects Of PAH's*. Imperial College Press, 2005.
- NRC, National Research Council: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Evaluation of Sources and Effects*, Washington DC, 1983a.
- NRC, National Research Council: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Evaluation of Sources and Effects*. NRC National Research Council (US) Committee on Pyrene and Selected Analogues, Washington (DC): National Academies Press (US), 1983b.
- Perera FP, Wang S, Vishnevetsky J, Zhang B, Cole KJ, Tang D, Ranh V, Phillips D: PAH-aromatic DNA Adducts in Cord Blood and Behavior Scores in New York City Children. *NCBI, Environmental Health Perspectives* 119, 1176-1181, 2011.
- Phillips, D. H. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research* 443, 139-147, 1999.
- SCF, Scientific Committee on Food: *PAH-Occurrence in food, dietary exposure and health effects*, European Commission, 2002.
- Sutlović D, Kovačić Z, Riha B, Žuntar I, Tomašek Lj, Bakulić L, Nestić M, Horvat V, Mandić S, Plavšić F, Ferček R, Definis-Gojanović M, Suton J, Knezović Z, Veršić M, Vulić M, Vučinović M, Strinić T, Stipišić A, Mrčela M: *Osnove Forenzičke toksikologije*, Redak, Split, 2011.
- Swartz EM, Krull SI, Dekker M: *Analytical method development and validation*. CRC press, New York, 1997.
- Šarkanj B, Ezekiel CN, Turner CP, Abia WA, Rychlik M, Krska R, Sulyok M, Warth B: Ultra-sensitive, stable isotope assisted quantification of multiple urinary mycotoxin exposure biomarkers. *Analytica chimica acta* 1019(17): 84-92, 2018.
- Uredba komisije (EU) br. 835/2011. od 19. kolovoza. 2011. o izmjeni uredbe (EZ) br. 1881/2006 u pogledu najvećih dopuštenih količina za policikličke aromatske ugljikovodike u hrani

Wang H, Mau Y, Wu F, Zhao Y, Wong C, Wong M: Oral Bioaccessibility of PAH's through Fish Consumption, Based on an in Vitro Digestion Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:11517-11524, 2010.

Zaelzer WW, Apt L: Acute hemolytic anemia due to naphthalene poisoning. National center for biotechnology information. *Journal of the American Medical Association* 141:185-190, 1949.