

**©РОЗРОБКА МЕТОДИКИ КОНТРОЛЮ ІЗОМЕРІВ ПОЛІЦИКЛІЧНИХ АРОМАТИЧНИХ ВУГЛЕВОДНІВ В РОСЛИННИХ ОЛІЯХ**

**Л. О. НЕСТЕРОВА**, доктор технічних наук, доцент, завідувач кафедри органічної, фізичної і колоїдної хімії та хімії пестицидів

**Н. Ю. ГРИБОВА**, кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник кафедри органічної, фізичної і колоїдної хімії та хімії пестицидів

**О. І. ХИЖАН**, кандидат хімічних наук, доцент кафедри органічної, фізичної і колоїдної хімії та хімії пестицидів

**В. О. УШКАЛОВ**, доктор ветеринарних наук, професор, директор УЛЯБП АПК

**Національний університет біоресурсів і природокористування України**

*E-mail:* olenakhyzhan@gmail.com

**Анотація.** Досліджено процес хроматографічного розділення суміші поліциклічних ароматичних вуглеводнів, що містять ізомери з різною канцерогенною активністю. Встановлено оптимальні умови вимірювання вмісту чотирьох регламентованих в оліях та жирівмісній продукції сполук: бензо(а)антрацену, хризену, бензо(а)пірену, бензо(б)флуорантену. Запропонована методика пройшла процедуру валідації, призначена для вимірювання вмісту нормованих в Україні та країнах ЄС поліциклічних ароматичних вуглеводнів. Методика може бути застосована в лабораторному контролі ефективності рафінування, для виявлення відповідності продукції санітарно-гігієнічним нормам, проведення комплексних моніторингових досліджень, спрямованих на пошук оптимальних рішень для зниження ризиків контамінації поліциклічними ароматичними вуглеводнями під час виробництва, транспортування та зберігання олійної сировини та олії.

**Ключові слова:** поліциклічні ароматичні вуглеводні, бензо(а)пірен, рослинна олія, лабораторний контроль, високоефективна рідинна хроматографія, рафінація

**Актуальність.** В умовах інтенсивного розвитку нафтовидобувної, нафтопереробної та нафтохімічної промисловості, здебільшого внаслідок процесів неповного згоряння органічних сполук, в навколишнє середовище виділяється величезна кількість полютантів, серед яких особливе місце належить канцерогенам групи поліциклічних ароматичних вуглеводнів (ПАВ). Застосування високотемпературних процесів сушіння насіння олійних культур сприяє збільшенню виходу олії під час переробки сировини, але, разом з тим, призводить до контамінації об'єкту поліциклічними ароматичними вуглеводнями. Для моніторингу безпечності рослинної сировини до 2015 року використовували маркер

забрудненості, найбільш токсичний представник групи поліциклічних ароматичних вуглеводнів, канцероген – бензо(а)пірен (БаП) [1, с.13-16; 2]. В травні 2016 року набрав чинності Наказ МОЗ України № 368, згідно якого в продуктах харчування нормуються три сполуки групи ПАВ: бензо(а)пірен, бензо(б)флуорантен (ББФ), бензо(а)антрацен (БаА). В країнах ЄС згідно Регламенту Комісії (ЄС) № 835/2011 нормується чотири ПАВ: бензо(а)пірен, бензо(б)флуорантен, бензо(а)антрацен та хризен. Ізомер бензо(а)пірену – бензо(е)пірен (БеП) не володіє канцерогенною активністю [1] і не потребує нормування.

Норми вмісту бензо(а)пірену в харчовій соняшниковій олії в Україні, країнах ЄС та США однакові і складають для олії марки «П» 2,0 мкг/кг, для марки «Д» – 1,0 мкг/кг. Вміст інших ПАВ разом з БаП дозволено на рівні 10 мкг/кг, при цьому 10 мкг/кг для внутрішнього ринку норма на суму 3 ПАВ, а в країнах ЄС на суму 4 ПАВ.

Тож, з 2016 року жиромісні харчові продукти потребують дослідження принаймні за трьома ПАВ, але харчові продукти, що не відповідають встановленим вимогам Державних гігієнічних правил і норм, затверджених пунктом 1 Наказу № 368, і виготовлені та/або введені в обіг не пізніше, ніж через 12 місяців з дня набрання чинності Наказу, залишаються в обігу на ринку України до закінчення строку їх придатності. Таким чином, продукція, що виготовлялася олієекстракційними заводами в 2017 році повинна проходити контроль на вміст трьох ПАВ – для реалізації на внутрішньому ринку та чотирьох ПАВ – для експорту в країни ЄС.

Згідно затвердженого Наказом МінАПК № 397 від 19.10.2015 Переліку референс-методик відбору зразків та їх досліджень (випробувань), що повинні застосовуватись в арбітражних дослідженнях об'єктів санітарних заходів, вміст ПАВ контролюється згідно ДСТУ 4689:2006 «Продукти харчові. Методи визначання масової частки бензопірену». Проте цей стандартизований метод було розроблено і призначено лише для аналізу БаП. Щодо вимірювання та аналізу вмісту інших ПАВ, то в цьому документі даних не наведено.

Організація лабораторного контролю, встановлення вмісту і відповідності, встановленими нормам, залишкових кількостей не лише маркера - бензо(а)пірена, а і інших контамінантів: хризена, бензо(а)антрацена, бензо(б)флуоранта є одним з пріоритетних питань для виробників рослинних олій в 2018 році.

**Мета досліджень** – розробка та апробація методу лабораторного контролю, що дозволить аналізувати складні суміші ПАВ із вмістом ізомерів, що різняться за канцерогенними властивостями: бензо(а)пірену, бензо(б)флуоранту, бензо(а)антрацену, хризену.

**Матеріали і методи досліджень.** Для розробки методики використовували проби зразків: соняшникова олія-сирець та рафінована соняшникова олія. Розчини аналітичних стандартів ПАВ в ацетонітрилі та ізопропанолі – для виявлення оптимальних умов хроматографічного контролю та збагачення матриці рослинної олії для опрацювання умов підготовки проб до хроматографічного контролю. Сорбенти (активоване

вугілля, твердофазні екстракційні картриджі та колонки-картриджі для твердо-фазної екстракції). Розчинники кваліфікації «для хроматографії» та «ч.д.а.»: ацетон, метанол, ізопропанол, ацетонітрил, деіонізована вода, ортофосфорна кислота. Робота зі зразками проводилася у відповідності зі стандартизованими, апробованими та розробленими раніше в Українській лабораторії якості та безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України (УЛЯБП АПК НУБіПУ) методами [3-5]. Вимірювання проведено методами рідинної та газової хроматографії з мас-селективними детекторами (ВЕРХ/МС/МС, ГХ/МС) в оптимальних умовах методик, що пройшли процедуру валідації та затверджені науково-методичною комісією УЛЯБП АПК.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Основними вимогами, що висувуються до лабораторного контролю, є висока чутливість та селективність методів визначення поліциклічних ароматичних вуглеводнів. Висока селективність визначення мікрокілкіностей бензо(а)пірена досягається у разі застосування ВЭЖХ із флуоресцентним детектором (ФЛД) або ВЭЖХ із мас-селективним детектором (МС/МС-фотоіонізація). Обираючи інструмент хроматографічного розділення сумішей та детектор, необхідно враховувати особливості зразків та аналітів. Так, наприклад, бензопірен в зразках та модельних сумішах представлений структурними ізомерами: бензо(а)піреном та бензо(е)піреном. В дослідженнях методом мас-спектрометрії (ГХ/МС) розділити структурні ізомери не вдається через створення осколків молекули з однаковим співвідношенням  $m/z$ . Для належного лабораторного контролю та встановлення вмісту ксенобіотиків інструмент дослідження і ідентифікації має забезпечувати повне розділення аналітичних сигналів ізомерних сполук.

Метод високоефективної рідинної хроматографії з флуоресцентним детектуванням лежить в основі розробленого в Україні ДСТУ 4689: 2006 «Продукти харчові. Методи визначання масової частки бензо(а)пірену». Досліджуючи інтенсивність аналітичних відгуків флуоресцентного детектору при вводі індивідуальних ПАВ, встановлено, що цей детектор є найбільш чутливий до найменших кількостей не лише БаП, а і інших ПАВ. Відгук детектора у лінійному діапазоні зафіксовано для концентрацій від 0,1 нг/мл до 25,0 нг/мл за введення БбФ та БаП, від 0,1 нг/мл до 10,0 нг/мл – за введення БеП, БаА та хризену.

Використовуючи розчини аналітичних стандартів індивідуальних хімічних сполук групи ПАВ було виявлено найбільш ефективні умови їх хроматографічного контролю методом ВЕРХ/ФЛД. В роботі встановлено умови і створено програмні файли керування роботою хроматографу, що дозволили повністю розділити суміші: БаА-хризен, БбФ-БаП, БаП-БеП (рис. 1) за рахунок оптимального температурного режиму та подачі елюентів в градієнтному режимі.

Як можна бачити з рис. 1, встановлені та застосовані в дослідженні оптимальні умови хроматографування дозволяють розділяти БаА та хризен (позначений пік №1 та пік № 2), БеП та БаП (пік №4 та пік №5), БбФ – пік № 3. Аналітичні сигнали кожної хімічної речовини, ідентифікованої за часом утримання індивідуальних ПАВ, підлягали

перевірці шляхом внесення до аліквот робочого розчину відомої кількості аналітичних стандартів індивідуальних сполук групи ПАВ. Методом вибіркового збагачення робочого розчину було здійснено перевірку часу утримання ПАВ в сумішах.

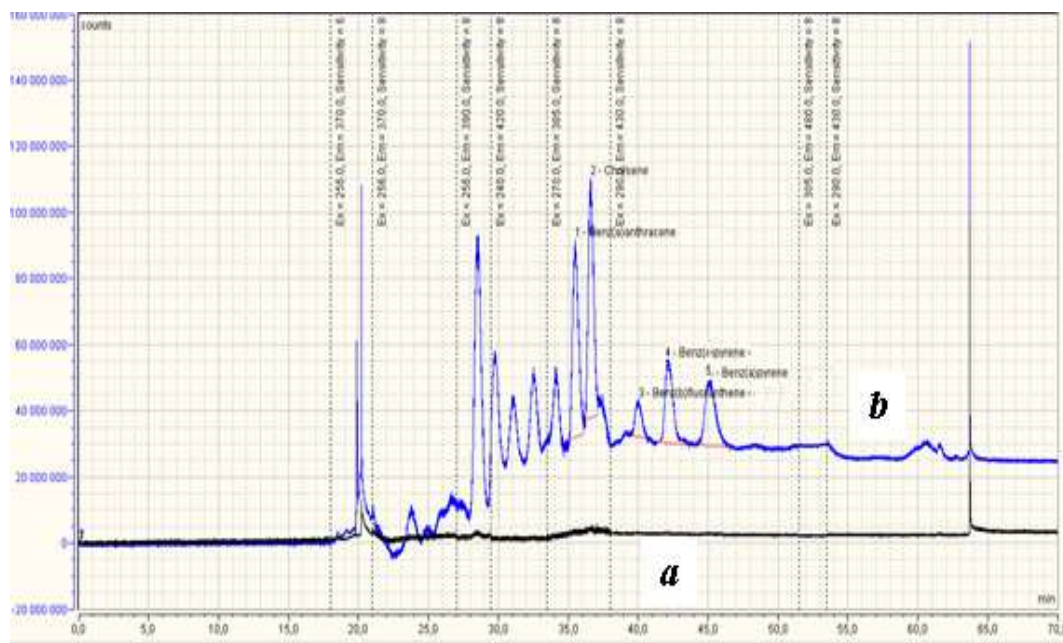


Рис. 1. Хроматограма розчинника (а) та модельної суміші ПАВ (б)

Для дослідження процесу екстракції з проб олії ПАВ в роботі використовували очищену за допомогою активованого вугілля матрицю рослинної олії та матрицю олії, збагачену індивідуальними хімічними речовинами групи ПАВ та їх сумішами. Процес ефективності підготовки проб контролювали по вмісту залишкових кількостей ПАВ стандартизованим методом. Стандартизований метод визначення бензо(а)пірена ДСТУ 4689: 2006 містить тривалу та багатостадійну пробопідготовку (екстракція, очищення екстракту, концентрація екстракту, розчинення сухого залишку), яка за рахунок втрати цільових компонентів призводить до помилок за кількісного визначення, крім того, методика має високу собівартість та використовує значну кількість органічних розчинників, які потрібно утилізувати. Розроблений метод, на протилегу стандартизованому, не містить тривалої стадії лужного гідролізу, вилучення ПАВ відбувається за рахунок вибіркової сорбції аналітів на стадії твердофазної екстракції. Твердофазна екстракція сьогодні широко застосовується завдяки розробці та випуску селективних сорбентів, що дозволяють провести селективне вилучення, концентрування та очищення аналітів перед їх ВЕРХ аналізом [6-7].

Для зменшення кількісних втрат поліциклічних ароматичних вуглеводнів зразки піддаються екстракції органічними розчинниками під дією ультразвуку. В залежності від хімічного складу екстракція в полі ультразвуку проходить за один або три цикли, при цьому один цикл триває від 5 хв до 30 хв. Далі, отриманий в ході пробопідготовки, екстракт в ізопропанолі або

олієвмісний ізопропанольний розчин вноситься в хроматограф, оснащений колоною, заповненою сорбентом для здійснення завершальної стадії пробопідготовки – твердофазної екстракції ПАВ. Розроблена серія методик пробопідготовки дозволяє уніфікувати роботу рідинного хроматографа Dionex-UltiMate 3000.2 Dual (УФ) за виконання якісного та кількісного аналізу поліциклічних ароматичних вуглеводнів в оліях, відібраних на різних етапах технологічного процесу. Для хроматографічного виявлення аналітів створені структуровані програмні файли, що враховують особливості аналізованого об'єкта та різні рівні забруднення.

Вимірювання масової частки регламентованих поліциклічних ароматичних вуглеводнів виконується за допомогою калібрування за стандартними зразками (табл. 1, рис. 2).

### 1. Параметри рівняння регресії залежності аналітичного сигналу від концентрації бензо(а)пірена соняшниковій олії

Параметр	Значення
Ост. дисперсія $S_y$ :	4326,5
СКО методу ( $S_{x0} = S_y/b$ ):	1,74273E-8
Коеф. варіації $V_{x0} = S_{x0}/X_{ср},(\%)$ :	1,4579
Межа виявлення:	4,9294 E-8 ( $X_c = 2,1147E-8$ ) Отн.Ед.
Критерій збіжності (d) для N = 2,3,4 (%) :	0,999922

Зафіксовані детектором сигнали (піки) обробляються в режимі он-лайн за допомогою стандартних та вдосконалених методів-файлів, що забезпечує отримання результату аналізу у вигляді протоколу випробування, наприклад, для олії-сирця за 5 год (табл. 2).

### 2. Результати випробування референт-зразку соняшникової олії в рамках внутрішньолабораторного порівняння

Найменування показників, одиниці вимірювань	Результати випробувань березень 2016	Результати випробувань грудень 2017
Бензо(а)антрацен, мкг/кг	1.9 ± 0.2	2.1 ± 0.2
Хризен, мкг/кг	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1
Бензо(б)флуорантен, мкг/кг	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1
Бензо(а)пірен, мкг/кг	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.2

Час виконання хроматографічного аналізу підготовленої проби соняшникової олії становить 70 хв (рис. 2). Підготовка проби виконується за 30-90 хв і залежить від ступеня очищення олії, найбільш швидко виконується аналіз рафінованої олії.

Для перевірки правильності роботи хроматографічної системи, за розробленими та валідованими умовами у разі аналізу різних ліпідних матриць, протягом року проводиться хроматографічний аналіз тестових розчинів. З отриманих хроматограм обчислюються параметри, за якими проводиться контроль показників хроматографічної системи. Так,

наприклад (рис. 2), пза піком бензо(а)пірену контролюють: повноту вилучення цього аналіту з олії, порушення в упаковці хроматографічної колонки і її ефективність.

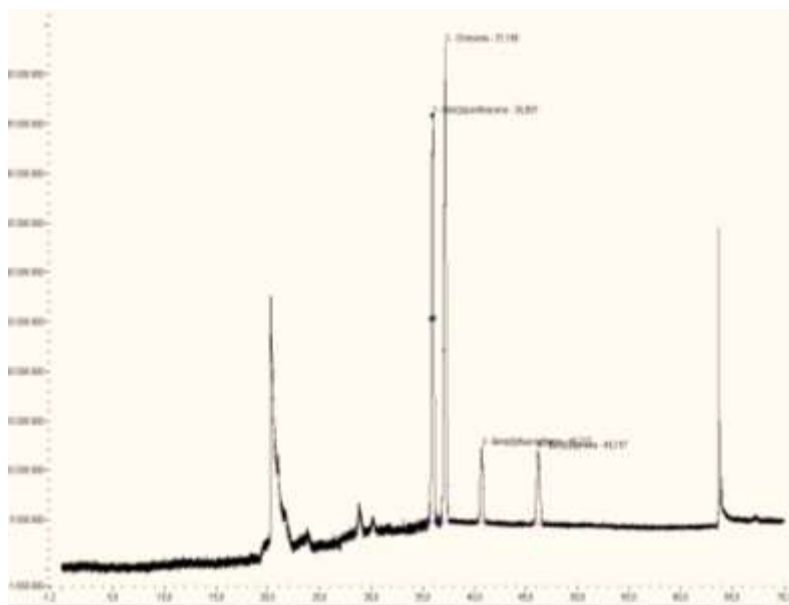


Рис. 2. Хроматограма соняшникової олії, збагаченої поліциклічними ароматичними вуглеводнями, отримана в оптимальних умовах методу ВЕЖХ/ФЛД, довжина хвилі збудження 290 нм, довжина хвиль випромінювання 430 нм; рухома фаза подається в градієнтному режимі: деіонізована вода-ацетонітрил

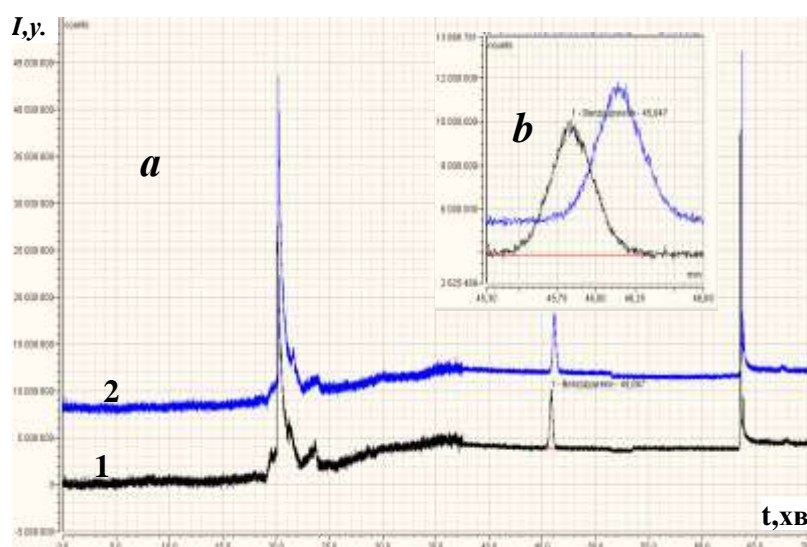


Рис. 3. а) Хроматограма матриці соняшникової олії, збагаченої бензо(а)піреном в кількості 2,0 мкг/кг. Вимірювання виконані: травень 2016 (хроматограма 1); травень 2017 (хроматограма 2); б) пік бензо(а)пірену (збільшення 1:15).

Аналіз одержаних результатів, представлених на рис. 3 показав, що за один рік експлуатації хроматографічних колонок збільшився час утримання аналіту на колонці, що говорить про зміну властивостей нерухомої фази. Встановлений зсув часу утримання знаходиться в межах допустимих норм. Інші вузли хроматографічної системи працюють без змін, втрати аналіту не відбувається.

Розроблена методика успішно застосовується під час виконання кваліфікаційних тестів, організованих українськими та міжнародними організаціями (табл. 3). Отримані результати підтверджують відповідність вимогам ДСТУ ISO/IEC 17025:2006 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій представлений в розділах».

### 3. Результати вимірювання вмісту БаП в олії (раунд РТ. UA. 3.1.2017-4)

Найменування показників, одиниці вимірювань	Результати випробувань, УЛЯБП АПК червень 2017	Оцінювання Провайдером характеристик функціонування учасників	
		z-індекс	висновок
Бензо(а)пірен, мкг/кг	5,7	-1.0	задовільно

Моніторингові дослідження, проведені в УЛЯБП АПК НУБіПУ в 2017 році свідчать, що вміст бензо(а)пірену в нерафінованих рослинних оліях (олія-сирець соняшникова, конопляна, соєва і ін.), вироблених в Україні, становить від 1 до 4 мкг/кг, разом з тим в зразках містяться і інші ПАВ сумарний вміст яких варіюється в межах від 3 до 17 мкг/кг. Під час досліджень виявлено, що олії відрізняються за масовою часткою індивідуальних ПАВ, зразки різних партій олії, що були виготовлені на одному оліїекстракційному заводі, містять різну кількість ПАВ, це свідчить про необхідність ретельного моніторингу міграції ПАВ в харчовому ланцюгу рослинної олії.

**Висновки та перспективи.** Встановлено оптимальні умови хроматографічного аналізу поліциклічних ароматичних вуглеводнів, що дозволяють проводити лабораторний контроль сумішей нормованих ПАВ: БаА, хризену, БаП, БбФ.

#### Список використаних джерел

1. Toxicological Review of Benzo[a]pyrene. Review of EPA's Draft Assessment. U.S. Environmental Protection Agency. – Washington, 2017. – 97 p.
2. Warshawsky, D.. Factors affecting carcinogenic potential of mixtures. / D. Warshawsky, W. Barkley, E. Bingham // Fundamental applied toxicology. – 1993. V. 20. – №3. – P. 376-382.
3. ДСТУ 4689:2006. Продукти харчові. Методи визначання масової частки бенз(а)пірену. - К.: Держспоживстандарт України, 2006.—. 231 с.
4. ISO 15753:2016. Animal and vegetable fats and oils - Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons.
5. Грибова, Н. Ю. Контроль ПАУ в почвах методом ВЭЖХ-ФЛД. / Н. Ю. Грибова, А. Г. Кушнир, П. О. Кучма //Иновационные пути модернизации

базовых отраслей промышленности, энерго- и ресурсосбережение, охрана окружающей среды: сб. докл. V Международной научно-практической конференции молодых ученых. Харьков, 23-24 марта 2016 г. – . Х.: ГП «УкрНТЦ «Энергосталь», 2016. – С. 188.

6. Shadung, J. Moja. Application of solid phase extraction (SPE) method in determining polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in river water samples. /Shadung J. Moja, Fanyana Mtunzi // Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology. – 2013. – Vol .5. – №11. – P. 278-283.

7. Gfrerer, M. Optimized extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil samples. / M. Gfrerer, M. Serschen //J. Biochem. Biophys. Methods. – 2003. – Vol. 53. – P. 203–216.

### References

1. Toxicological Review of Benzo[a]pyrene. Review of EPA's Draft Assessment. U.S. Environmental Protection Agency. Washington. 2017. 97 p.

2. Warshawsky, D., Barkley, W., Bingham, E.(1993). Factors affecting carcinogenic potential of mixtures. Fundamental applied toxicology, 20 (3), 376-382. doi.org/10.1006/faat.1993.1048.

3. DSTU 4689:2006. Produkty harchovi. Metody vyznachannja masovoji chastky benz(a)pirenu. - K.: Derzhspozhyvstandart Ukrainy, 2006.–. 231 s.

4. ISO 15753:2016. Animal and vegetable fats and oils -- Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons.

5. Hrybova, N. Y., Kushnir, A. G., Kuchma, P. O. (2016). Kontrol' PAU v pochvah metodom VEZHKKH-FLD. V Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferenciya molodyh uchenyh «Innovacionnye puti modernizacii bazovyh otraslej promyshlennosti, ehnergo – i resursosberezhenie, ohrana okruzhayushchej sredy». H.: GP «UkrNTC «EHnergostal'», 188.

6. Shadung, J. Moja, Fanyana, Mtunzi. (2013). Application of solid phase extraction (SPE) method in determining polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in river water samples. Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, 5 (11), 278-283. doi: 10.5897/JECE2013.0294.

7. Gfrerer, M., Serschen, M. (2003). Optimized extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil samples. J. Biochem. Biophys. Methods, 53, 203–216. doi:10.1016/S0165-022X(02)00109-4

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОНТРОЛЯ ИЗОМЕРОВ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЛАХ

**Л. А. Нестерова, Н. Ю. Грибова, Е. И. Хижан, В. А. Ушкалов**

**Аннотация.** Исследован процесс хроматографического разделения смеси полициклических ароматических углеводородов, содержащих изомеры с разной канцерогенной активностью. Установлены оптимальные условия измерения содержания четырех регламентированных в маслах и жиросодержащей продукции соединений: бензо(а)антрацена, хризена, бензо(а)пирена, бензо(б)флуорантена. Предложенная методика прошла процедуру валидации и предназначена для измерения содержания нормированных в Украине и странах ЕС



полициклических ароматических углеводородов. Методика может быть применена в лабораторном контроле эффективности рафинирования для выявления соответствия продукции санитарно-гигиеническим нормам, проведения комплексных мониторинговых исследований, направленных на поиск оптимальных решений для снижения рисков загрязнения полициклическими ароматическими углеводородами при производстве, транспортировке и хранении масличного сырья и масла.

**Ключевые слова:** полициклические ароматические углеводороды, бензо(а)пирен, растительное масло, лабораторный контроль, высокоэффективная жидкостная хроматография, рафинирование

## DEVELOPMENT OF CONTROLS METHOD FOR THE ISOMERS OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN VEGETABLE OILS

L. O. Nesterova, N. Y. Hrybova, O. I. Khyzhan, V. O. Ushkalov

**Abstract.** Investigated the process of chromatographic separation of a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons containing isomers with different carcinogenic activity. Established the optimum conditions for measuring the content of the four regulated oils and fatty products of compounds: benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(a)pyrene, benzo (b)fluoranthene.

The proposed methodology was validating, designed for measuring the contents of polycyclic aromatic hydrocarbons, standardized in Ukraine and the EU. The method can be used in laboratories for controlling of refining efficiency, to identify the conformity of products to sanitary and hygienic standards, and for comprehensive monitoring studies to carry out aimed to finding optimal solutions for reducing the risk of oilseeds and oils contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons at the processing of productions, transportations and storages.

**Keywords:** polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo(a)pyrene, vegetable oil, laboratory control, high performance liquid chromatography, refining