

Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Agricultural Products

K.K. Tsymbaliuk^{*†}, O.V. Snurnikova[†], K.V. Melnyk[†], E.M. Fadeev[†], V.P. Antonovich[‡]

[†] Inspectorate Ukraine LLC, 1 Udilnyi Str., Odesa, 65009, Ukraine; *e-mail: kiorgg@yahoo.com

[‡] SLC "Interchem", 86 Lustdorfka doroga Str., Odesa, 65080, Ukraine

Received: April 20, 2021; Accepted: June 25, 2021

DOI: 10.17721/moca.2021.127-136

The procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in agricultural products on the example of five crops (rapeseed, sunflower, flax, corn, soybeans) by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) was developed. It was showed the advantage of using binary mixtures of organic solvents "hexane-dichloromethane" for PAH extraction. The time of Soxhlet extraction is from 6 to 8 hours at optimized conditions. The fractionation and purification of extracts by column chromatography on deactivated alumina was optimized. The article presents the optimization of sample injection in the programmed temperature vaporization (PTV) mode, parameters of gas chromatographic separation and mass spectrometric detection in determining 16 priority PAH in agricultural products. The recoveries, correctness and accuracy of the proposed method were checked by "spikes" with concentrations 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The linearity of the method was determined by calibration curves obtained for three measurements of calibration solutions with concentrations of 0.5-100 ng mL^{-1} . The effectiveness of the proposed combination of sample preparation and analysis by PTV-GC-MS was studied for linearity, accuracy, matrix effects and reproducibility. The method was validated by linearity, accuracy, matrix effect and reproducibility.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, Soxhlet extraction, agricultural products, gas chromatography, mass spectrometry, GC-MS, PTV injection

Визначення поліциклічних ароматичних вуглеводнів у агропродукції

K.K. Цимбалюк^{*†}, О.В. Снурнікова[†], К.В. Мельник[†], Є.М. Фадєєв[†], В.П. Антонович[‡]

[†] ТОВ «Інспекторат Україна», 1, Удільний пров., Одеса, 65009, Україна; *e-mail: kiorgg@yahoo.com

[‡] ТДВ «ІНТЕРХІМ», 86, Люстдорфська дорога, Одеса, 65080, Україна

Надійшла: 20 квітня 2021 р; Прийнята: 25 червня 2021 р

DOI: 10.17721/moca.2021.127-136

Розроблена методика визначення поліциклічних ароматичних вуглеводнів (ПАВ) у агропродукції на прикладі п'ятих культур (ріпак, соняшник, льон, кукурудза, соя) методом газової хромато-мас-спектрометрії (GC-MS). Показано перевагу використання для екстракції ПАВ бінарних сумішей органічних розчинників «гексан-дихлорметан». Час екстракції в апараті Сокслета при оптимальних умовах складає від 6 до 8 годин. Оптимізовано стадії фракціонування та очищення екстрактів за допомогою твердофазної екстракції на деактивованому оксиді алюмінію. У роботі представлена оптимізація інжектування проби у режимі запрограмованого температурного випаровування (PTV), параметрів газо-хроматографічного розділення та мас-спектрометричного детектування при визначенні 16 основних ПАВ у агропродукції. Коефіцієнти вилучення, правильність і точність визначення аналітів запропонованим способом перевіряли методом «введено-знайдено» за допомогою чотирьох добавок (0.5, 1.0, 2.5, 5.0 мкг/кг). Лінійність методики для трьох вимірювань 0.5-100 нг/мл . Ефективність запропонованої пробопідготовки зразків та аналізу методом PTV-GC-MS була вивчена на предмет лінійності, точності, ефектів матриці та відтворюваності. Методику було валідовано за показниками: лінійність, точність, ефект матриці та відтворюваність.

Ключові слова: поліциклічні ароматичні вуглеводні, екстракція, агропродукція, газова хроматографія, мас-спектрометрія, ГХ-МС, PTV-інжекція

Поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ) відносяться до стійких органічних забрудників («Persistent organic pollutants, POPs»), які здатні накопичуватися в навколишньому середовищі та, завдяки високій розчинності у ліпідах, включатися до харчових ланцюжків. Зокрема,

сільськогосподарські культури з високим вмістом жиру (наприклад, насіння соняшнику, рапс, соя, кукурудза) здатні до біоаккумуляції ПАВ з ґрунтів [1–3]. Оскільки більшість ПАВ виявляють канцерогену, мутагенну, гепатотоксичну та тера-тогенну дію на організм, їх допустимий

вміст регулюється як у самих культурах, так і продуктах їх переробки (олії, жмихи, шроти) [1,4–6]. Максимально допустимі рівні ПАВ періодично переглядаються та зменшуються. Наприклад, в ЄС нормується вміст бензо[а]пірену і суми 4 канцерогенних ПАВ (бензо[а]пірен, бензо[а]антрацен, бензо[б]флуорантен, хризен). Максимально допустимі рівні встановлені для рослинних олій: бензо[а]пірен - 2 мкг/кг, сума 4 ПАВ - 10 мкг/кг; какао бобів: бензо[а]пірен - 5 мкг/кг, сума 4 ПАВ - 35 мкг/кг; зернові для виробництва продуктів харчування і дитячого харчування: бензо[а]пірен - 1 мкг/кг, сума 4 ПАВ - 1 мкг/кг) [7].

Визначення ПАВ у агропродукції як сировині для виробництва рослинних олій є затребуваним з боку виробників, переробників, експортерів сільськогосподарської продукції, так як останнім часом максимально допустимі концентрації ПАВ включають до контрактних вимог при закупівлі агрокультур. Оскільки, значна частка валового внутрішнього продукту в Україні припадає на вирощування, переробку та експорт агропродукції, як сировини для виробництва кормів та продуктів харчування, розробка методів контролю показників безпеки, зокрема вмісту ПАВ, є актуальним завданням [8].

Більшість публікацій і нормативних документів (ISO 15753:2016, EN ISO 22959:2009) присвячені визначенню ПАВ у рослинних оліях та жирах тваринного походження. В той же час, відсутня методологія щодо визначення поліциклічних ароматичних вуглеводнів у агропродукції як складній матриці для аналізу, що, окрім жиру, містить воду, білок, пігменти, клітковину, неорганічні солі, тощо. Отже, розробка методів визначення поліциклічних ароматичних вуглеводнів у агропродукції є актуальною.

Поліциклічні ароматичні вуглеводні визначають методами високоефективної рідинної хроматографії з флуоресцентним (HPLC-FLD) [9–11] або газо-хроматографічними методами з мас-спектрометричним детектуванням (GC-MS) [12–16]. Перевагами HPLC-FLD є порівняно низька вартість аналітичного обладнання та достатня чутливість (ГОСТ 31745:2012). При цьому метод найчастіше потребує багатостадійної підготовки проби до хроматографічного аналізу наприклад, ISO 15753:2016. Крім того, метод рідинної хроматографії в деяких випадках не забезпечує хроматографічного розділення ізомерів ПАВ, а флуоресцентний метод детектування не дозволяє провести ідентифікацію окремих ізомерів. В той же час, газова хроматографія GC-MS забезпечує розділення суміші поліциклічних ароматичних вуглеводнів, а селективність мас-спектрометричного детектору дозволяє спростити пробопідготовку [17].

Метою даного дослідження є розробка методики

визначення поліциклічних ароматичних вуглеводнів у агропродукції. В роботі для ідентифікації та кількісного визначення індивідуальних ПАВ використовували метод хромато-мас-спектрометрії після попереднього виділення і концентрування суми поліаренів з об'єктів аналізу.

Експериментальна частина

Апаратура та матеріали. Хромато-мас-спектрометричні вимірювання проводили за допомогою хроматографічної системи Agilent 7890A/5975C, що обладнана автоматичним дозатором, PTV-інжектором, капілярною колонкою TraceGOLD TG-5SiIMS 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм (Thermo Scientific™) з неполярною нерухомою фазою типу «5ms» з сополімеру силосану та силарилену. Для подрібнення зразків використовували ножовий млин з водяним охолодженням камери розмелу SM-3. Екстракцію ПАВ зі зразків агропродукції проводили в апараті Сокслета з внутрішнім діаметром 40 мм та круглодонною колбою об'ємом 500 мл. Концентрування екстракту проводили за допомогою ротаційного випарника та системи упарювання в тоці азоту.

В роботі використовувалися органічні розчинники кваліфікації «Pesticide grade» або «GC-MS», патрони з целюлози (Whatman™), сульфат натрію (ACS reagent, ≥ 99.0 %, anhydrous), інертна скловата (Supelco™), оксид алюмінію активований нейтральний (Sigma-Aldrich™).

Сульфат натрію попередньо прожарювали при температурі 400 °C протягом 4 годин. Оксид алюмінію витримували при 240 °C протягом 8 годин. Після охолодження в ексікаторі сорбент дезактивували додаванням 5 мас.% деіонізованої води, струшували та витримували в закритій ємності при кімнатній температурі протягом 8-10 годин для гомогенізації.

Приготування розчинів для побудови градувального графіку. Для приготування градувальних розчинів використовували стандартну суміш 16 поліаренів (PAN Calibration Mix, Supelco™, CRM47940) з концентрацією 10 мкг/мл кожного компоненту в ацетонітрилі. Розчини для побудови градувальної залежності готували шляхом розведення стандартної суміші ПАВ у гексані. Концентрації ПАВ у розчинах при побудові градувальної залежності становили 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 і 100 нг/мл. Інтервал концентрацій ПАВ у пробах, що аналізуються, становить від 0.1 до 100 мкг/кг.

Пробопідготовка зразків. Проби агропродукції гомогенізували та подрібнювали за допомогою млина до середнього розміру часток ≤ 1 мм. Відбирали наважку зразку для аналізу, яку потім розтирали у ступці з сульфатом натрію (табл.1) та кількісно переносили у патрон для екстракції. У патрон зверху проби поміщали шар скловати

та проводили екстракцію ПАВ в апараті Сокслета органічними розчинниками та їх сумішами загальним об'ємом 250 мл. Отриманий екстракт випарювали на ротаторному випарнику при температурі 40 °С до об'єму 15-20 мл. Концентрований екстракт переносили у серцеподібну колбу об'ємом 50 мл. Першу колбу промивали двома порціями по 4 мл гексану. Об'єднаний розчин випарювали до об'єму приблизно 5 мл при температурі 40 °С. Екстракт переносили кількісно у мірний циліндр об'ємом 10 мл. Колбу промивали трьома порціями гексану об'ємом 1 мл, які переносили у той же циліндр. Об'єм екстракту доводили об'ємом гексаном до 10 мл.

Упарений екстракт очищували від співекстракційних домішок (олії, фосфоліпідів, жирних кислот) методом твердофазної екстракції. У скляну колонку довжиною 50 мм та діаметром 11 мм зі скляною фіткою розміщували пробку зі скловати, 22.0±0.1 г деактивованого оксиду алюмінію та 2.0±0.1 г безводного сульфату натрію. Колонку промивали гексаном об'ємом 50 мл. Для очистки методом твердофазної екстракції відбирали об'єм екстракту в залежності від вмісту олії в агрокультурі, таким чином щоб вміст олії в аліквоті екстракту не перевищував 0.4 г. Для насіння олійних культур об'єм аліквоти складав 1.6 мл, для сої – 2.5 мл, для кукурудзи – 4.0 мл. ПАВ елюювали 80 мл гексану. Розчинник упарювали на ротаторному випарнику до об'єму приблизно 2-3 мл при температурі 40 °С. Пробу кількісно переносили порціями у хроматографічну віалу об'ємом 1.5 мл, змиваючи зі стінок колби гексаном, та упарювали під струменем азоту до сухого залишку. Розчиняли у 1000 мкл гексану та проводили вимірювання вмісту ПАВ методом хромато-мас-спектрометрії.

Хромато-мас-спектрометричний аналіз. Вихідна температура РТВ-інжектору складала 40 °С та утримувалася на протязі 1.5 хвилин, швидкість видуву - 50 мл/хв протягом 1.4 хв. Фаза переносу проводилася в режимі «без ділення потоку» («splitless») при нагріванні зі швидкістю 700 °С/хв до 350 °С, яка утримувалася 3 хвилини.

Температурна програма термостату колонки: 50 °С (утримання 2 хвилини), нагрівання до 275 °С зі швидкістю 10 °С/хв (утримання 15

хвилин). Газ-носії: гелій, при постійній швидкості потоку 1.2 мл/хв. Температура трансферлайну: 280 °С.

Умови роботи мас-селективного детектору: температура інтерфейсу - 280 °С, джерела іонів - 230 °С, квадруполю - 150 °С. Тип іонізації – електронний удар (70 eV). Детектування аналітів відбувалося в селективному режимі моніторингу вибраних іонів (SIM). Для ідентифікації аналітів використовували три іони. Сигнал найбільш інтенсивного іону використовували для кількісних розрахунків (іон-квантифікатор), інші два іона були підтверджуючими для ідентифікації сполук (іоні-кваліфікатори, таблиця 2).

Аналіз даних та валідація методу. Для валідації методу використовували «чисті» проби (матриці), в яких присутність аналітів була нижче за межу визначення аналітичного обладнання, на якому проводилася розробка методики. Матриці агрокультур були обрані з проб, що надходили на випробування, з концентрацією ПАВ <0.5 мкг/кг за результатами тестувань у декількох незалежних акредитованих лабораторіях. Коефіцієнти вилучення, правильність і точність визначення аналітів запропонованим способом перевіряли методом «введено-знайдено» за допомогою чотирьох добавок кожного ПАВ концентрацією: 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 мкг/кг. Добавки вносили у наважку проби до початку аналізу, після чого пробу перемішували та витримували 8-10 годин у холодильнику для взаємодії аналітів з матрицею.

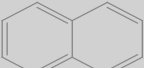
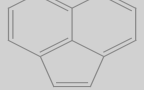
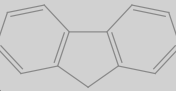
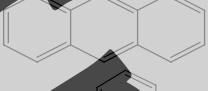
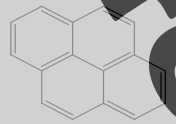
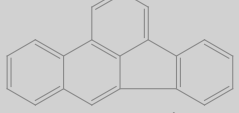
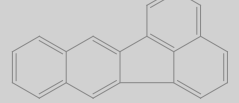
Межа виявлення (LOD) та межа визначення (LOQ) запропонованого методу встановлені на основі співвідношення «сигнал-шум» 3 ($S/N \geq 3$) та 10 ($S/N \geq 10$). Повторюваність ($n=5$) та відтворюваність ($n=5 \times 3$ дні) розраховані шляхом обчислення відносного середньоквадратичного відхилення (RSD, %).

Процедура «холостого визначення» («бланку») проводилася під час розробки та оцінювання методу для встановлення джерел можливих контамінацій під час підготовки та аналізування проби. «Бланк» екстрагували, очищували та аналізували відповідно до процедури визначення ПАВ.

Таблиця 1. Умови екстракції ПАВ з проб агропродукції.

Об'єкт аналізу	Наважка, г	m (Na ₂ SO ₄), г	Екстрагент	t, год
Ріпак	5.00±0.05	1.5±0.1	Гексан:дихлорметан (1:1)	6
Насіння соняшнику	5.00±0.05	1.5±0.1	Гексан:дихлорметан (1:1)	6
Льон	5.00±0.05	1.5±0.1	Гексан:дихлорметан (1:1)	6
Соя	7.50±0.05	3.0±0.1	Гексан:дихлорметан (2:1)	8
Кукурудза	10.0±0.05	3.5±0.1	Гексан:дихлорметан (2:1)	8

Таблиця 2. Часи виходу та умови мас-спектрометричного детектування ПАВ.

Сполука	Структурна формула	Час виходу, хвилин	Іон- квантифікатор	Іони- кваліфікатори
Нафтален		8.55	128	129; 127
Аценафтилен		12.22	152	151; 153
Аценафтен		12.63	154	153; 152
Флуорен		13.86	166	165; 167
Фенантрен		16.12	178	179; 176
Антрацен		16.24	178	179; 176
Флуорантен		18.97	202	101; 203
Пірен		19.49	202	101; 203
Бенз(а)антрацен		22.74	228	229; 226
Хризен		22.85	228	229; 226
Бенз(б)флуорантен		26.42	252	253; 126
Бенз(к)флуорантен		26.52	252	253; 126
Бенз(а)пірен		27.56	252	253; 126
Індено(1,2,3-сd)пірен		31.66	276	138; 277
Дибенз(а, h)антрацен		31.82	278	139; 279
Бензо(g, h, i)перилен		32.57	276	138; 277

Результати та їх обговорення

Екстракція ПАВ з агропродукції для кількісного аналізу є досить складною через те, що дані аналіти щільно зв'язані з компонентами матриці. Для вилучення не тільки ПАВ, але також і інших стійких органічних забрудників: поліхлорованих біфенілів, поліхлорованих дибензо-пара-діоксинів, поліхлорованих дибезофуранів, хлорорганічних пестицидів і ін. успішно застосовується екстракція за допомогою апарату Сокслета [18]. Оскільки поліциклічні ароматичні вуглеводні, що відносяться до ряду пріоритетних ПАВ, відрізняються за будовою та фізико-хімічними властивостями (молекулярна маса, температура кипіння, коефіцієнт розподілу «октанол-вода») [19], то рідинна екстракція за допомогою апарату Сокслета є ефективним методом, що дозволяє досягти прийнятних коефіцієнтів вилучення як для «легких» (до трьох бензольних кілець), так і «важких» ПАВ. Повнота вилучення аналітів з різних матриць в апараті Сокслета залежить від природи розчинника і часу екстракції.

Для екстракції ПАВ з твердих зразків як правило використовують дихлорметан, гексан та суміші гексану з більш полярними розчинниками (ацетон, дихлорметан, хлороформ, тощо) [20–22]. В даній роботі для екстракції ПАВ зі зразків агропродукції були випробувані системи з індивідуальних розчинників та їх сумішей: дихлорметан, гексан, дихлорметан:гексан (1:1), гексан:дихлорметан (2:1), гексан:етилацетат (3:1). В даних дослідженнях час Сокслет-екстракції становив 8 годин.

В таблиці 3 наведені данні щодо ефективності екстракції ПАВ різними розчинниками зі зразків 5 видів культур агропродукції. При цьому для кількісної оцінки використовували величини коефіцієнтів вилучення (R) для кожного аналіту, що розраховували за рівнянням (1).

$$R_i = \frac{C_{\text{зн}} - C_0}{C_{\text{доп}}} \times 100\%, \quad (1)$$

де R_i – коефіцієнт вилучення i -того ПАВ, %; $C_{\text{зн}}$ – концентрація i -того ПАВ, визначена у пробі з добавкою, мкг/кг; $C_{\text{доп}}$ – концентрація i -того ПАВ, додана у пробу, мкг/кг; C_0 – початкова концентрація i -того ПАВ у пробі, мкг/кг.

В даному дослідженні для приготування проб з добавками використовувалися проби, в яких $C_0 < LOD$ (тобто $C_0 \sim 0$). Усереднені коефіцієнти вилучення для 16 пріоритетних ПАВ розраховані як ($R_{cp} \pm SD$), де R_{cp} – середнє арифметичне коефіцієнтів вилучення ПАВ, SD – стандартне відхилення.

Середні значення коефіцієнтів вилучення є досить високими $\geq 70\%$. При цьому в гексані та його суміші з етилацетатом спостерігалася різна ефективність екстракції аналітів в ряду ПАВ. Так, при високих коефіцієнтах вилучення (78-92 %) ПАВ, що містять 2-4 бензольні кільця, для ізомерів $C_{20}H_{12}$ та $C_{22}H_{12}$, а також $C_{22}H_{14}$, значення R_i складало 49-68 %. Кількісно це відображається у високих значеннях стандартних відхилень. Для дихлорметану та його сумішей з гексаном отримані більш високі значення коефіцієнтів вилучення. При цьому значення стандартних відхилень вказують на рівномірність екстракції аналітів, що досліджувалися. Таким чином, суміші гексану з дихлорметаном чи етилацетатом є більш ефективними для екстракції ПАВ з агрокультур порівняно з гексаном. Ймовірно, суміші гексану з більш полярними розчинниками краще змочують матрицю, прискорюючи екстракцію. Дихлорметан як індивідуальний розчинник для екстракції має ряд недоліків, по-перше, втрати розчинника через леткість, по-друге, спостерігалася збільшення концентрації заважаючих сполук матриць за рахунок співекстракції макрокомпонентів матриці проби. Оптимальні суміші розчинників для вилучення ПАВ з проб агрокультур наведено в таблиці 1.

Для встановлення часу необхідного для екстракції ПАВ досліджено проби з добавкою 2 мкг/кг ПАВ, які екстрагували протягом 6 та 8 годин. Встановлено, що для зразків ріпаку, соняшнику та льону значення R_i збільшується на 5-12% при збільшенні часу екстракції з 6 до 8 годин. В той же час, для зразків кукурудзи та сої збільшення часу екстракції суттєво не впливає на R_i . Додаткові дослідження коефіцієнтів вилучення ПАВ для зразків ріпаку, соняшнику та льону при їх екстракції протягом 10 годин, а сої та кукурудзи – 4 годин.

Таблиця 3. Усередненні коефіцієнти вилучення (R_{cp} , %) ПАВ з проб агропродукції з використанням різних екстрагентів.

Екстрагент	Ріпак	Насіння соняшнику	Льон	Соя	Кукурудза
Дихлорметан	84±4	87±2	85±3	91±5	93±4
Гексан	79±11	74±15	72±14	76±12	78±17
Гексан:дихлорметан (1:1)	93±2	96±3	94±2	94±2	91±4
Гексан:дихлорметан (2:1)	91±4	92±4	89±6	92±2	90±3
Гексан:етилацетат (3:1)	81±12	84±11	89±13	84±12	83±11

Збільшення часу екстракції ПАВ зі зразків ріпаку, соняшнику та льону з 8 до 10 годин не призводить до суттєвого подальшого збільшення R_f . Тоді як 4 годин є недостатньо для екстракції більшості ПАВ зі зразків кукурудзи та сої. Отже, оптимальний час екстракції ПАВ складає 6 годин для зразків ріпаку, соняшнику та льону, для кукурудзи та сої - 8 годин. Різниця у часу необхідного для вилучення ПАВ з різних культур, та збільшення значення коефіцієнтів вилучення при збільшенні часу екстракції вказують на взаємодію аналітів з матрицею. При цьому інтенсивність взаємодії ПАВ залежить від природи агрокультури.

Отриманий екстракт окрім аналітів містить інші заважаючи макрокомпоненти матриці такі, як ліпіди, фосфоліпіди, жирні кислоти, фітостерини, пігменти та інші ліпофільні сполуки. Очистку екстрактів проводили методом твердофазної екстракції з використанням сорбенту – Al_2O_3 , який містить 5 мас. % води. Оксид алюмінію є амфотерним сорбентом з механізмами утримання, заснованими на взаємодії «кислота-основа Льюїса», полярних та іонообмінних взаємодіях [23]. При взаємодії з водою на поверхні активованого оксиду алюмінію формується моношар хемосорбованих молекул води за рахунок як водневих зв'язків, так і дисоціації з утворенням гідроксильних груп. Внаслідок чого виникають центри сорбції, на яких здатні утримуватися молекули з полярними групами за рахунок формування водневих зв'язків. У випадку рослинних екстрактів з утворенням водневих зв'язків можуть сорбуватися моно-, ди- та три-гліцериди, фосфоліпіди, пігменти. Окрім того, на поверхні оксиду алюмінію відбувається хемосорбція вільних жирних кислот [24], які присутні у значній концентрації у рослинних матрицях як продукт деструкції ліпідів. При цьому було встановлено, що збільшення масової долі води (>5%) при деактивації оксиду алюмінію призводить до зниження ефективності очистки від коекстрагованих моно-, ди- та три-гліцериди, фосфоліпідів, які елюються з колонки разом з ПАВ. Це, ймовірно, пов'язано з тим, що надлишок води сорбується на поверхні з формуванням багаточастинкових структур за рахунок водневих зв'язків, таким чином блокуючи активні центри. Об'єм аліквоти екстракту, що відбирається для очищення - визначений експериментально для досліджуваних проб агропродукції, виходячи з ємності колонки.

Температурно-програмоване інжектування (PTV) в режимі ділення потоку є одним із найбільш часто застосовуваних методів, коли аналіти присутні у складних матрицях у слідових кількостях. PTV-інжектор дозволяє проводити інжектування від декількох до десятків мікролітрів проби, стадію віддувки розчинника та попереднє концентрування аналітів у лайнері при температурі нижче температури кипіння аналітів з послідовним

їх перенесенням до аналітичної колонки шляхом швидкого нагрівання лайнеру. Таким чином, після очищення зразка, інші заважаючи сполуки матриці можуть бути нівельовані шляхом підбору температурної програми. Інжекція в PTV-режимі є ефективною при інжектуванні групи аналітів з різними температурами кипіння, такими як ПАВ, оскільки температурна програма інжектора зменшує втрати від випаровування більш низькокиплячих сполук та розклад висококиплячих аналітів та поліпшує фокусування на вході аналітичної колонки.

Встановлено, що початкова температура інжектору є суттєвою для визначення аналітичної чутливості ПАВ з двома або трьома кільцями. Така залежність обумовлена частковою втратою цих відносно летких сполук у фазі віддувки розчинника («solvent vent»). Співвідношення площ піків дво- і трициклічних ПАВ до бензо(*g,h,i*)перилену як функція від початкової температури PTV побудовано на рис.1. При температурній програмі PTV, що розпочинається з 40 °C, площі піків нафталену, аценафтилену та аценафтену були в 1.8-2.6 разів більші ніж їх піки, отримані при 80 °C. В той же час зменшення чутливості зі збільшенням початкової температури PTV не спостерігалось для ПАВ з чотирма або більше кільцями.

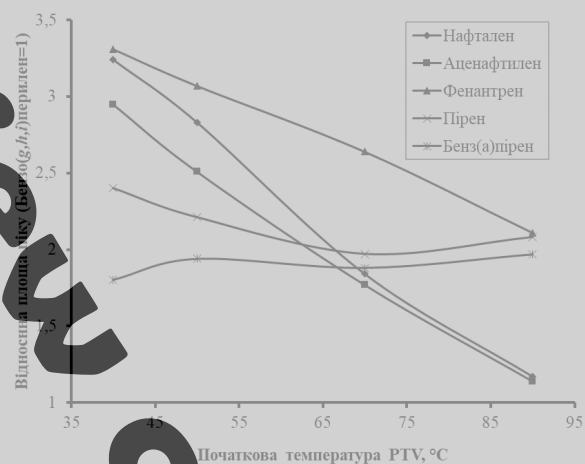


Рис. 1. Відносна площа піків ПАВ в залежності від початкової температури програми PTV-інжекції.

Повторні інжекції зразку проводили при варіюванні часу виходу розчинника від 1.5 до 6 хв при початковій температурі з 40 °C. Впливу збільшення часу вентиляції на площі піків ПАВ не спостерігалось. Оптимальний об'єм інжекції визначався в інтервалі 2-20 мкл для підготовлених зразків агрокультур, що дозволяє врахувати «матричні ефекти». Збільшення об'єму інжекції з 2 до 20 мкл призводить до зростання інтенсивності піків ПАВ. Однак, при збільшенні об'єму інжекції ПАВ відбувається уширення піків зі зростанням асиметрії («peak tailing»), що призводить до

зменшення роздільної здатності та утруднює інтегрування піків ізомерів. Оптимальний об'єм інжекції становив 5 мкл для ріпаку, соняшнику, льону та 10 мкл для зразків кукурудзи.

Серед 16 пріоритетних ПАВ є структурні ізомери (табл. 2), які утворюють однакові іони при іонізації, тому не можуть бути розділені при мас-спектрометричному детектуванні. Зважаючи на це, для даних аналітів важливим є хроматографічне розділення. В запропонованих умовах повністю або частково розділені піки критичних пар ізомерів:

бенз(а)антрацену і хризену, індено(1,2,3-*cd*)пірену і дибенз(а,һ)антрацену, бенз(Ь)флуорантену і бенз(к)флуорантену, що дозволяє їх індивідуальне визначення (рис. 2). Сполуки індено(1,2,3-*cd*)пірен та дибенз(а,һ)антрацен, які розділені як хроматографічно, так і мас-спектрометрично.

Для побудови градувальних залежностей для кожного виду агропродукції готували розчини ПАВ в модельних розчинах відповідної матриці і не містили ПАВ (рис. 3).

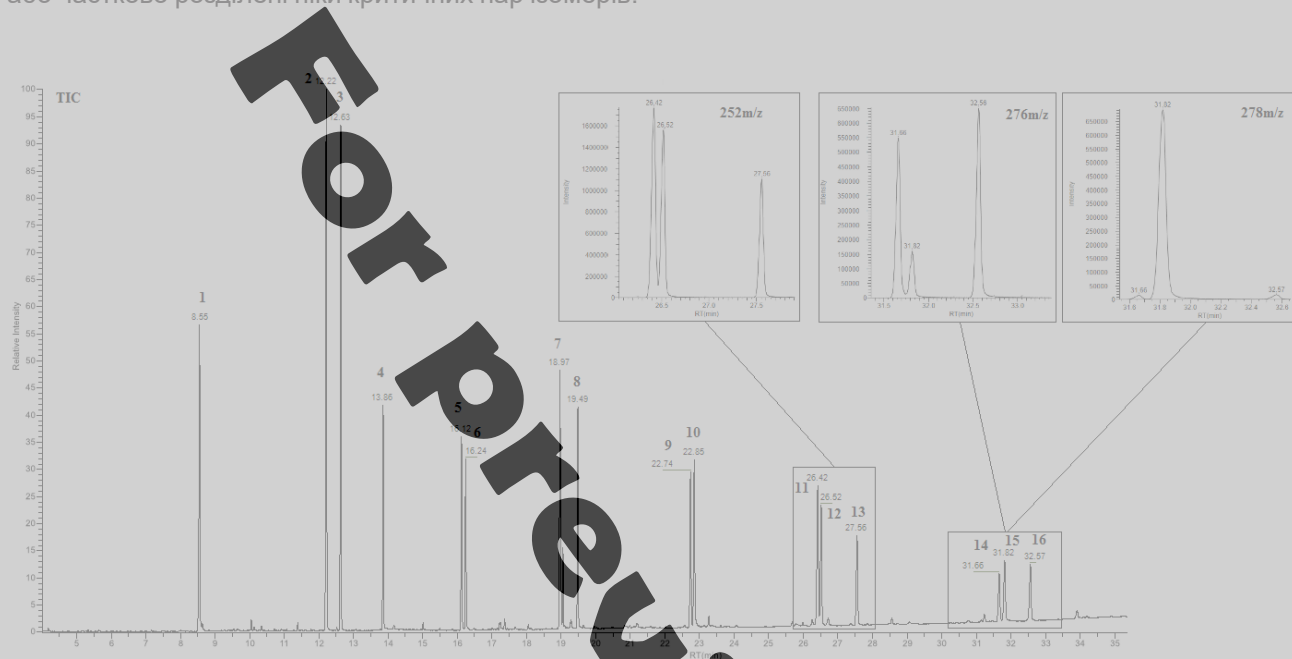


Рис. 2. Хроматограма стандартної суміші ПАВ в режимі загального іонного потоку (TIC) та вибраних іонів з концентрацією 50 нг/мл в гексані (1 - нафтаген, 2 - аценафтиген, 3 - аценафтен, 4 - флуорен, 5 - фенантрен, 6 - антрацен, 7 - флуорантен, 8 - пірен, 9 - бенз(а)антрацен, 10 - хризен, 11 - бенз(Ь)флуорантен, 12 - бенз(к)флуорантен, 13 - бенз(а)пірен, 14 - індено(1,2,3-*cd*)пірен, 15 - дибенз(а,һ)антрацен, 16 - бензо(ɡ,һ,і)-перилген).

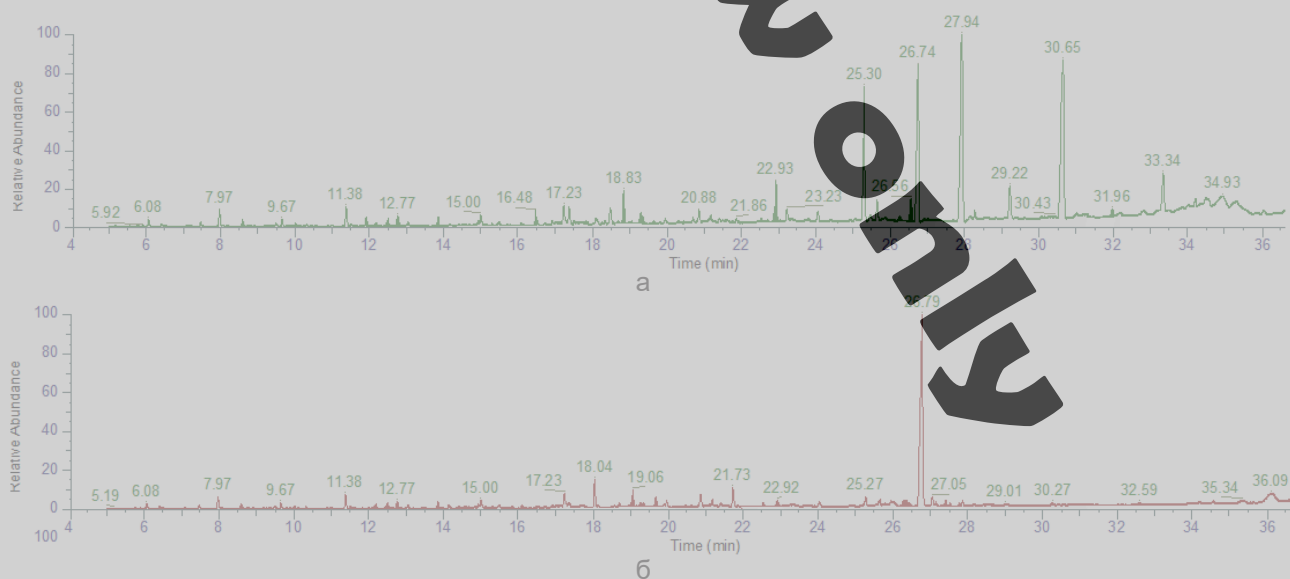


Рис. 3. Хроматограма екстракту насіння соняшнику (а) та кукурудзи (б) в режимі TIC.

Лінійність методу визначали за градувальники графіками для трьох вимірювань градувальних розчинів в інтервалі 0.5–100 нг/мл. Коефіцієнти кореляції (R^2) залежностей для 16 ПАВ знаходилися в межах від 0.9847–0.9998, кутові коефіцієнти нахилу градувальних залежностей – $(4.2\text{--}8.7) \times 10^5$, вільні члени рівнянь – $(2.4\text{--}19.8) \times 10^5$. Для всіх ПАВ отримані надійні лінійні кореляції між площами піків та концентраціями у вказаному діапазоні концентрацій. Значення LOQ для матричних градувальних розчинів були перераховані на наважку проби, виходячи з описаної процедури. Значення межі кількісного визначення ПАВ для ріпаку наведені в таблиці 4.

Оцінку методу проводили шляхом вимірювання в умовах повторюваності та проміжної відтворюваності стандартних розчинів ПАВ в гексані та модельних розчинів «чистих» матриць (табл.4). Варто зазначити, що хроматограми екстрактів за розробленою пробопідготовкою не містили піків заважаючих компонентів, які перекриваються з сигналами ПАВ (рис. 3).

Повторюваність розраховували за результатами аналізу п'ятих послідовних інжекцій в один день стандартного розчину суміші ПАВ в гексані (1 нг/мл кожного аналіту) та в модельному розчині матриці. Проміжну відтворюваність оцінювали, виконуючи

вимірювання п'яти послідовних інжекцій обох зразків впродовж трьох днів. Отже, розраховані оцінки точності відображають лише внесок вимірювань GC-MS у загальну точність методу аналізу, а також дають можливість оцінити вплив «матричних ефектів» на результати вимірювань. Коефіцієнти відтворення (табл.4) одержані для модельної матриці можуть бути застосовані лише для оцінки впливу матриці на мас-спектрометричні вимірювання і, не несуть інформацію щодо втрат аналітів в процесі підготовки проби, на відміну від даних таблиці 2.

Вплив ефектів матриці на GC-MS вимірювання можна оцінити за даними відтворюваності зразка рапсу. Для всіх аналітів відтворюваність була того самого порядку як величина повторюваності, що вказує на стабільність результатів в умовах відтворюваності та відсутність суттєвого впливу поступового накопичення заважаючих речовин в інжекторі на результати вимірювань. Вищі значення збіжності та відтворюваності для матричного зразка порівняно з розчинником вказують на присутність незначних «матричних ефектів», які найбільше проявляються для нафталену, аценафтилену та бензо(*g,h,i*)перилену, тобто переважно пов'язані з присутністю низько та високо киплячих компонентів матриці.

Таблиця 4. Межа кількісного визначення (LOQ), повторюваність (RSDr) та відтворюваність (RSDi) визначення ПАВ у модельному екстракті ріпаку та градувальному розчині.

Сполука	Модельний екстракт ріпаку				Градувальний розчин	
	LOQ, мкг/кг	RSDr*, %	RSDi*, %	R _p , %	RSDr**, %	RSDi**, %
Нафтален	0.752	5.02	7.42	88.5±2.9	2.47	3.96
Аценафтилен	0.565	4.46	7.83	92.1±2.4	2.48	3.85
Аценафтен	0.576	3.94	5.67	91.0±1.7	1.49	3.32
Флуорен	0.636	3.20	5.62	87.9±2.2	1.27	3.13
Фенантрен	0.630	2.66	4.80	95.9±2.7	1.95	2.84
Антрацен	0.543	3.14	4.33	92.0±1.9	1.90	2.82
Флуорантен	0.452	3.28	5.86	102.4±3.1	1.41	2.46
Пірен	0.500	3.26	4.64	94.9±1.9	2.06	2.74
Бенз(а)антрацен	0.758	3.99	5.78	104.4±2.3	2.18	3.03
Хризен	0.527	4.17	5.72	97.2±2.6	2.02	3.26
Бенз(б)флуорантен	0.534	4.47	5.65	91.3±2.2	2.47	3.38
Бенз(к)флуорантен	0.689	3.72	6.09	90.5±2.1	3.02	4.15
Бенз(а)пірен	0.582	4.30	5.52	104.6±3.1	1.49	3.49
Індено(1,2,3- <i>cd</i>)пірен	0.758	4.81	7.03	90.8±4.1	2.32	3.45
Дибенз(а, h)антрацен	0.717	4.74	7.21	92.0±2.5	2.59	2.79
Бензо(г, h, i)перилен	0.653	5.29	8.23	89.5±3.8	3.37	4.56

*Розчин суміші ПАВ (1 нг/мл) у модельній матриці (ріпак) з використанням розробленої пробопідготовки.

**Розчин суміші ПАВ (1 нг/мл) у гексані.

Значення збіжності, відтворюваності та коефіцієнтів вилучення близьких до 100 %, свідчать про відсутність суттєвих «матричних» впливів при аналізі зразків агропродукції з застосуванням розробленої пробопідготовки зразків та PTV-GC-MS методу. В таблиці 5 наведені дані визначення ПАВ у зразках ріпаку (Зразок 1) та сої (Зразок 2).

Результати, отримані за розробленою методологією порівнювали з результатами визна-

чення вмісту бенз(а)антрацену, хризену, бенз(б)-флуорантену та бенз(а)пірену (показник «4ПАВ») методом високоефективної рідинної хроматографії з флуоресцентним детектуванням (табл. 5). Різниця між середніми значеннями двох методів є прийнятною для аналізу реальних зразків, враховуючи нерівномірний розподіл ПАВ в об'ємі проб.

Таблиця 5. Результати визначення ПАВ у зразках ріпаку (Зразок 1) та сої (Зразок 2) (P=0.95, n=3).

Сполука	Масова частка ПАВ, мкг/кг			
	Зразок 1		Зразок 2	
	GC-MS	HPLC-FLD*	GC-MS	HPLC-FLD*
Нафтален	1.18±0.11	н.в.**	<LOQ	н.в.
Аценафтилен	0.914±0.038	н.в.	<LOQ	н.в.
Аценафтен	<LOQ	н.в.	<LOQ	н.в.
Флуорен	<LOQ	н.в.	<LOQ	н.в.
Фенантрен	0.812±0.037	н.в.	1.45±0.17	н.в.
Антрацен	1.28±0.11	н.в.	<LOQ	н.в.
Флуорантен	<LOQ	н.в.	<LOQ	н.в.
Пірен	<LOQ	н.в.	<LOQ	н.в.
Бенз(а)антрацен	0.650±0.039	0.601±0.015	1.050±0.012	1.118±0.014
Хризен	0.712±0.028	0.723±0.009	1.107±0.034	1.142±0.027
Бенз(б)флуорантен	<LOQ	<LOQ	0.812±0.021	0.826±0.015
Бенз(к)флуорантен	<LOQ	н.в.	<LOQ	н.в.
Бенз(а)пірен	0.872±0.047	0.851±0.011	0.608±0.021	0.594±0.018
Індено(1,2,3-сd)пірен	<LOQ	н.в.	<LOQ	н.в.
Дибенз(а, h)антрацен	<LOQ	н.в.	<LOQ	н.в.
Бензо(g, h, i)перилен	<LOQ	н.в.	<LOQ	н.в.

*метод високоефективної рідинної хроматографії з флуоресцентним детектуванням; **н.в. – не визначали

Висновки

За результатами проведених досліджень була розроблена чутлива, селективна та надійна методика кількісного визначення слідових кількостей ПАВ у агропродукції шляхом екстракції у апараті Сокслета та очищенні проб від заважаючих макрокомпонентів за допомогою твердофазної екстракції з наступним аналізом методом газової хромато-мас-спектрометрії з температурно-програмованим інжектуванням. На прикладі п'яти агрокультур (ріпак, соняшник, льон, кукурудза, соя) показано, що ефективними для екстракції ПАВ є бінарні суміші «гексантихлорметан» у співвідношенні 1:1 та 2:1 (в залежності від культури). При цьому час екстракції становить від 6 до 8 годин. Встановлені оптимальні об'єми екстракту для твердофазної екстракції (на деактивованому оксиді алюмінію) в залежності від вмісту олії в агрокультурах. Градуальні залежності є лінійними в діапазоні концентрацій 0.5-100 нг/мл, що відповідає межах кількісного визначення індивідуальних ПАВ (від 0.371

до 0.842 мкг/кг). За результатами хромато-мас-спектрометричних вимірювань суттєвих «матричних ефектів» при аналізі зразків агропродукції з застосуванням запропонованої пробопідготовки не виявлено.

Література:

1. Bojanowska, M.; Czerwiński, J. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Rape Seeds with Relation to Their Growing Site and Thermal Treatment. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* **2010**, 73 (17–18), 1250–1259. <https://doi.org/10.1080/15287394.2010.492013>.
2. Inam, E.; Ibanga, F.; Essien, J. Bioaccumulation and Cancer Risk of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Leafy Vegetables Grown in Soils within Automobile Repair Complex and Environ in Uyo, Nigeria. *Environ. Monit. Assess.* **2016**, 188 (12), 681. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5695-3>.
3. Gu, J.; Zhou, W.; Jiang, B.; Wang, L.; Ma, Y.; Guo, H.; Schulin, R.; Ji, R.; Evangelou, M. W. H. Effects of Biochar on the Transformation and Earthworm

Bioaccumulation of Organic Pollutants in Soil. *Chemosphere* **2016**, *145*, 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.106>.

4. Ding, C.; Ni, H.-G.; Zeng, H. Human Exposure to Parent and Halogenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons via Food Consumption in Shenzhen, China. *Sci. Total Environ.* **2013**, *443*, 857–863. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.018>.

5. Domingo, J. L.; Nadal, M. Human Dietary Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review of the Scientific Literature. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *86*, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.002>.

6. Mafrá, I.; Amaral, J. S.; Oliveira, M. B. P. Chapter 54 - Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Olive Oils and Other Vegetable Oils; Potential for Carcinogenesis; Preedy, V. R., Watson, R. R. B. T.-O. and O. O. in H. and D. P., Eds.; Academic Press: San Diego, 2010; pp 489–498. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00054-1>.

7. EC. COMMISSION REGULATION (EU) No 835/2011 of 19 August 2011. *Off. J. Eur. Union* **2011**, *L 215* (835), 4–8.

8. Chmil, V. D.; Golokhova, O. V.; Vydrin, D. Y.; Kruk, V. I. Urgency the Problem of Determining Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Food Products in Accordance with the EU Regulations. *One Heal. Nutr. Probl. Ukr.* **2019**, *50* (1), 9–18. <https://doi.org/10.33273/2663-9726-2019-50-1-9-18>.

9. Ishizaki, A.; Saito, K.; Hanioka, N.; Narimatsu, S.; Kataoka, H. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food Samples by Automated On-Line in-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (35), 5555–5563. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.06.068>.

10. Girelli, A. M.; Sperati, D.; Tarola, A. M. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Italian Milk by HPLC with Fluorescence Detection. *Food Addit. Contam. Part A* **2014**, *31* (4), 703–710. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.878959>.

11. Zhang, H.; Xue, M.; Dai, Z. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aquatic Products by HPLC-Fluorescence. *J. Food Compos. Anal.* **2010**, *23* (5), 469–474. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.12.016>.

12. Košnář, Z.; Mercl, F.; Perná, I.; Tlustoš, P. Investigation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Content in Fly Ash and Bottom Ash of Biomass Incineration Plants in Relation to the Operating Temperature and Unburned Carbon Content. *Sci. Total Environ.* **2016**, *563–564*, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.059>.

13. Okeke, P. N. Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Some Organs of Tilapia Species from New Calabar River, Niger Delta, Nigeria. *J. Adv. Res. Pharm. Biol. Sci.* **2016**, *2* (4), 61–69.

14. Rolle, F.; Pennecchi, F.; Perini, S.; Sega, M. Metrological Traceability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Measurements in Green Tea and Mate. *Measurement* **2017**, *98*, 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2016.03.009>.

15. Tsybalyuk, K. K.; Den'ga, Y. M.; Berlinsky, N. A.; Antonovich, V. P. Determination of 16 Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Bottom Sediments of the Danube Estuarine Coast by GC/MS. *Geo-Eco-Marina* **2011**, *17* (May 2010), 67–72. <https://doi.org/10.5281/zenodo.56898>.

16. Tsybaliuk, K. K.; Den'ga, Y. M.; Antonovich, V. P. Determination Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In The Environmental Objects. The Review. *METHODS OBJECTS Chem. Anal.* **2013**, *8* (2), 50–62.

17. Gorban, M. V.; Milyukin, M. V. Physical Forms of Distribution of Heavy Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Natural Water of Dnieper River in Kyiv Region. *Methods Objects Chem. Anal.* **2017**, *12* (3). <https://doi.org/10.17721/moca.2017.145-151>.

18. Banjoo, D. R.; Nelson, P. K. Improved Ultrasonic Extraction Procedure for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1066* (1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.01.033>.

19. Milyukin, M. V.; Gorban, M. V.; Skrynnyk, M. M. Monitoring and Distribution of Organochlorine Pesticides, Poly-Chlorinated Biphenyls and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface River Water and Suspended Particulate Matter. 2019, pp 117–129. <https://doi.org/10.17721/moca.2019.117-129>.

20. Pena, T.; Pensado, L.; Casais, C.; Mejuto, C.; Phan-Tan-Luu, R.; Cela, R. Optimization of a Microwave-Assisted Extraction Method for the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Fish Samples. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1121* (2), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.038>.

21. Jonker, M. T. O.; Koelmans, A. A. Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Soot and Sediment: Solvent Evaluation and Implications for Sorption Mechanism. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36* (19), 4107–4113. <https://doi.org/10.1021/es0103290>.

22. Lee, P. H.; Ong, S. K.; Golchin, J.; Nelson, G. L. Extraction Method for Analysis of PAHs in Coal-Tar-Contaminated Soils. *Pract. Period. Hazardous, Toxic, Radioact. Waste Manag.* **1999**, *3* (4), 155–162. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)1090-025X\(1999\)3:4\(155\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)1090-025X(1999)3:4(155)).

23. Meshcheryakov, E. P.; Reshetnikov, S. I.; Sandu, M. P.; Knyazev, A. S.; Kurzina, I. A. Efficient Adsorbent-Desiccant Based on Aluminium Oxide. *Appl. Sci.* **2021**, *11* (6). <https://doi.org/10.3390/app11062457>.

24. Tao, Y. T. Structural Comparison of Self-Assembled Monolayers of n-Alkanoic Acids on the Surfaces of Silver, Copper, and Aluminum. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (10), 4350–4358. <https://doi.org/10.1021/ja00063a062>.