



УДК 541

## Определение полиароматических углеводородов в жиросодержащих продуктах питания с использованием селективной твердофазной экстракции

Проскурина Н.А., Даванков В.А., Ильин М.М., Ильин М.М. (мл.)

*Учреждение Российской Академии Наук Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, 119991, Москва*

Сычев К.С.

*ЗАО «Найтек Инструментс», Москва*

Поступила в редакцию 27.01.2009 г.

### Аннотация

В работе показана принципиальная возможность селективного выделения полиароматических углеводородов из масел, жиров и жиросодержащих продуктов питания с помощью твердофазной экстракции (ТФЭ) на сверхсшитом полистирольном адсорбенте. Разработанная в работе оригинальная процедура ТФЭ позволяет уйти от стадии предварительного щелочного гидролиза жиров, что приводит к значительному увеличению производительности анализа и существенной экономии химических реагентов. Извлечение десяти тетра-, пента- и гексациклических ПАУ является практически количественным из образцов растительного масла, и изменяется от 50 до 95% для образцов копченой рыбы.

**Ключевые слова:** полиароматические углеводороды, твердофазная экстракция, сверхсшитый полистирол, высокоэффективная жидкостная хроматография

The study describes selective isolation of polyaromatic hydrocarbons from oils, fats and fat-containing food by means of solid-phase extraction (SPE) with a hypercrosslinked polystyrene adsorbent. The developed original SPE procedure allows eliminating the stage of preliminary alkaline hydrolysis of the fats. This leads to substantial increase in the productivity of analysis and essential economy of chemicals. The extraction of ten tetra-, penta- and hexacyclic PAHs from a vegetable oil is practically quantitative while their recoveries varied from 50 to 95% when extracting PAHs from smoked fish.

**Keywords:** polyaromatic hydrocarbons, solid-phase extraction, hypercrosslinked polystyrene, a high performance liquid chromatography

### Введение

Полиароматические углеводороды (ПАУ) относятся к группе стойких органических загрязнителей (СОЗ). Они обладают ярко выраженными канцерогенными свойствами. Более 100 ПАУ найдены в природе, однако лишь 16 из них выделены как приоритетные загрязнители Американским агентством защиты

окружающей среды. Наибольшую опасность представляет бенз(а)пирен. Нормы предельно допустимой концентрации для бенз(а)пирена в различных объектах экологического контроля установлены и в Российской Федерации.

Одним из основных источников попадания соединений данной группы в организм человека являются продукты питания. В частности, это относится к пищевым жирам, в которых ПАУ хорошо растворяются и накапливаются, а также к копченым продуктам [1, 2]. В Российской Федерации содержание бенз(а)пирена в жировых, копченых мясных и рыбных продуктах нормируется на уровне 1 мкг/кг (установлено Санитарными правилами и нормами СанПин 2.3.2.560-96).

Основными методами аналитического определения полиароматических углеводородов являются обращено-фазовая ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием и ГХ с масс-селективным детектированием. Наибольшее распространение получил метод с применением ВЭЖХ, поскольку он обладает более высокой производительностью, как на стадии анализа, так и на стадии подготовки пробы.

В настоящее время в РФ принят ряд достаточно однотипных методик анализа ПАУ методом ВЭЖХ. Подготовка пробы состоит в щелочном гидролизе навески, экстракции ПАУ гексаном или циклогексаном из предварительно разбавленного водой щелочного гидролизата, концентрировании экстракта отгонкой растворителя на роторном испарителе и очистки сконцентрированного экстракта на стеклянной колонке, заполненной полярным адсорбентом.

Основным недостатком данных методик является высокая трудоемкость. Большое число стадий в процессе подготовки пробы увеличивает как суммарное время анализа, так и результирующую ошибку измерений. Все эти трудности связаны с невозможностью выделения ПАУ из матрицы – триглицеридов жирных кислот. Последние приходится разрушать жестким щелочным гидролизом до глицерида и натровых солей жирных кислот, которые уже практически не экстрагируются гексаном из водного гидролизата.

Упрощения процесса подготовки пробы можно добиться, исключив стадию щелочного гидролиза. Для этого необходимо найти альтернативный метод выделения ПАУ из жирорастворимой матрицы.

Известно, что некоторые адсорбенты для твердофазной экстракции [3] обладают способностью селективно удерживать ароматические соединения из неполярных сред за счет образования лабильных комплексов с переносом заряда  $\pi$ - $\pi$  типа [4]. Одним из наиболее перспективных классов адсорбентов такого рода являются сверхсшитые полистиролы, которые обладают крайне высокой удельной поверхностью (до 1500 м<sup>2</sup>/г) и, соответственно, высокой адсорбционной емкостью [5].

В данной работе нами были разработаны и апробированы подходы с применением сверхсшитого полистирольного адсорбента Purosep200 (Purolite, UK) для селективного выделения ПАУ из различных продуктов питания, содержащих большое количество жиров. Для конечного определения ПАУ в готовых экстрактах использовался метод ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием.

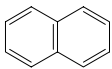
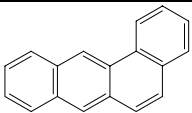
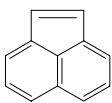
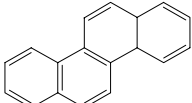
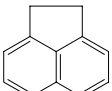
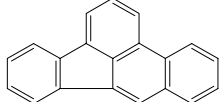
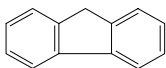
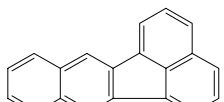
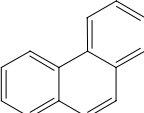
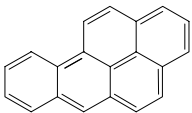
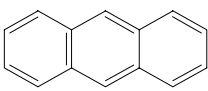
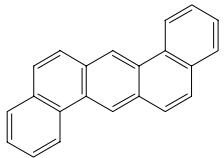
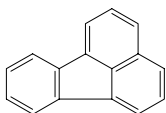
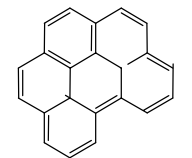
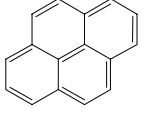
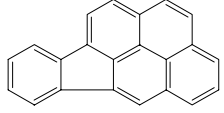
## **Эксперимент**

### **Реагенты**

Стандартная смесь полиядерных ароматических углеводородов (EPA 610M) фирмы Supelco (Bellefonte, PA, USA) состояла из раствора в смеси метанол-

метиленхлорид (1:1 об.) аценафтена (Ac)1000 мкг/мл, аценафтилена (Ap) 2000 мкг/мл, антрацена (Ant) 100 мкг/мл, бенз(*a*)антрацена (BaA) 100 мкг/мл, бенз(*b*)флуорантена (BbF) 200 мкг/мл, бенз(*k*)флуорантена (BkF) 100 мкг/мл, бенз(*ghi*)перилена (BghiP) 200 мкг/мл, бенз(*a*)пирена (BaP) 100 мкг/мл, хризена (Chr) 100 мкг/мл, дибенз(*a,h*)антрацена (DbahA) 200 мкг/мл, флуорантена (Fl) 200 мкг/мл, флуорена (F) 200 мкг/мл, индено(*123cd*)пирена (IP) 100 мкг/мл, нафталина (Na) 1000 мкг/мл, фенантрена (Phe) 100 мкг/мл и пирена (Pyr) 100 мкг/мл. Химические формулы соединений приведены в таблице 1. Стандартный раствор, содержащий 100 нг/мл BaP, был приготовлен разбавлением этой смеси ацетонитрилом и хранился при 4°C в темноте.

Таблица 1. Структурные формулы 16 приоритетных полиароматических углеводородов

№	Структурная формула	Название соединения	№	Структурная формула	Название соединения
1		Нафталин	9		Бенз( <i>a</i> )антрацен
2		Аценафтилен	10		Хризен
3		Аценафтен	11		Бенз( <i>b</i> )флуорантен
4		Флуорен	12		Бенз( <i>k</i> )флуорантен
5		Фенантрен	13		Бенз( <i>a</i> )пирен
6		Антрацен	14		Дибенз( <i>a,h</i> )антрацен
7		Флуорантен	15		Бензо( <i>ghi</i> )пирен
8		Пирен	16		Индено( <i>123cd</i> )пирен

Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил (Acros) HPLC gradient grade, воду

Milli-Q. Для ТФЭ использовали гексан марки «осч», метиленхлорид марки «осч».

### **Картриджи для твердофазной экстракции (ТФЭ)**

Для ТФЭ применяли полипропиленовые картриджи объемом 1 мл (БиоХимМакСТ, Россия) и стеклянные картриджи, также заполненные 1 мл сверхсшитого полистирола Purosep 200 (Puro-lite, UK) зерна 70-140 мкм. Стеклянные картриджи представляли собой стеклянные шприцы на 10 мл, в которые последовательно помещали: целлюлозный фильтр, 1 мл адсорбента, целлюлозный фильтр.

В начале каждой процедуры ТФЭ картриджи с адсорбентом (как новые, так и уже применявшиеся) кондиционировались 10 мл хлористого метилена и 5 мл гексана. Анализируемые образцы пропускали через картриджи под действием вакуума со скоростью около 2 мл/мин.

Картриджи использовались для анализов многократно. Специального исследования по установлению ресурса картриджа не проводилось, однако, последовательное проведение десяти анализов реальных проб на одном картридже не приводило к ухудшению степеней извлечения ПАУ.

### **Проведение твердофазной экстракции при анализе масел и жиров**

Для проведения анализа 1 мл масла растворяли в 9 мл гексана марки «осч», 10 мл раствора пропускали через стеклянный картридж с 1 мл сверхсшитого полистирола Purosep 200, предварительно кондиционированный пропусканьем 10 мл хлористого метилена и 5 мл гексана. Далее картридж промывали 10 мл гексана и сушили воздухом, нагнетаемым вакуумом, в течение 10 минут. Анализируемые ПАУ элюировали 3 мл метиленхлорида или смесями метиленхлорид-метанол различного состава. Растворитель испаряли под струей азота досуха, сухой остаток перерастворяли в 2 мл ацетонитрила.

### **Проведение твердофазной экстракции при анализе образцов копченой рыбы**

Для проведения анализа к 1 грамму предварительно измельченного образца рыбы добавляли 10 мл гексана, смесь помещали в гомогенизатор на 5 минут и обрабатывали в ультразвуковой бане в течение 10 мин. Процедуру экстракции гексаном повторяли 2 раза. Гексановый экстракт объединяли и упаривали на роторном испарителе до объема 10 мл.

Гексановый экстракт, упаренный до объема 10 мл, пропускали через стеклянный картридж с 1 мл сверхсшитого полистирола Purosep 200, предварительно кондиционированного пропусканьем 10 мл хлористого метилена и 5 мл гексана. Далее картридж промывали 10 мл гексана и сушили воздухом, нагнетаемым вакуумом, в течение 10 минут. Адсорбированные ПАУ элюировали 3 мл метиленхлорида. Растворитель испаряли под струей азота досуха, сухой остаток перерастворяли в 2 мл ацетонитрила.

### **Проведение ВЭЖХ анализа**

Анализ осуществлялся при помощи ВЭЖХ системы Agilent 1100 с флуориметрическим детектором. Разделение проводилось на обращенно-фазовой колонке 250x4.6 мм Wakosil 5 C18 AR (SGE Analytic Science, Australia). Подвижная фаза ацетонитрил-вода 85:15 (об.) подавалась со скоростью 1 мл/мин. Объем инжестируемой пробы составлял 20 мкл. Время анализа в выбранных условиях составляло 23 минуты.

Для оптимизации чувствительности определения во время анализа программируемо изменялись длины волн возбуждения и эмиссии по флуоресценции (табл. 2). Выбранная программа изменения условий детектирования позволяет максимизировать отклик по тетра-, пента- и гексациклическим ПАУ, в то время как сигналы от би- и трициклических ПАУ фактически не фиксируются. Хроматограмма стандартного раствора ПАУ с концентрацией 0.5 мкг/кг по бенз(*a*)пирену приведена на рис. 1.

Таблица 2. Режим программирования при использовании флуоресцентного детектора (усиление ФЭУ = 10)

Время, мин	$\lambda_{ex}$ , нм	$\lambda_{em}$ , нм
0.0	260	350
6.3	270	460
10.5	255	410
17.0	290	410
21.7	290	500

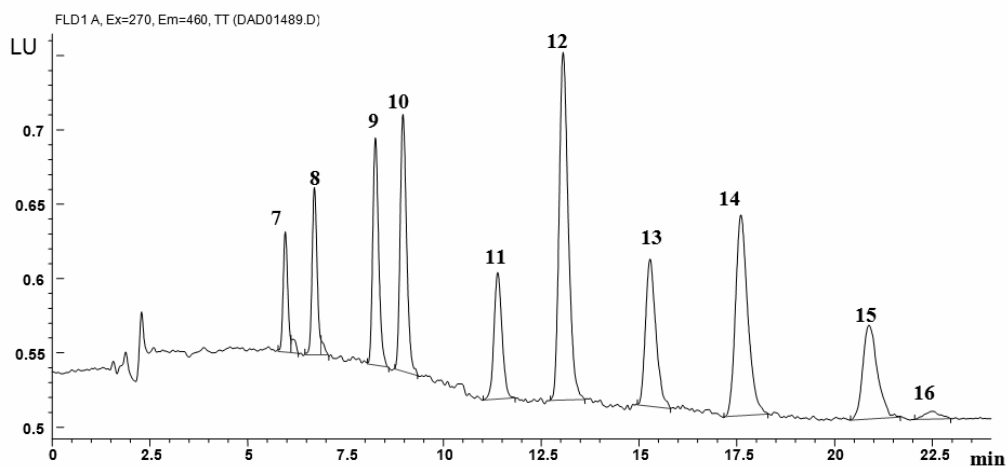


Рис. 1. Хроматограмма стандартной смеси ПАУ (в выбранных условиях детектирования): 7 – флуорантен, 8 - пирен, 9 - бенз(*a*)антрацен, 10 - хризен, 11 - бенз(*b*)флуорантен, 12 - бенз(*k*)флуорантен, 13 - бенз(*a*)пирен (0.5 нг/мг), 14 - дибенз(*a,h*)антрацен, 15 - бенз(*ghi*)перилен, 16 - индено(*1,2,3-cd*)пирен.

## Результаты и обсуждение

### Влияние материала картриджа на чистоту пробы

Начальный вариант методики включал пропускание образца в гексане через стандартный полипропиленовый картридж, заполненный 1 мл сверхсшитого полистирола Purosep 200. Однако, в этом случае в «холостом опыте» (включает все вышеописанные стадии подготовки пробы, но без образца) на конечной хроматограмме наблюдаются мешающие пики. Возможны две основные причины их появления: недостаточная степень очистки сорбционного материала или низкая устойчивость материала картриджа в используемых в работе растворителях. Чтобы устранить первую причину сорбент Purosep-200 промывали метиленхлоридом в аппарате Сокслета в течение 24 ч. Но, как показали эксперименты, дополнительная очистка сорбента не привела к устранению мешающих пиков. Добиться

практически чистой нулевой линии в «холостом опыте» позволила замена материала картриджа. Вместо стандартного полипропиленового картриджа мы использовали стеклянные шприцы (на 10 мл), в которые последовательно помещали: целлюлозный фильтр, 1 мл сверхсшитого полистирола Purosep 200, целлюлозный фильтр. Вся дальнейшая работа велась с использованием именно таких картриджей.

### Влияние состава и объема элюирующей смеси на степень извлечения ПАУ

Для оптимизации процедуры ТФЭ на стадии десорбции ПАУ варьировали объем и состав элюирующей смеси, контролируя степени извлечения ПАУ из растительного масла. Определение степеней извлечения производилось методом добавки: стандартный раствор ПАУ, разбавленный до необходимого уровня гексаном, добавлялся непосредственно в образец масла.

Как видно из табл. 3, увеличение объема элюирующей смеси с двух до трех миллилитров дает существенное повышение степеней извлечения. Дальнейшее незначительное улучшение степеней извлечения наблюдается при замене чистого дихлорметана на смесь дихлорметан-метанол 95:5, что может объясняться вкладом остаточных полярных групп (в том числе остаточного катализатора) в структуре сорбента в удерживание ПАУ. Однако, уже для смеси дихлорметан-метанол 90:10 степени извлечения ПАУ оказываются ниже, чем для чистого дихлорметана, что находится в полном согласии с моделью удерживания ПАУ за счет  $\pi$ -взаимодействий: в этом случае дихлорметан обладает значительно большей элюирующей силой, чем метанол [6].

В дальнейшем во всех экспериментах ПАУ элюировали с картриджа 3 мл чистого дихлорметана, который обеспечивает практически для всех ПАУ степень извлечения более 90% (кроме IP – 80%).

Таблица 3. Зависимость степени извлечения ПАУ из образцов растительного масла от состава и объема элюирующей смеси. Значения степеней извлечения точно не определены в двух случаях для хризена и в одном случае для бенз(*a*)пирена из-за наложения мешающих пиков матрицы.

Вещество	Степень извлечения, %				
	Объем элюирующей смеси, мл				
	2		3		
	Содержание метанола в элюирующей смеси, %				
	0	5	10	0	5
Флуорантен	104	102	102	104	103
Пирен	100	101	100	102	103
Бенз( <i>a</i> )антрацен	72	97	90	95	100
Хризен	-	93	84	-	100
Бенз( <i>b</i> )флуорантен	68	87	78	94	94
Бенз( <i>k</i> )флуорантен	59	87	79	94	97
Бенз( <i>a</i> )пирен	-	87	79	94	94
Дибенз( <i>a,h</i> )антрацен	57	76	78	93	95
Бензо( <i>ghi</i> )пирен	58	73	71	92	90
Индено( <i>123cd</i> )пирен	48	72	70	79	88

### Анализ образцов растительного масла

Для этого исследования был взят образец растительного (подсолнечного) масла. Подготовка пробы осуществлялась так, как описано в пункте 2.3. На рис. 2 приведена хроматограмма исходного масла, на рис. 3 – хроматограмма масла с добавленными ПАУ на уровне 0.5 нг/мл по бенз(*a*)пирену.

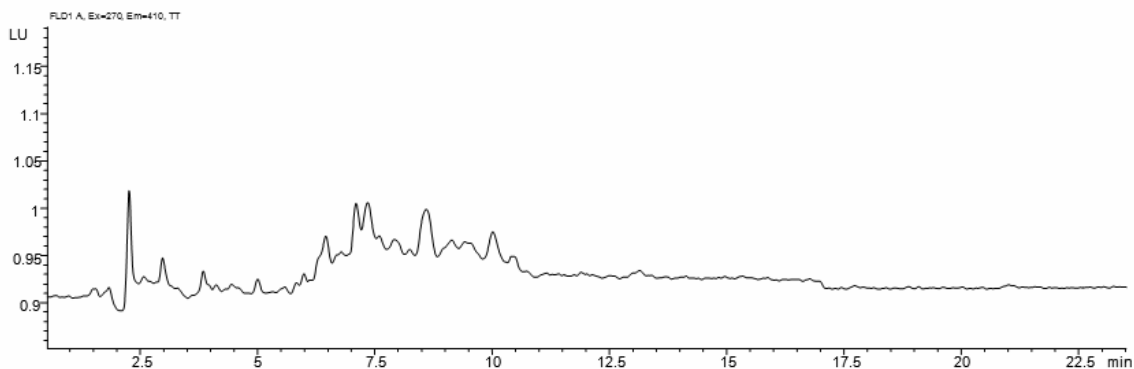


Рис. 2. Хроматограмма образца подсолнечного масла без добавления стандартов ПАУ

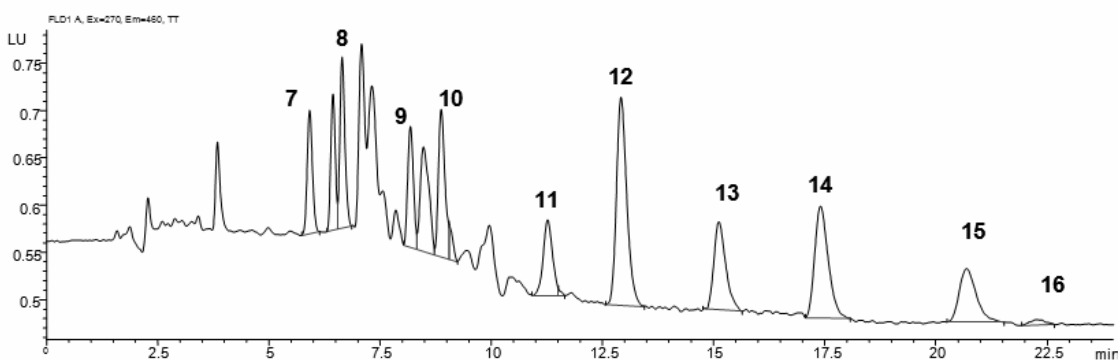


Рис. 3. Хроматограмма образца подсолнечного масла с добавлением стандартов ПАУ до уровня 0.5 нг/мл по бенз(*a*)пирену (13)

В исходном масле соединения 7-16 (см. табл. 1) найдены не были. Однако на хроматограмме масла в области элюирования соединений 7-11 присутствуют мешающие пики, которые, возможно, соответствуют подобным ПАУ соединениям. Следует отметить, что мешающие пики могут привести к ошибке определения ПАУ при их концентрации в масле ниже 0.3 нг/мл. Результаты по определению степеней извлечения ПАУ из масла приведены в табл. 3 (см. пункт 3.2.)

### Анализ образцов копченой рыбы

Для этого исследования был взят образец консервов копченых шпрот. В навеску измельченной рыбы добавляли стандартный раствор ПАУ до концентрации 0.5 нг/мл по бенз(*a*)пирену. Навеску с добавкой стандартов обрабатывали гексаном и проводили твердофазную экстракцию ПАУ из гексановой вытяжки так, как описано в пункте 2.4. На рис. 4 показана хроматограмма экстракта рыбы без добавления ПАУ, на рис. 5 – с добавлением ПАУ.

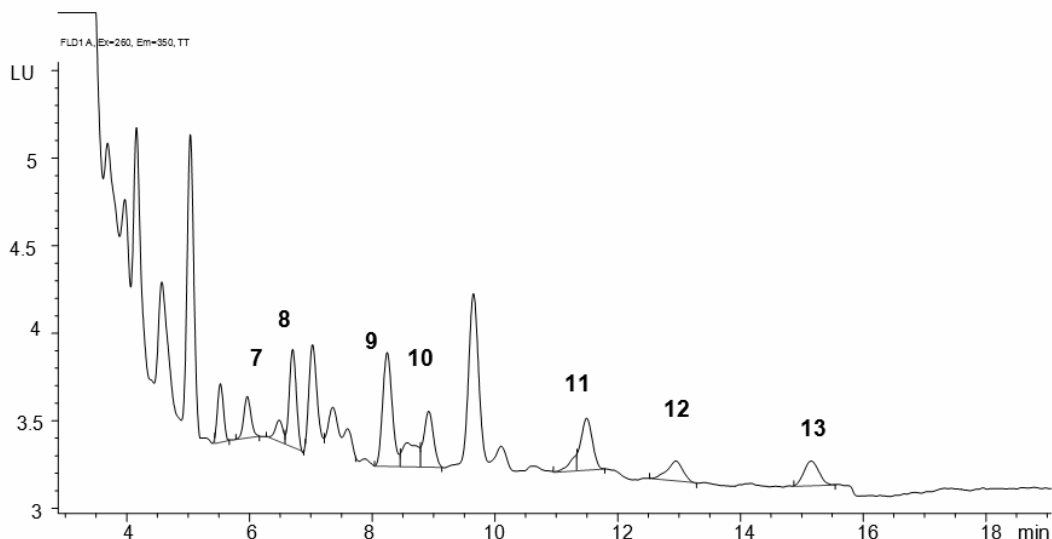


Рис. 4. Хроматограмма образца шпрот без добавления стандартов; содержание бенз(*a*)пирена (13) на уровне 0.3 мкг/кг

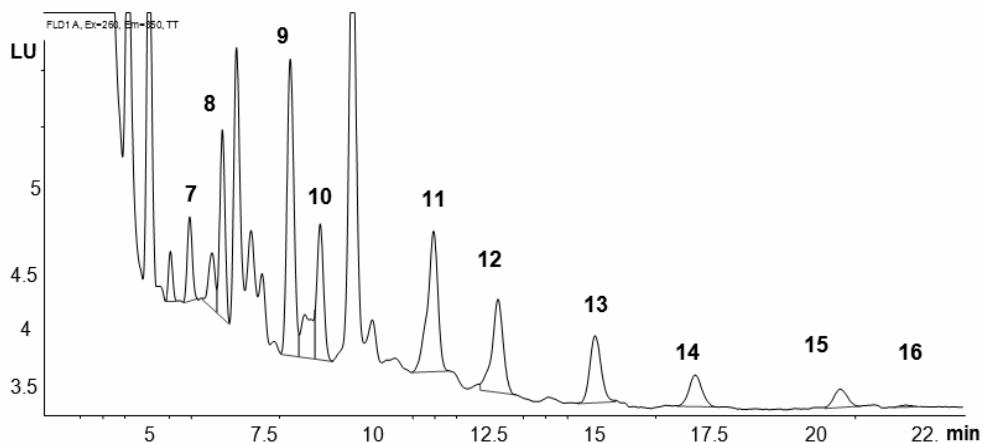


Рис. 5. Хроматограмма образца шпрот с добавлением стандартов на уровне 0.5 мкг/кг по бенз(*a*)пирену (13)

В исходном образце копченой рыбы обнаружен ряд ПАУ (7-13). Концентрация бенз(*a*)пирена в нем составляет около 0.3 мкг/кг, т. е. на уровне 30 % от ПДК.

Таблица 4. Степени извлечения ПАУ из образца копченой рыбы

Вещество	Степень извлечения, %
Флуорантен	-
Пирен	-
Бенз( <i>a</i> )антрацен	89,3
Хризен	-
Бенз( <i>b</i> )флуорантен	-
Бенз( <i>k</i> )флуорантен	95,4
Бенз( <i>a</i> )пирен	77,2
Дибенз( <i>a,h</i> )антрацен	64,3
Бенз( <i>ghi</i> )перилен	59,1
Индено(123 <i>cd</i> )пирен	~50



Результаты по определению степеней извлечения ПАУ из образца копченой рыбы приведены в табл. 4. Значения для четырех соединений (7, 8, 10, 11) не были определены с необходимой точностью по причине наложения мешающих пиков. Для бенз(*a*)антрацена и бенз(*k*)флуорантена извлечение близко к количественному, однако, начиная с бенз(*a*)пирена, степени извлечения начинают уменьшаться, достигая 50% для индено(*123cd*)пирена. Предположительно, подобное уменьшение степени извлечения может объясняться связыванием ПАУ с компонентами сложной матрицы, что затрудняет их переход в жидкую фазу на стадии экстракции навески гексаном.

### Заключение

В работе показана принципиальная возможность селективного выделения полиароматических углеводородов из растворенных в гексане масел, жиров и жиродержащих продуктов питания с помощью ТФЭ на сверхсшитом полистирольном адсорбенте. ПАУ прочно адсорбируются на счет  $\pi$ -взаимодействий с сорбентом, тогда как триглицериды вымываются гексаном. Разработанная в работе оригинальная процедура твердофазной экстракции позволяет уйти от стадии гидролиза жиров в образце, что приводит к значительному ускорению анализа и существенной экономии химических реагентов. Извлечение десяти тетра-, пента- и гексациклических ПАУ является практически количественным из образцов растительного масла, и изменяется от 0.5 до 0.95 для образцов копченой рыбы.

### Список литературы

1. A. Barranco, R. M. Alonso-Salces, A. Bakkali, L. A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, M. Serobe. Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. *J. Chromatography A*, 2003, V. 988, P. 33-40.
2. Sabrina Moret, Lanfranco S. Conte. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. *J. Chromatography A*, 2000, V.882, P. 245-253.
3. Сычев К.С., Даванков В.А. Материалы и методы пробоподготовки в хроматографии: твердофазное концентрирование и адсорбционная очистка / Сорбционные и хроматографические процессы. 2004. Т.4. Вып.1. Стр. 5-28.
4. Sychov C.S., Ilyin M.M., Davankov V.A., Sochilina K.O. Elucidation of retention mechanisms on hypercrosslinked polystyrene used as column packing material for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography A*, 2004, V.1030, P. 17-24.
5. М.Р. Tsyurupa, V.A. Davankov. Porous structure of hypercrosslinked polystyrene: State-of-the-art mini-review. *Reactive & Functional Polimers*, 2006, V. 66, P. 768-779.
6. Сычев К.С. Применение сверхсшитого полистирола в высокоэффективной жидкостной хроматографии и твердофазной экстракции /Диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата химических наук, Москва-2004.

**Проскурина Наталья Александровна** – аспирантка, инженер-исследователь лаборатории стереохимии сорбционных процессов, Москва, Россия, тел.: (495)135-93-75

**Даванков Вадим Александрович** – д.х.н., заведующий лабораторией стереохимии сорбционных процессов, г. Москва, Россия, тел.: (495)135-64-71

**Ильин Михаил Михайлович** - к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории стереохимии сорбционных процессов, г. Москва, Россия, тел.: (495)135-93-75

**Ильин Михаил Михайлович** - к.х.н., мл. научный сотрудник лаборатории стереохимии сорбционных процессов, г. Москва, Россия, тел.: (495)135-93-75

**Сычев Константин Сергеевич** - к.х.н., руководитель направления "Хроматография и элементный анализ", ЗАО Найтек Инструментс, г. Москва, Россия, тел.: (495) 661 06 81

**Proskurina Natalia Al.** –post-graduate student, Laboratory of Stereochemistry of Sorption Processes, A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: [proskurina\\_2005@mail.ru](mailto:proskurina_2005@mail.ru)

**Davankov Vadim Al.** – Prof., Header of Laboratory of Stereochemistry of Sorption Processes, A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: [davank@ineos.ac.ru](mailto:davank@ineos.ac.ru)

**Ilyin Mikhail M.** - PhD, senior researcher, Laboratory of Stereochemistry of Sorption Processes, A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: [kotosok@yandex.ru](mailto:kotosok@yandex.ru)

**Ilyin Mikhail M.** - PhD, junior researcher, Laboratory of Stereochemistry of Sorption Processes, A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: [kotosok@yandex.ru](mailto:kotosok@yandex.ru)

**Sychov Konstantin S.** – PhD, Header of Chromatography and Element Analysis Department, Nytek Instruments, Moscow, Russia, e-mail: [www.nytek.ru](http://www.nytek.ru)