



LATVIJAS LAUKSAIMNIECĪBAS UNIVERSITĀTE  
LATVIA UNIVERSITY OF AGRICULTURE

**Pārtikas tehnoloģijas fakultāte**  
**Faculty of Food technology**

**POLICIKLISKO AROMĀTISKO OGĻŪDENRAŽU  
SATURS PĀRTIKAS PRODUKTOS UN TĀ IZMAIŅA  
RAŽOŠANAS TEHNOLOĢIJU IETEKMĒ**

**CONTENT OF POLYCYCLIC AROMATIC  
HYDROCARBONS IN FOOD PRODUCTS AND ITS  
CHANGES BY IMPACT OF PRODUCTION  
TECHNOLOGIES**

Mg.chem.  
**Ilze Stumpe-Viksna**

**Promocijas darba kopsavilkums inženierzinātņu doktora zinātniskā grāda  
iegūšanai pārtikas zinātnē**

**Summary of doctoral thesis for acquiring the Doctor's degree of  
Engineering Sciences in sector of Food Sciences**

Jelgava, 2009

Promocijas darba zinātniskais vadītājs / Scientific advisor:

**Dr.chem.**, asociētais profesors **Andris Morozovs**

Oficiālie recenzenti / Official reviewers:

**Dr.sc.ing.**, profesore **Daina Kārkliņa** – Latvijas Lauksaimniecības universitāte/ Latvia University of Agriculture.

**Dr.habil.chem.**, profesors **Valdis Kampars** – Rīgas Tehniskā universitāte / Riga Technical University.

**Dr.chem. Dace Šantare** – Pārtikas un veterinārā dienesta Pārtikas centrs / Food and Veterinary Service Food Centre

Promocijas darba izstrāde līdzfinansēta no Eiropas Savienības Sociālā fonda  
Doctoral thesis has been worked out by financial support of ESF.



Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2009. gada 27. augustā plkst. 13:00 LLU Pārtikas zinātnes promocijas padomes atklātajā sēdē Jelgavā, Lielajā ielā 2, Pārtikas tehnoloģijas fakultātē, 145. auditorijā.

The defence of the Doctoral thesis in an open session of the Promotion Council of Food Science of Latvia University of Agriculture will be held on 27th of August, 2009, at 13:00 in auditorium 145, Latvia University of Agriculture, 2 Liela street, Jelgava.

Ar promocijas darbu var iepazīties LLU fundamentālajā bibliotēkā, Lielā ielā 2, Jelgava, LV-3001 un <http://llu.fb.lv/llu-theses.htm>.

Atsauksmes sūtīt promocijas padomes sekretārei Dr. phys. L. Markevičai LLU, Pārtikas tehnoloģijas fakultāte, Lielā ielā 2, Jelgava, LV-3001 vai [part@llu.lv](mailto:part@llu.lv).

The thesis is available at Fundamental Library of the Latvia University of Agriculture, Liela Street 2, Jelgava and <http://llu.fb.lv/llu-theses.htm>.

References are welcome to Dr. phys. L. Markevica, the Secretary of the Promotion Board LUA, Faculty of Food Technology, Liela Street 2, Jelgava, LV-3001, Latvia, [part@llu.lv](mailto:part@llu.lv).

## SATURS

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE                                                  | 4  |
| ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA                                           | 5  |
| MATERIĀLI UN METODES                                                  | 7  |
| REZULTĀTI UN DISKUSIJA                                                | 9  |
| Analītiskās metodes izstrāde un validācija                            | 9  |
| Policiklisko aromātisko ogļūdeņražu saturs pārtikas produktos         | 15 |
| Pētījumi par piemērotu marķieri PAO satura noteikšanai                | 20 |
| Dažādu faktoru ietekme uz PAO saturu pārtikas produktos               | 22 |
| SECINĀJUMI                                                            | 33 |
| IETEIKUMI RAŽOTĀJIEM                                                  | 34 |
| TOPICALITY OF THE RESEARCH                                            | 35 |
| APPROBATION OF THE RESEARCH WORK                                      | 37 |
| MATERIALS AND METHODS                                                 | 37 |
| RESULTS AND DISCUSSION                                                | 39 |
| Development of analytical method and validation                       | 39 |
| Content of polycyclic aromatic hydrocarbons in food products          | 43 |
| Investigations on appropriate marker for determination of PAH content | 45 |
| Influence of different factors on content of PAH                      | 46 |
| CONCLUSIONS                                                           | 52 |
| RECOMMENDATIONS FOR MANUFACTURERS                                     | 53 |

## PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE

Pēdējos gados patērētāji pievērš sevišķu uzmanību pārtikas drošībai un tiek uzstādītas augstākas standartprasības. Policikliskie aromātiskie ogļūdeņraži (PAO) ir viena no lielākajām organisko savienojumu klasēm, kam piemīt kancerogēna aktivitāte. Balstoties uz to kancerogēnajām un mutagēnajām īpašībām jau 80-tajos gados tie iekļauti Eiropas Savienības un Apkārtējās Vides Aizsardzības Aģentūras (EPA) prioritāro piesārņotāju sarakstā. PAO ir atrasti ūdenī, gaisā, augsnē, kā arī dažādā pārtikā, to skaitā ir tauki, eļļa, kūpināti/cepti produkti, augi, jūras produkti, kūpināšanas šķīdumi, kafija, tēja, alkoholiskie dzērieni. To izcelsmes avoti ir dažādi, piemēram, tabakas dūmi, izplūdes gāzes, naftas produkti, akmeņogles un citas vielas, kas radušās sadegšanas procesos. Pārtikas piesārņošana ar PAO var notikt gan uzņemot tos no apkārtējās vides, gan arī pārtikas apstrādes procesu laikā, piemēram, karsēšana, grilēšana, kūpināšana, žāvēšana u.c.. PAO veidošanās ir atkarīga no daudziem pārtikas produktu apstrādes parametriem: laika, kurināmā, attāluma no karstuma avota, horizontāla vai vertikāla novietojuma, tipa (grilēšana, fritēšana, cepšana), un pielietotās tehnoloģijas. Šo vielu daudzums var atšķirties pat vairāk kā desmitkārt. Būtiski pārtikas piesārņojuma avoti ir arī ar PAO piesārņotas pārtikas piedevas un PAO migrācija no iepakojuma.

Ir zināms, ka, izmantojot tradicionālo kūpināšanu uz produkta virsmas notiek dūmos sastopamo PAO kondensācija un PAO saturošo dūmu cieto daļiņu adsorbēcija, kam seko PAO difūzija produkta iekšienē. Saistītais PAO saturs kūpinātos produktos atkarīgs no daudziem kūpināšanas procesa faktoriem, ietverot kūpināšanas krāsns vai ģenerators tipu, sadegšanas temperatūru, kūpināšanas pakāpi, u.c.

Lai vienkāršotu problēmas, kas saistītas ar PAO daudzveidību un satura dažādību, benzo(a)pirēns (BaP) tika akceptēts, kā indikators, lai noteiktu PAO klātbūtni pārtikas produktos, neskatoties uz faktu, ka tas sastāda tikai 1-20% no kancerogēnajiem PAO. Vācijā pieņemta maksimāli pieļaujamā BaP koncentrācija  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  jau kopš 1973. gada. Vēlāk arī Austrija, Čehija, Šveice, Itālija un Slovākija adaptēja šo pašu maksimāli pieļaujamo koncentrāciju. Lai aizsargātu sabiedrības veselību, arī Eiropas Savienībā kopš 2005. gada vairākiem pārtikas produktiem ieviestas maksimāli pieļaujamās BaP koncentrācijas.

Viens no svarīgākajiem kontroles efektivitātes priekšnosacījumiem ir precīzu, ātru un jutīgu analīzes metožu izmantošana. Tradicionālās paraugu sagatavošanas metodes PAO noteikšanai ir sarežģītas un laikietilpīgas. Tās parasti ietver ekstrakciju, kam seko viena vai vairākas attīrīšanas procedūras, tādēļ ir svarīgi atrast optimālu paraugu sagatavošanas metodi, kā arī analītiskās noteikšanas metodi, ko varētu izmantot rutīnas analīzēs.

Apkopojot literatūrā esošos datus izvirzīts **promocijas darba mērķis** pētīt PAO saturu Latvijas tirgū sastopamajās eļļās, kūpinātos gaļas un zivju produktos un novērtēt dažādu tehnoloģisko parametru ietekmi uz PAO saturu.

### **Pētījuma uzdevumi:**

- 1) izstrādāt efektīvu PAO saturu, kā arī rutīno analīžu metodi benzo(a)pirēna satura noteikšanai pārtikas produktos;
- 2) validēt PAO analīzes metodes eļļu, zivju un gaļas matricām;
- 3) iegūt informāciju par PAO saturu eļļās, kūpinātā gaļā un zivīs un to produktos Latvijā;
- 4) izvērtēt dažādu parametru ietekmi uz PAO saturu;
- 5) pārbaudīt PAO satura samazināšanas iespējas eļļās, kūpinātā gaļā un zivīs.

### **Promocijas darba novitātes:**

- pārbaudīts piesārņojums ar PAO Latvijas tirgū sastopamajās eļļās, kūpinātos zivju un gaļas produktos;
- pētīta kurināmā ietekme uz PAO saturu kūpinātā gaļā;
- izstrādāta augsti efektīvās šķidruma hromatogrāfijas - trīskārša kvadrupola masspektrometrijas metode benzo(a)pirēna satura noteikšanai pārtikas produktos;
- pētīta UV starojuma ietekme uz PAO saturu kūpinātās zivīs;
- izvērtēta krāsns tipa un zivju izvietojuma kūpināšanas kamerā ietekme uz PAO saturu kūpinātās zivīs;
- noteikta PAO difūzijas eļļā ietekme uz kancerogēno vielu saturu gala produktā.

**Darba zinātniskais nozīmīgums** – izstrādātas PAO, kā arī BaP satura noteikšanas metodes pārtikas produktos. Atbilstoši Eiropas Komisijas rekomendācijai (Eiropas Komisija, 2005), veikts monitorings par PAO saturu pārtikas produktos. Pētītas PAO satura izmaiņas vairāku faktoru ietekmē.

**Darba tautsaimnieciskā nozīme** – izmantojot PAO satura analīzes metodes var novērtēt kaitīgo vielu saturu pārtikas produktos, bet izmantojot attīrīšanas posmus eļļas ražošanā vai izvērtējot tehnoloģisko parametru ietekmi uz PAO saturu kūpinātos produktos, iespējams samazināt PAO koncentrācijas šajos produktos.

Pētījumi par dažādu tehnoloģisko faktoru ietekmi uz PAO saturu pārtikas produktos ļauj apzināt risku cilvēka veselībai, kā arī izstrādāt rekomendācijas PAO samazināšanai produkcijā.

## **ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA**

**Par darba rezultātiem ziņots** 10 Latvijas un starptautiskajās zinātniski praktiskajās konferencēs un kongresos Latvijā, Čehijā, Francijā, Bulgārijā un Krievijā.

1. Kukāre A., Bartkevičs V., Vīksna A., Stumpe-Vīksna I. (2008) Optimāla modeļa izveide policiklisko aromātisko ogļūdeņražu satura noteikšanai pārtikas produktos. LU 66. konference, 2008. gada 8. februārī, Rīga, Latvija (referāts / oral presentation).

2. Stumpe-Vīksna I., Kukāre A., Bartkevičs V. (2007) Dažādu tehnoloģisko procesu ietekme uz policiklisko aromātisko ogļūdeņražu saturu desās (Impact of different technological processes on polycyclic aromatic hydrocarbon content in sausages). Rīgas Tehniskās universitātes 48. Starptautiskā zinātniskā konference, Rīga, 2007. gada 11-13. oktobris (stenda referāts / poster presentation).
3. Stumpe-Vīksna I., Morozovs A. (2007) Influence of package on content of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil. Четвертая международная научно-практическая конференция „Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности”, Санкт-Петербург, 2-5 октябрь, 2007г. ( piedalīšanās ar zinātnisku rakstu / participation with paper).
4. Kukāre A., Bartkevičs V., Stumpe-Vīksna I., Jākobsone I. (2007) Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with diferent types of wood. Conference „Euro Food Chem XIV”, France. Paris. 29-31 August, 2007 (stenda referāts / poster presentation).
5. Stumpe-Vīksna I., Bartkevičs V., Kukāre A., Morozovs A. (2007) Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products. International Scientific Conference „Research for rural development”, LLU, 16-18 May, 2007, Jelgava, Latvia (referāts / oral presentation).
6. Jākobsone I., Kukāre A., Bartkevičs V., Stumpe-Vīksna I. (2006) Impact of different technological processes on content of polycyclic aromatic hydrocarbons in food products. 3rd Central European Congress on Food, 22-24.05.2006, Sofia, Bulgaria (stenda referāts / poster presentation).
7. Stumpe-Vīksna I. (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbons in food products. International Scientific Conference „Research for rural development”, LLU, 7-20 May, 2006, Jelgava, Latvia (referāts / oral presentation).
8. Stumpe-Vīksna I., Kukāre A., Cepurnieks G., Bartkevičs V. (2005) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in oils and smoked fish by massspectrometric methods. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, 2-4 November, 2005, Prague, Czech Republic (stenda referāts / poster presentation).
9. Stumpe-Vīksna I., Kukāre A., Bartkevičs V., Strēle M., Seržāne R., Morozovs A., Jure M. (2005) Policiklisko aromātisko ogļūdeņražu satura izmaiņas pārtikas produktos dažādu tehnoloģisko procesu ietekmē (Changes of content of polycyclic aromatic hydrocarbons in food products by impact of different technological processes) Rīgas Tehniskās universitātes 46. Starptautiskā zinātniskā konference, Rīga, 2005. gada 13-15. oktobris (stenda referāts / poster presentation).
10. Stumpe I. (2004) Policiklisko aromātisko ogļūdeņražu noteikšanas metodes un sastopamība pārtikā (Determination Methods and Occurence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food). Starptautiskā zinātniski-praktiskā konference “Pārtikas produktu inovatīvās attīstības tendences” Jelgava, LLU, 12.05.2004 (referāts / oral presentation).

**Pētījuma rezultāti apkopoti un publicēti** vispāratzītos recenzējamajos zinātniskajos izdevumos latviešu un angļu valodās, no tiem 8 starptautiskajos ārvalstu un Latvijas Zinātnes Padomes atzītos zinātniskajos izdevumos.

1. Stumpe-Vīksna I., Bartkevičs V., Kukāre A., Morozovs A. (2008) Policiklisko aromātisko ogļūdeņražu saturs eļļās. *LLU raksti*, Nr. 21 (315), 30-41 lpp.
2. Stumpe-Vīksna I., Bartkevičs V., Kukāre A., Morozovs A. (2008) Levels of benzo(a)pyrene (BaP) in fish, smoked according to different procedures. *LLU raksti*, Nr. 21 (315), 24-29 lpp.
3. Stumpe-Vīksna I., Bartkevičs V., Kukāre A., Morozovs A. (2008) Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with different types of wood. *Food Chemistry*, Vol. 110, pp. 794-797.
4. Stumpe-Vīksna I., Bartkevičs V., Kukāre A. (2008) Dažādu tehnoloģisko procesu ietekme uz policiklisko aromātisko ogļūdeņražu saturu desās. *RTU zinātniskie raksti Materiālzinātne un lietišķā ķīmija*, 16. sējums, 113-119 lpp.
5. Stumpe-Vīksna I., Bartkevičs V., Kukāre A., Morozovs A. (2007) Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products. *International Scientific Conference Proceedings Research for rural development*, LLU, Jelgava, Latvia, pp. 79-86.
6. Stumpe-Vīksna I., Morozovs A. (2007) Influence of package on content of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil. *Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования, образование*, том 11, Санкт-Петербург, Издательство Политехнического университета, с.231-235.
7. Stumpe-Vīksna I., Kukāre A., Bartkevičs V. (2007) Policiklisko aromātisko ogļūdeņražu noteikšana pārtikas produktos ar masspektrometrijas metodēm. *Latvijas Ķīmijas žurnāls*, Nr.2, 138-146 lpp.
8. Stumpe-Vīksna I., Kukāre A., Bartkevičs V., Strēle M., Seržāne R., Morozovs A., Jure M. (2005) Policiklisko aromātisko ogļūdeņražu satura izmaiņas pārtikas produktos dažādu tehnoloģisko procesu ietekmē. *RTU zinātniskie raksti Materiālzinātne un lietišķā ķīmija*, 10 sējums, 127-132 lpp.
9. Stumpe I. (2004) Determination Methods and Occurrence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. *Starptautiskā zinātniski-praktiskā konference "Pārtikas produktu inovatīvās attīstības tendences"*. Referāti, Jelgava, 151-156 lpp.

## MATERIĀLI UN METODES

Pētījumi veikti laikā no 2004. līdz 2007. gadam. Analīzes veiktas Pārtikas un veterinārā dienesta Nacionālā diagnostikas centra Pārtikas un vides izmeklējumu laboratorijā.

### **PAO satura noteikšanas eksperimentos izmantotās izejvielas**

- Latvijā tirdzniecībā sastopamas eļļas, kas ražotas dažādās valstīs: rafinētas un nerafinētas saulespuķu eļļas („Brölio” – ražota Vācijā; „Saulīte” – ražota Lietuvā; „Dikaŋka” – ražota Ukrainā; „Natural” – ražota Argentīnā), rapšu eļļas („Risso” – ražota Beļģijā; „Floriol” – ražota Polijā; „Iecavas”, „Vidzemes”, „Ideal” – ražotas Latvijā), olīvu eļļas („Dolores”, „Olitalia” – ražotas Itālijā), linsēkļu („Latgales”, „Iecavas”, „Iecavnieks” – ražotas Latvijā), kukurūzas („Risso” – ražota Beļģijā), sojas („Brölio” – ražota Vācijā), kaņepju eļļa („Iecavas” – ražota Latvijā), zemesriekstu eļļa – ražota Anglijā, ķimeņu eļļa – ražota Latvijā, ķirbju eļļa „Gloria” – ražota „Schell GmbH” Vācijā.
- Tirgū iegādātas kūpinātas zivis (karsti kūpināts līnis, skumbrija, brētliņas, reņģes, asaris, auksti kūpināta skumbrija) un Latvijā ražoti kūpinātu zivju konservi (Šprotes eļļā, Šprotu pastēte, Zivju tefteli tomātu mērcē, Reņģes tomātu mērcē, Šprotes tomātu mērcē, Reņģes eļļā).
- Latvijā ražota kūpināta cūkgaļa un kūpināta vistas gaļa, kas iegādāta tirgū.

**Pētījumā par PAO saturu rafinētās un nerafinētās eļļās** izmantotā rapšu eļļa un sēklas iegūtas no eļļu ražotājiem Latvijā. Pētījumā par iepakojuma ietekmi uz PAO saturu eļļās izmantota tirgū iegādāta saulespuķu eļļa.

**Eksperimentos par PAO saturu kūpinātā gaļā atkarībā no izmantotā kurināmā** tika izmantota cūkgaļa, kas iegādāta tirgū. Kā kurināmais izmantota svaigi cirsta alkšņa, ābeles, egles, lazdas, kļavas, apses, pīlādža, ievas, plūmes malka), kadiķa zariņi un Dr. Millera kokogles (ražotas SIA „Kamene”).

**Pētījumā par benzo(a)pirēna saturu zivīs, kūpinot dažādos apstākļos** izmantotas svaigas, atvēsinātas vai saldētas Baltijas jūras vai Rīgas jūras līča brētliņas.

### **Eļļas attīrīšana ar aktivēto ogli**

100 ml saulespuķu eļļas pievienoja attiecīgi 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 vai 1.5 g aktivētās ogles, maisīja 30 min istabas temperatūrā, filtrēja un analizēja kā aprakstīts paraugu sagatavošanā.

### **PAO samazināšana kūpinātās zivīs, apstarojot ar UV**

Zivis tika ievietotas UV kamerā (DRT 400, 400W) un apstarotas pie 254 nm (30 cm attālumā no UV avota) 0-15 min. BaP standartšķīdums ar koncentrāciju  $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  tika uzests uz Petri trauciņa un ievietots UV kamerā un apstarots 0- 30 min.

### **Zivju kūpināšanā izmantotās krāsns un vispārīgs kūpināšanas apraksts**

Zivju kūpināšana veikta sadarbībā ar Latvijas zivju pārstrādes uzņēmumiem. Šajā pētījumā *izmantotas 5 dažādas kūpināšanas krāsns:*

- krāsns ar div-tuneļu konveijera tipa kūpināšanas kamerām ar dūmu ģeneratoru, ražota AS Miiduranna Texas, Igaunija;

- krāsns ar div-tuneļu konveijera tipa kūpināšanas kamerām ar dūmu ģeneratoru, ražota SIA Peruza, Latvija;
- Kverner-Bruk krāsns ar ventilatoru un dūmu ieplūdes vietu no apakšas;
- Kverner-Bruk krāsns ar tuneļa tipa modificētām kūpināšanas kamerām ar dūmu ģeneratoru;
- elektriskā krāsns ar dūmu ģeneratoru.

Kā kurināmais izmantotas alkšņu koksnes šķeldas. Šķeldu mitruma saturs 35-45 %, dūmu temperatūra 60-80 °C, šķeldu sadegšanas temperatūra uz ārdiem 400-450 °C.

### **Gaļas kūpināšana, izmantojot dažādu kurināmo**

Kūpināšana tika veikta mājās izgatavotā kūpinātavā, kurā tika uzturēta 80 °C temperatūra, izmantojot ventilatoru un temperatūras regulatoru. Gaļas kūpināšanas laiks 5 stundas. Kūpināšanā izmantojām 10 dažādus koku sugu malku un tirdzniecībā sastopamās kokogles.

### **Paraugu pagatavošana**

Paraugi tika homogenizēti un pēc tam hidrolizēti ar kālija hidroksīdu etanola šķīdumā. Tālāk veikta ekstrakcija ar cikloheksānu, kam sekoja šķīduma-šķīduma ekstrakcija ar N,N-dimetilformamīdu un cikloheksānu. Pēc paraugu attīrīšanas uz cietfāzes silikagela kolonnas, paraugus koncentrēja un analizēja. Ar gāzhromatogrāfijas-masspektrometrijas (GH-MS) metodi PAO (pirēns (P), benzo(a)antracēns (BaA), hrizēns (CHR), benzo(b)fluorantēns (BbF), benzo(k)fluorantēns (BkF), benzo(j)fluorantēns (BjF), benzo(a)pirēns (BaP), indeno(1,2,3-c,d)pirēns (IcdP), 5-metilhrizēns (SMC), benzo(g,h,i)perilēns (BghiP), ciklopenta(c,d)pirēns (CPP), dibenzo(a,h)antracēns (DahA), dibenzo(a,l)pirēns (DalP), dibenzo(a,e)pirēns (DaeP), dibenzo(a,i)pirēns (DaiP), dibenzo(a,h)pirēns (DahP)) analizēti, izmantojot firmas *Hewlett Packard 6890* gāzu hromatogrāfu ar *Hewlett Packard* masselektīvo detektoru *HP 5973 N* un automātisku paraugu ievadīšanas iekārtu *HP 7683*. PAO un benzo(a)pirēna šķīduma hromatogrāfiskās noteikšanas analīzes tika veiktas, izmantojot tandēma masspektrometru *QuattroLC* ar atmosfēras spiediena ķīmisko jonizētāju, kas savienots ar AEŠH *Waters Alliance 2690*. (I. Stumpe-Vīksna et al., 2007).

## **REZULTĀTI UN DISKUSIJA**

### **Analītiskās metodes izstrāde un validācija**

Galvenās problēmas, kas saistītas ar PAO noteikšanu pārtikas paraugos ir mazā analizējamā savienojuma koncentrācija un potenciālo klātesošo traucējumu dažādība. Neraugoties uz faktu, ka BaP var izmantot kā marķieri, lai noteiktu kancerogēnos PAO pārtikas produktos, analītiskajām metodēm, ko izmanto

oficiālajā pārtikas kontrolē un monitoringā būtu jāaptver visi 15 ES prioritārie PAO.

Metodes izstrādes mērķis bija ieviest praktisku analītisku metodi, kas būtu 1) specifiska, pareiza, precīza un reproducējama; 2) piemērota dažādu pārtikas produktu matricu analizēšanai; 3) pamatoti ātra un ne pārāk dārga; 4) lai metodes izpildi varētu veikt atbilstoši normatīviem.

### Paraugu sagatavošanas optimizācija

#### Paraugu pagatavošanas paātrinātās metodes izveide kūpinātu zivju analīzei:

Tā kā paraugu sagatavošana PAO satura noteikšanai zivju produkcijā, ir ļoti laikietilpīga, veikti eksperimenti, lai paraugu sagatavošanu paātrinātu, neizmantojot tauku pārziemošanu ar sārmu, kas ļautu ietaupīt laiku un izmantoto reaģentu daudzumu.

Neizmantojot šo paraugu sagatavošanas posmu, metodes parametru pārbaudes rezultāti liecina, ka paātrinātā metode ir piemērota PAO satura noteikšanai. Analizējot 6 paraugus, izstrādātās metodes atkārtojamība PAO noteikšanā bija no 7.0 % līdz 17 %. Turklāt vidējās PAO satura vērtības būtiski neatšķirās no tām, kas iegūtas ar iepriekš izmantoto metodi, kas ietver paraugu pārziemošanu ar sārmu (skat. 1. tab.).

Līdz ar to saīsināto metodi var izmantot PAO noteikšanai zivju produkcijā, jo paraugs tiek pietiekoši efektīvi attīrīts no traucējošām vielām.

1. tabula / Table 1.

#### Metožu salīdzinājums PAO noteikšanai zivju konservos Method comparison for PAH determination in canned fish

| Savienojums /<br>Compound | Noteiktā koncentrācija / Concentration determined, $\mu\text{g kg}^{-1}$ |                                           |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
|                           | Sākotnējā metode /<br>Initial method                                     | Paātrinātā metode / Accelerated<br>method |
| P                         | 245 $\pm$ 40                                                             | 213 $\pm$ 36                              |
| BaA                       | 32 $\pm$ 3                                                               | 28 $\pm$ 4                                |
| CHR                       | 31 $\pm$ 2                                                               | 25 $\pm$ 3                                |
| BbF                       | 4.0 $\pm$ 1.0                                                            | 4.4 $\pm$ 0.8                             |
| BkF                       | 2.5 $\pm$ 0.4                                                            | 2.7 $\pm$ 0.2                             |
| BaP                       | 11.0 $\pm$ 0.8                                                           | 9.4 $\pm$ 0.9                             |
| IcdP                      | 0.9 $\pm$ 0.3                                                            | 1.0 $\pm$ 0.2                             |
| BghiP                     | 1.9 $\pm$ 0.3                                                            | 1.5 $\pm$ 0.1                             |

#### Cietās fāzes ekstrakcijas sorbentu izvēle:

Lai novērtētu dažādu sorbentu piemērotību PAO analīzē, pārbaudīta eļļas sorbcija uz četriem sorbentiem: silikagela, florisila, neitrāla un skāba alumīnija oksīda.

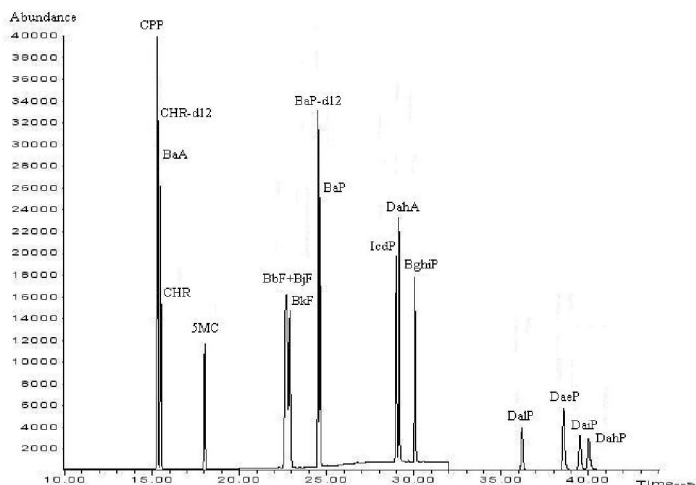
1 g rapšu eļļas, kas izšķīdināts 5 ml cikloheksānā, uznesa uz 2 g sorbenta. Eluējot ar cikloheksānu, tika savāktas 5 frakcijas. Frakcijas ietvaicēja un sauso atlikumu noteica gravimetriski. Vislielākais eļļas daudzums visiem izmantotajiem sorbentiem eluējās pirmajās divās frakcijās. Iegūtie rezultāti uzrādīja, ka vislabākā lipīdu sorbcijas spēja piemīt silikagelam.

Bez tam, lai izvērtētu sorbentu piemērotību PAO analīzei un parauga attīrīšanai no traucējošām vielām, tika pārbaudīta arī PAO sorbcija uz šiem sorbentiem. Standartšķīdumu uznesa uz sorbenta un eluēja ar cikloheksānu un pēc tam ar dihlormetānu. Izmantojot par sorbentu skābu un neitrālu alumīnija oksīdu, PAO eluējās tikai ar dihlormetāna frakciju. Savukārt uz florisila un silikagela PAO sorbcija bija salīdzinoši neliela un tie eluējās jau ar pirmajiem cikloheksāna mililitriem.

Apkopojot šo eksperimentu rezultātus, turpmākiem pētījumiem tika izvēlēts silikagels, kas efektīvi sorbē PAO noteikšanai traucējošās vielas. Alumīnija oksīda un florisila izmantošanu kavē zemā lipīdu sorbcija uz šiem sorbentiem.

### PAO analītiskā atdalīšana un noteikšana, izmantojot GH-MS

Analītiskajā noteikšanā ar GH-MS, izmantotas 2 metodes: 15 ES prioritāro policiklisko aromātisko oglekļaķēžu noteikšanai (izmantota no 2006. gada) un metode US EPA PAO noteikšanai (līdz 2006. gadam).



1. att. PAO standartšķīduma hromatogramma.  
Fig. 1. Chromatogram of PAH standard solution.

Lai sākotnējai metodei uzlabotu precizitāti un kompensētu zudumus paraugu sagatavošanas procesā, PAO noteikšanas metodē tika ieviests iekšējais standarts benzo(a)pirēns- $d_{12}$ .

Tā kā 15 ES prioritāro PAO noteikšanas metodē CPP, CHR, BaA un 5MC novērojām nepietiekamu atgūstamību, tad šo PAO noteikšanai tika ieviests papildus iekšējais standarts hrizēns-d<sub>12</sub>.

### Metožu validācija

Atbilstoši izstrādātajām metodēm veiktas 2 validācijas: US EPA PAO noteikšanai (Metode Nr.1), kā arī 15 ES prioritāro PAO noteikšanai pārtikā (Metode Nr.2).

#### Metodes Nr.1 validācija:

**Metodes selektivitāte** pārbaudīta, analizējot paraugu, kas nesatur PAO. Policiklisko aromātisko ogļūdeņražu hromatogrāfisko smaiļu aiztures laiks nebija matricas sastāvdaļu smailes.

GH-MS noteikšanas metodes **linearitātes pārbaude** veikta, uzņemot hromatogrammas PAO standartšķīdumiem ar koncentrāciju no 0.05 līdz 0.25 µg µl<sup>-1</sup>. Regresijas analīzes dati parāda, ka PAO signālu – koncentrācijas sakarība ir lineāra pārbaudītajā koncentrāciju diapazonā un visu PAO graduēšanas līkņu determinācijas koeficientu R<sup>2</sup> vērtības bija robežās no 0.995 līdz 0.999.

Lai pārbaudītu GH-MS metodes **atkārtojamību**, veikti paralēli mērījumi 6 eļļas un 6 zivju paraugiem, kuriem pievienots noteiktas koncentrācijas iekšējais standarts. Eļļas paraugiem datu variācijas koeficienti bija no 2.7 līdz 8.5 % (skat. 2. tabulu).

2. tabula / Table 2.

#### **Metodes atkārtojamība PAO noteikšanai eļļās un kūpinātās zivīs** **Method precision for determination of PAH in oils and smoked fish**

| Savienojums /<br>Compound | S (%)           |                                     | Savienojums /<br>Compound | S (%)           |                                     |
|---------------------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------------|-----------------|-------------------------------------|
|                           | Eļļas /<br>Oils | Kūpinātās<br>zivis /<br>Smoked fish |                           | Eļļas /<br>Oils | Kūpinātās<br>zivis /<br>Smoked fish |
| P                         | 6.5             | 16                                  | BaP                       | 3.7             | 7.9                                 |
| BaA                       | 2.7             | 8.0                                 | IcdP                      | 4.3             | 35                                  |
| CHR                       | 3.4             | 7.7                                 | BkF                       | 3.4             | 16                                  |
| BbF                       | 4.2             | 31                                  | BghiP                     | 3.8             | 14                                  |

Pārbaudot metodes atkārtojamību zivju produkcijas paraugiem, iegūtie PAO variācijas koeficienti bija no 7.7 līdz 35 %. Kā redzams 2. tabulā, paralēlo mērījumu rezultātu izkliede ir liela, kas izskaidrojams ar to, ka grūti panākt pilnīgu homogenitāti paraugos, kā arī zivis analītiskā ziņā ir daudz sarežģītāka un grūtāk attīrāma matrica nekā eļļa.

Pārbaudot **metodes atgūstamību**, kūpinātu zivju paraugiem ar dažādām PAO koncentrācijām tika pievienota standartpiedeva 5 µg kg<sup>-1</sup>, bet eļļu paraugiem standartpiedeva ar koncentrāciju 2 µg kg<sup>-1</sup>. Iegūtā vidējā benzopirēna atgūstamība eļļu paraugos bija 115 %, savukārt zivju paraugos tā bija 111 %.

**Metodes jutība** pārbaudīta, analizējot PAO paraugu ar standartpiedevu un nosakot signāla un fona (S/N) attiecību. Kvalitatīvās analīzes jutības novērtēšanai izmantota attiecība S/N=3, bet kvantitatīvās analīzes jutības novērtēšanai S/N=10. Informācija par metodes robežkoncentrācijām apkopota 3. tabulā.

3. tabula / Table 3.

**PAO noteikšanas robežas**  
**Detection limits of PAH**

| Savienojums /<br>Compound | Nosakāmās robežkoncentrācijas / Detection limits, $\mu\text{g kg}^{-1}$ |                                                      |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|                           | Kvalitatīvajā analīzē /<br>In qualitative analysis                      | Kvantitatīvajā analīzē / In<br>quantitative analysis |
| BbF                       | 0.02                                                                    | 0.08                                                 |
| BkF                       | 0.02                                                                    | 0.08                                                 |
| BaP                       | 0.05                                                                    | 0.18                                                 |
| IcdP                      | 0.03                                                                    | 0.11                                                 |
| DahA                      | 0.03                                                                    | 0.10                                                 |
| BghiP                     | 0.03                                                                    | 0.09                                                 |

Līdz ar to metode pilnībā apmierina Eiropas Komisijas Regulā (EK Nr. 333/2007) minētās prasības.

Metodes precizitāte olīvu eļļas paraugu analīzē pārbaudīta arī FAPAS salīdzinošajā testēšanā ar 57 citām Eiropas laboratorijām, kur tika analizēti PAO un iegūti veiksmīgi rezultāti, iekļaujoties noteiktajās robežā ( $|z| < 2$ ). Eļļu paraugam BaP, BaA, BbF, BghiP un IcdP z-vērtības, kas izsaka novirzi no visvairāk iespējamā rezultāta, bija starp -1.0 un +1.0. Eļļu paraugiem z-vērtības tika aprēķinātas izmantojot vienādojumu (1):

$$z = \frac{x - X}{\sigma} \quad (1)$$

kur: z – novirze no visvairāk iespējamā rezultāta;  
x – vidējais eksperimentāli iegūtais rezultāts;  
X – noteiktā vērtība (gravimetriski);  
σ – eksperimentālā standartnovirze.

**Metodes Nr.2 validācija:**

**Metodes selektivitāte** pārbaudīta, analizējot paraugu, kas nesatur PAO. Policiklisko aromātisko oglekļa hidrokarbonu hromatogrāfisko smaiļu aiztures laikos nebija matricas sastāvdaļu smailes.

GH-MS noteikšanas metodes **linearitātes pārbaude** veikta, uzņemot hromatogrammas PAO standartšķīdumiem ar koncentrāciju no 0.05 līdz 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Regresijas analīzes dati uzrādīja, ka PAO signālu – koncentrācijas sakarība ir lineāra pārbaudītajā koncentrāciju diapazonā un visu PAO graduēšanas līkņu determinācijas koeficientu  $R^2$  vērtības bija robežās no 0.996 līdz 0.999.

Lai pārbaudītu GH-MS metodes **atkārtojamību**, veikti paralēli mērījumi 6 eļļas un 6 zivju paraugiem, kuriem pievienots noteiktas koncentrācijas iekšējais standarts. Eļļas paraugiem datu standartnovirze bija no 2.3 līdz 7.5%, savukārt zivju paraugos 7.1 līdz 24 %.

Pārbaudot **metodes atgūstamību**, kūpinātas gaļas, zivju un kūpinātu zivju konservu paraugiem ar dažādām PAO koncentrācijām tika pievienota standartpiedeva  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , bet eļļu paraugiem  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Iegūtā vidējā PAO atgūstamība eļļu paraugos bija no 65 % līdz 116 %, savukārt kūpinātas gaļas, zivju un kūpinātu zivju konservu paraugos no 56 % līdz 111 % (skat. 4. tab.). Slikto atgūstamību dibenzopirēniem var izskaidrot ar to, ka benzo(a)pirēns- $\text{d}_{12}$  nav īsti piemērots iekšējais standarts to aprēķināšanā un būtu nepieciešams iekšējais standarts, kas tuvs dibenzopirēniem. Kaut gan kopumā iegūtie metodes kvalitātes parametri atbilst Eiropas Komisijas Regulā (EK Nr. 333/2007) minētajām prasībām.

4. tabula / Table 4.

**Metodes atgūstamība PAO noteikšanai pārtikas produktos**  
**Recovery of method for determination of PAH in food products**

| Savie-<br>nojums /<br>Compound | Vidējā atgūstamība /<br>Average recovery, %           |               | Savie-<br>nojums /<br>Compound | Vidējā atgūstamība /<br>Average recovery, %           |               |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------|
|                                | Gaļa, zivis,<br>konservi / Meat,<br>fish, canned food | Eļļa<br>/ Oil |                                | Gaļa, zivis,<br>konservi / Meat,<br>fish, canned food | Eļļa<br>/ Oil |
| CPP                            | 111                                                   | 116           | IcdP                           | 90                                                    | 95            |
| BaA                            | 99                                                    | 107           | DahA                           | 87                                                    | 98            |
| CHR                            | 97                                                    | 100           | BghiP                          | 94                                                    | 100           |
| 5MC                            | 76                                                    | 84            | DalP                           | 83                                                    | 83            |
| BbF+BjF                        | 99                                                    | 108           | DaeP                           | 79                                                    | 76            |
| BkF                            | 91                                                    | 104           | DaiP                           | 56                                                    | 66            |
| BaP                            | 93                                                    | 101           | DahP                           | 65                                                    | 69            |

Metodes jutība pārbaudīta, analizējot PAO paraugu ar standartpiedevu un nosakot signāla un fona (S/N) attiecību (kvalitatīvai analīzei  $S/N=3$ , bet kvantitatīvai analīzei  $S/N=10$ ). PAO noteikšanas robežkoncentrācijas ES prioritāro PAO kvalitatīvajā analīzē bija no 0.02 līdz 0.08  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , bet kvantitatīvajā analīzē no 0.05 līdz 0.26  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Metodes precizitāte standartšķīdumu un eļļas paraugu analīzē pārbaudīta arī PAO References Laboratoriju Apvienības organizētajā salīdzinošajā testēšanā ar 23 citām Eiropas laboratorijām, kur tika analizēti 15 PAO un iegūti veiksmīgi rezultāti, iekļaujoties noteiktajās robežā ( $z < 2$ ). Iegūtās  $z$ -vērtības eļļas paraugu analīzē, kas izsaka novirzi no visvairāk iespējamā rezultāta, skatīt 5. tabulā.

**Iegūtās z-vērtības eļļas paraugu analizē salīdzinošajā starp-laboratoriju testēšanā / Acquired z-scores in edible oil material in inter-laboratory comparison testing**

| Parameters /<br>Parameter | Savienojumi / Compounds |     |     |      |         |      |     |      |      |       |      |      |      |      |
|---------------------------|-------------------------|-----|-----|------|---------|------|-----|------|------|-------|------|------|------|------|
|                           | CPP                     | BaA | CHR | 5MC  | BbF+BjF | BkF  | BaP | IcdP | DahA | BghiP | DalP | DaeP | DaiP | DahP |
| z-vērtība<br>/ z-score    | -0.3                    | 1.3 | 0.2 | -0.6 | -1.6    | -0.3 | 0.4 | -0.5 | -0.7 | -0.4  | -0.7 | 0.3  | -1.9 | -1.4 |

**Augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas – trīskārša kvadрупola masspektrometrijas (AEŠH-MS-MS) metodes izmantošana PAO noteikšanā**

Veikti eksperimenti, lai izpētītu iespēju izmantot augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas – trīskārša kvadрупola masspektrometrijas metodi benzo(a)pirēna (BaP) noteikšanai pārtikas produktos. Izvēlētajos AEŠH-MS-MS apstākļos un, ar pētījumā izmantoto kolonnu, ieguvām labu BaP noteikšanas selektivitāti.

Lai noteiktu AEŠH-MS-MS metodes rezultātu atkārtojamību un atgūstamību, eļļas paraugiem, kas nesatur PAO, tika pievienots standartšķīdums līdz koncentrācijai  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Relatīvā standartnovirze 6 paraugiem bija 6.7 % un iegūtā atgūstamība 92 %. Minimālā nosakāmā benzo(a)pirēna koncentrācija noteikta, pieņemot attiecību signāls/fons=3. Metodes jutība bija  $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Līdz ar to metodes kvalitātes parametru pārbaudes dati liecina, ka metode ir izmantojama benzo(a)pirēna noteikšanai pārtikas produktos.

Izstrādātā AEŠH-MS-MS metode tika salīdzināta ar GH-MS metodi, analizējot tos pašus eļļas paraugus. Ar abām metodēm iegūtie benzo(a)pirēna satura dati uzrādīja labu korelāciju ( $R^2=0.9991$ ).

Izstrādātās AEŠH-MS-MS analīzes metodes kopējais laiks ir ievērojami īsāks (10 min), nekā izmantojot GH-MS (40 min), kas dod iespēju analizēt lielāku paraugu skaitu.

**Policiklisko aromātisko ogleņdeņražu saturs pārtikas produktos**

Pārtikas produktos PAO sastopami vienmēr kā kompleksi maisījumi. PAO dažādās matricās sastopami dažādās koncentrācijās, bet visbiežāk sastopamie PAO ir CPP, BaP, BaA, CHR un BbF, BkF summa un BjF. Kā arī šie PAO kopumā ir augstākās koncentrācijās.

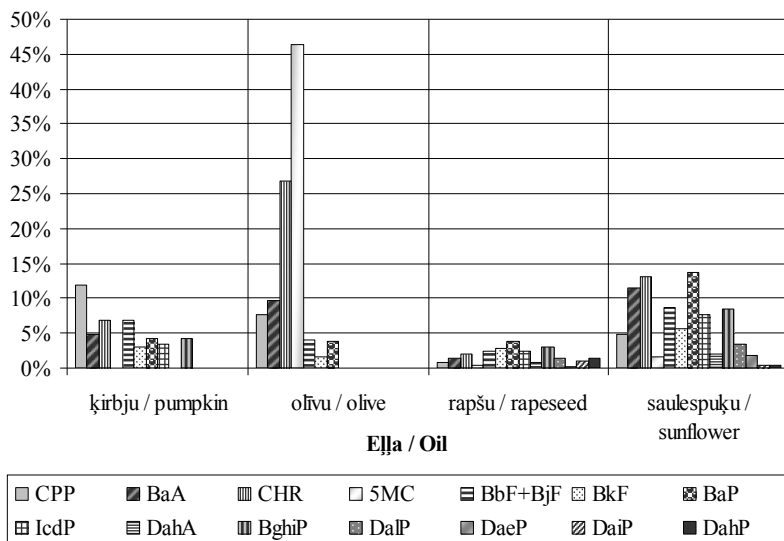
Vislielākās PAO koncentrācijas tika konstatētas kūpinātā vistas gaļā. Citās analizētajās pārtikas grupās PAO koncentrācijas bija zemākas, kaut arī dažkārt

tika pārsniegta Eiropas Savienībā noteiktā maksimāli pieļaujamā BaP koncentrācija.

### PAO saturs Latvijas tirgū pārdodamo eļļu paraugos

Tā kā benzo(a)pirēnu izmanto kā marķieri PAO satura noteikšanai, līdz ar to tas ir visvairāk pētītais savienojums. Arī mēs lielu daļu pētījumu par PAO saturu Latvijas tirgū sastopamajos pārtikas produktos balstījām uz benzo(a)pirēna satura noteikšanu. 2004./2005. gadā izvērtējot Latvijas tirgū pārdodamās eļļas (rapšu, saulespuķu, olīvu, linsēkļu, kukurūzas, sojas, kaņepju, zemesriekstu, ķimeņu), visaugstākās benzo(a)pirēna koncentrācijas novērojām rapšu (maks.  $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), ķimeņu ( $5.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) un saulespuķu (maks.  $5.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) eļļās, savukārt vismazākās BaP koncentrācijas tika atrastas zemesriekstu un kukurūzas eļļās ( $\leq 0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Tomēr kopumā Latvijas tirgū sastopamās eļļas saturēja nelielas benzo(a)pirēna koncentrācijas.

Lai salīdzinātu PAO saturu un individuālo savienojumu attiecības dažādās eļļās, četriem dažādiem (ķirbju, saulespuķu, rapšu, olīvu) eļļu veidiem analizējām Eiropas Komisijas rekomendācijā (Commission Recommendation 2005/108/EC) minētos 15 PAO. Benzo(a)pirēna saturs eļļu paraugos bija sākot no metodes minimāli nosakāmās robežkoncentrācijas ( $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) līdz  $7.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ , bet PAO kopējais saturs no  $0.21$  līdz  $46 \mu\text{g kg}^{-1}$  (skat. 2. att.).



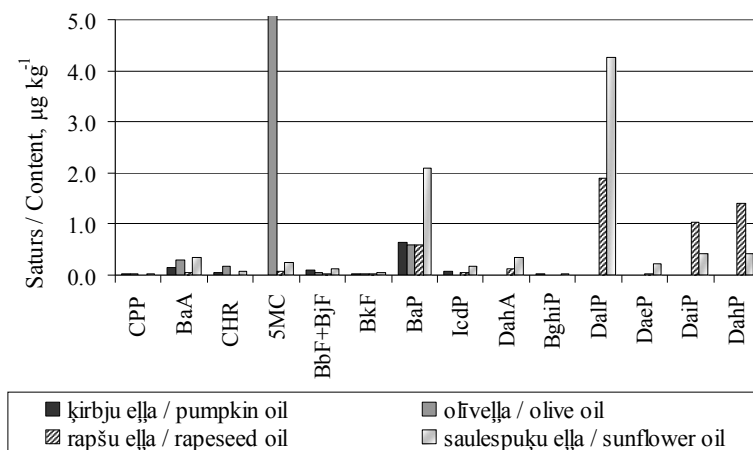
2. att. PAO saturs dažādās augu eļļās, kas normēts pēc olīveļļas kopējā PAO satura.

Fig. 2. Content of PAH in different vegetable oils calculated according to the total content of PAH in olive oil.

Analizētajos rapšu un saulespuķu eļļu paraugos atradām visus analizētos PAO. Kopumā vislielākais BaP saturs analizētajos paraugos bija saulespuķu eļļās, bet vislielākais kopējais PAO saturs analizētajos paraugos bija olīvu eļļai. Saulespuķu tas bija 83.2 %, ķirbju 45.2 % un rapša 24 % no satura olīvu eļļā. Tomēr olīvēļļās galvenokārt sastopami PAO ar mazāku molekulmasu (CPP, BaA, CHR un 5MC), kuri dzīvīem organismiem ir mazāk kaitīgi. Salīdzinot rapšu eļļas šo PAO bija maz, bet toties atradām arī dibenzopirēnus un dibenz(a,h)antracēnu, kas olīvēļļā un ķirbju eļļā netika atrasti (skat. 2. att.). PAO satura salīdzināšanai dažādās eļļās, izmantota normēšana pret lielāko atrasto kopējo PAO saturu olīvu eļļai. Bet kopējā PAO satura novērtēšanai dažādās eļļās normēšanai izmantojām kopējo PAO saturu olīvu eļļā.

Izmantojot toksiskās ekvivalences koeficientus (TEF), mēģinājām objektīvi salīdzināt kopējo PAO daudzumu mūsu analizētajās eļļās un reālo risku uz cilvēku veselību.

Izvērtējot zinātniskajā literatūrā sastopamos datus, secinājām, ka PAO savienojumiem dažādi autori piešķirusi ļoti dažādas TEF. Līdz ar to, apkopojot literatūras datus, izmantojot dažādu autoru publicētās TEF vērtības, izveidojām kopēju vidējo potenciālo TEF skalu. Aprēķinot mūsu analizēto eļļu potenciālo toksiskumu pēc izveidotās TEF skalas, ieguvām, ka vislielākais cilvēku veselības piesārņojuma risks ir saulespuķu eļļai, bet vismazākais ķirbju eļļai (skat. 3. att.).



**3. att. PAO saturs dažādās augu eļļās, kas aprēķināts izmantojot iegūto TEF skalu.**

**Fig. 3. Content of PAH in different vegetable oils calculated according to the acquired scale of TEFs.**

Izmantojot mūsu izveidoto TEF skalu redzams, ka vislielāko toksisko vielu devu eļļu piesārņošanā dod dibenzopirēni, kā arī benzo(a)pirēns.

## PAO saturs kūpinātās zivīs un zivju konservos

Lai salīdzinātu PAO saturu un individuālās attiecības dažādās Latvijas tirgū sastopamās kūpinātās zivīs un konservos, analizējām Eiropas Komisijas rekomendācijā (Commission Recommendation 2005/108/EC) minētos 15 PAO, kuri ieteikti turpmākiem pētījumiem.

6. tabulā apkopota informācija par kūpinātu zivju konservu piesārņojumu ar PAO, kur redzamas paraugu grupu vidējās un maksimālās vērtības. Analizētajos paraugos atradām gandrīz visus 15 no analizētajiem PAO, izņemot DahP visos analizētajos paraugos bija zem nosakāmās robežkoncentrācijas.

6. tabula / Table 6.

### PAO koncentrācijas kūpinātu zivju konservos PAH concentrations in canned smoked fishes

| PAO / PAH   | Koncentrācija (Minimālā.-maksimālā) /<br>Concentration (minimum – maximum), $\mu\text{g kg}^{-1}$ |                                           |                                                                     |                                                               |                                                        |                                              |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
|             | Šprotes eļļā /<br>Sprats in oil (n=20)                                                            | Šprotu pastēte /<br>Pate of Sprats (n=10) | Zivju tefteli tomātu mērcē /<br>Fish noisette in tomato sauce (n=3) | Reņģes tomātu mērcē /<br>Baltic herring in tomato sauce (n=3) | Šprotes tomātu mērcē /<br>Sprats in tomato sauce (n=4) | Reņģes eļļā /<br>Baltic herring in oil (n=9) |
| CPP         | 0.24-20                                                                                           | n.d.-24                                   | 0.40-5.8                                                            | 0.89-14.0                                                     | 0.25-4.6                                               | 0.50-9.6                                     |
| BaA         | 0.59-25                                                                                           | 0.11-9.5                                  | 0.34-3.1                                                            | 1.3-7.0                                                       | 0.34-2.6                                               | 0.63-6.7                                     |
| CHR         | 0.66-33                                                                                           | 0.14-8.8                                  | 0.35-2.4                                                            | 1.2-6.3                                                       | 0.36-2.3                                               | 0.70-6.7                                     |
| 5MC         | n.d.-2.3                                                                                          | n.d.-1.6                                  | 0.07-0.50                                                           | 0.21-0.89                                                     | 0.12-0.68                                              | 0.11-1.2                                     |
| BbF +BjF    | n.d. <sup>a</sup> -12.1                                                                           | n.d.-7.8                                  | 0.75-2.7                                                            | 0.57-5.7                                                      | n.d.-1.7                                               | 0.51-3.9                                     |
| BkF         | 0.64-5.2                                                                                          | 0.18-6.1                                  | 1.2-4.4                                                             | 0.93-3.4                                                      | 1.1-2.8                                                | 0.31-2.7                                     |
| BaP         | 0.85-14                                                                                           | n.d.-14                                   | 0.59-3.0                                                            | 0.79-9.6                                                      | 0.94-2.3                                               | 0.68-8.0                                     |
| IcdP        | n.d.-3.6                                                                                          | n.d.-4.8                                  | n.d.-0.33                                                           | n.d.-1.9                                                      | n.d.-0.43                                              | 0.13-2.0                                     |
| DahA        | n.d.-0.54                                                                                         | n.d.-0.55                                 | n.d.                                                                | n.d.                                                          | n.d.                                                   | n.d.-0.28                                    |
| BghiP       | n.d.-5.1                                                                                          | n.d.-5.9                                  | n.d.-0.71                                                           | n.d.-3.5                                                      | n.d.-0.80                                              | 0.18-2.2                                     |
| DalP        | n.d.-0.48                                                                                         | n.d.-2.9                                  | n.d.                                                                | n.d.                                                          | n.d.                                                   | n.d.-0.49                                    |
| DaeP        | n.d.-0.10                                                                                         | n.d.-0.29                                 | n.d.                                                                | n.d.                                                          | n.d.                                                   | n.d.-0.06                                    |
| DaiP        | n.d.-0.10                                                                                         | n.d.-0.14                                 | n.d.                                                                | n.d.                                                          | n.d.                                                   | n.d.                                         |
| DahP        | n.d.                                                                                              | n.d.                                      | n.d.                                                                | n.d.                                                          | n.d.                                                   | n.d.                                         |
| Σ PAO / PAH | 4.6-104                                                                                           | 0.68-78                                   | 3.7-22.9                                                            | 5.9-52                                                        | 3.8-18                                                 | 4.8-44                                       |

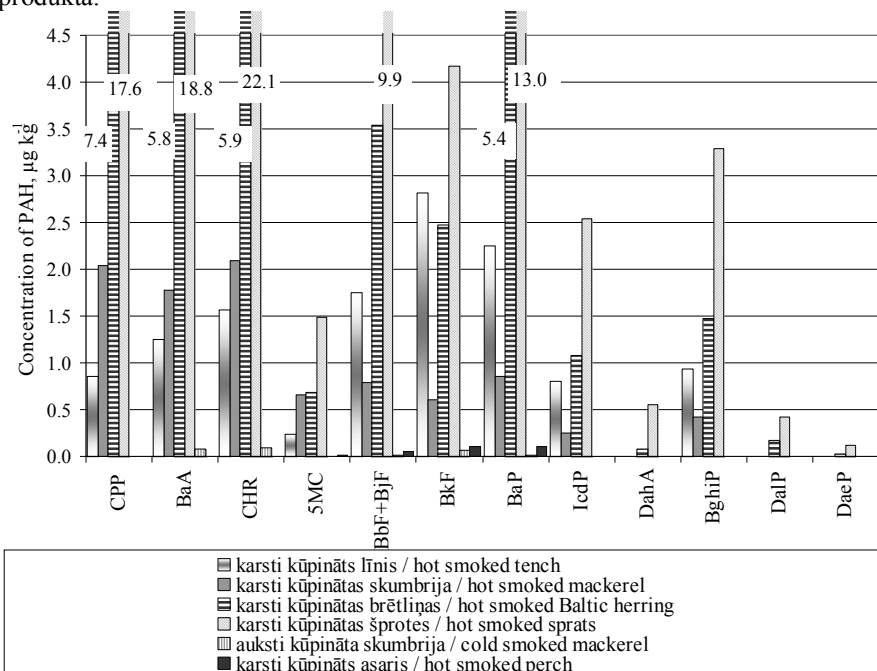
<sup>a</sup> n.d. – iegūtā vērtība zem metodes minimāli nosakāmās robežkoncentrācijas / value obtained is below method detection limit ( $<0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Kā redzams, BaP koncentrācijas un kopējā PAO koncentrācija kūpinātu zivju konservu paraugos bija attiecīgi sākot no vērtības zem nosakāmās robežkoncentrācijas līdz  $14 \mu\text{g kg}^{-1}$  un 0.68 līdz  $104 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Kopumā

savienojumi CPP, BaA un CHR tika atrasti ar visaugstākajām koncentrācijām, savukārt DahA, DaIP, DaeP, DaiP, un DahP bija sastopami zemākās koncentrācijās un kūpinātu zivju konservos ar tomātu mērci netika atrasti vispār.

Kaut gan, kā redzams no 6. tabulas, tā paša tipa paraugi saturēja ļoti dažādas PAO koncentrācijas, līdz ar to var secināt, ka piesārņojuma saturs nav viennozīmīgi saistīts ar produkta veidu.

BaP koncentrācijas un kopējā PAO koncentrācija kūpinātu zivju konservu paraugos bija attiecīgi sākot no vērtības zem nosakāmās robežkoncentrācijas līdz  $14 \mu\text{g kg}^{-1}$  un  $0.68$  līdz  $104 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Šajā pētījumā kūpinātās reņģes un brētliņas atradām visaugstākos PAO līmeņus (skat. 4. att.), ko varētu izskaidrot ar salīdzinoši lielo kūpināšanas produkta virsmas un svara attiecību. Kā zināms, visaugstākais PAO saturs ir uz kūpinātu produktu virsmas un kaut arī gaismas un skābekļa klātbūtnē notiek to sadalīšanās, tomēr daļa kaitīgo savienojumu migrē produktā.



4. att. Vidējās PAO koncentrācijas kūpinātās zivīs.

Fig. 4. Mean concentrations of PAH in smoked fish products.

Augstākas PAO koncentrācijas kūpinātā līnī, pretstatā ar kūpinātu asari varētu būt radušās, jo līņi ir zivis ar salīdzinoši lielāku tauku saturu un pretēji asarim dzīvo un barojas dūnās. PAO ir tendence uzkrāties produktos ar augstāku tauku saturu.

Kopumā kūpinātās zivīs dominē PAO ar zemāku molekulmasu (BaA, CHR, un CPP). Auksti kūpinātu skumbriju analizētajos paraugos bija ļoti zemas PAO koncentrācijas un atrastie savienojumi bija BaA, CHR un BkF ar koncentrācijām, kas tuvas nosakāmajai robežkoncentrācijai.

Kaut arī karsti kūpinātās zivīs CPP, BaA un CHR koncentrācijas galvenokārt bija augstākas nekā citu PAO koncentrācijas, karsti kūpinātā asarī šie PAO bija zem nosakāmās robežkoncentrācijas un atradām tikai BbF+BjF, BkF un BaP tuvu metodes minimāli nosakāmajai robežkoncentrācijai. DahP un DaiP nebija sastopami nevienā no analizētajiem paraugiem, bet DaIP, DaeP un DahA atradām kūpinātu reņģu un brētliņu paraugos ļoti zemās koncentrācijās.

### **PAO saturs kūpinātās gaļas produktos**

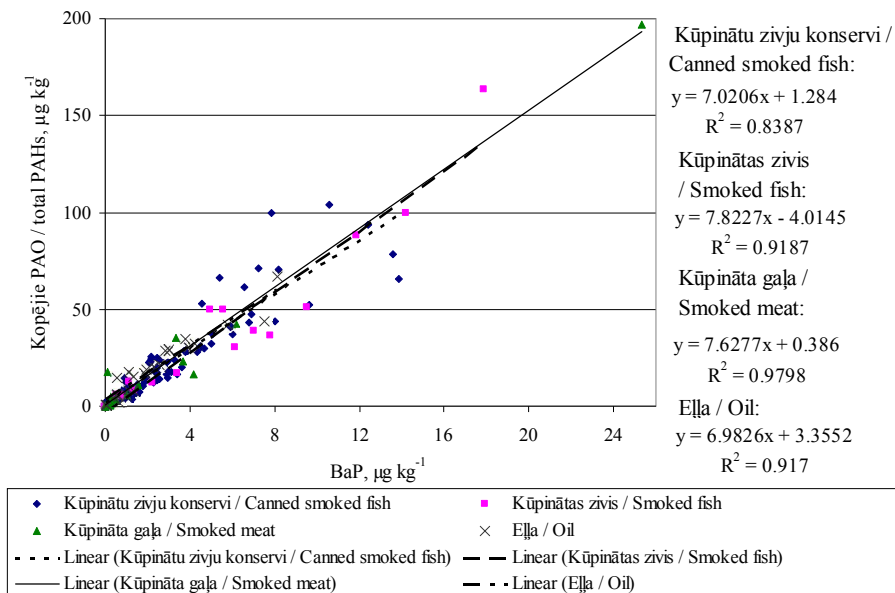
Lai pārbaudītu, vai kūpināti gaļas produkti uzrāda tādas pašas PAO satura un procentuālo attiecību tendences kā kūpināti zivju produkti, izlases veidā analizējām kūpinātus vistas un kūpinātus cūkgaļas produktus. BaP koncentrācijas kūpinātās gaļas paraugos bija sākot no vērtības zem nosakāmās robežkoncentrācijas līdz  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  un kopējā PAO koncentrācija attiecīgi no 0.06 līdz  $197 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Arī kūpinātās gaļas paraugos analīžu rezultāti uzrāda ļoti lielas PAO koncentrāciju atšķirības viena tipa paraugiem, kas visticamāk saistīts ar kūpināšanas tehnoloģiju. Kā arī vislielākās koncentrācijas novērojām CPP, BaA un CHR.

### **Pētījumi par piemērotu marķieri PAO satura noteikšanai**

Līdz šim BaP tika uzskatīts kā labs marķieris PAO satura noteikšanai pārtikas produktos. BaP ir visbiežāk studētais un visvairāk zināmais PAO, jo tas ir viens no visvairāk izpētītajiem potenciālajiem dzīvo organismu kancerogēniem, to ir relatīvi viegli analizēt un tas ir sastopams plašā daudzumā pārtikas veidu.

Lai pārbaudītu, vai ir korelācija starp BaP un kopējo PAO saturu, eļļām un visiem kūpinātu zivju un gaļas produktiem veicām lineārās regresijas analīzi. Kā redzams no grafika (skat. 5. att.), eļļām, kūpinātiem gaļas un zivju produktiem ir laba korelācija starp BaP un kopējo PAO saturu, ar determinācijas koeficientu attiecīgi  $R^2$  0.92, 0.98 un 0.92. Arī kūpinātu zivju konserviem novērojām pietiekami labu korelāciju, iegūstot determinācijas koeficientu  $R^2$  0.84.

No iegūtajiem rezultātiem var pieņemt, ka, lai vienkāršotu analītisko kontroli nodrošinot patērētāju aizsardzību, BaP izmantošana par marķieri varētu būt labs risinājums genotoksisko PAO noteikšanā, kaut arī novirzes dažos gadījumos ir augstas.



**5. att. BaP un kopējā PAO saturs korelācija eļļas un kūpinātos produktos.**

**Fig. 5. Correlation between BaP and total PAH concentration in oils and smoked food products.**

Tomēr Eiropas Pārtikas Drošības Pārvalde (EFSA) jaunākajos pētījumos norāda, ka hrizēns ir viens no problemātiskajiem savienojumiem, iegūstot 22 % pozitīvus paraugus, kuros netika atrasts BaP, un pieņēmums, ka BaP ir labs indikators visu PAO noteikšanā, varētu būt apšaubāms. EFSA veiktā testēšana uzrādīja arī, ka benzo(c)fluorēns ir otrs problemātisks savienojums, analīzes paraugā, kurā netika atrasts BaP, sasniedzot  $27 \mu\text{g kg}^{-1}$  augstu koncentrāciju (EFSA, 2007).

Mūsu analizētajos paraugos ( $n=134$ ) atradām 4 pozitīvus hrizēna paraugus, kuros nebija BaP, ar maksimālo koncentrāciju  $0.28 \mu\text{g kg}^{-1}$ , kaut gan analīžu rezultāti uzrādīja arī 29 pozitīvus paraugus ar BaP, kuros netika atrasts CHR, ar augstāko BaP koncentrāciju  $0.26 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Tomēr kopējā PAO koncentrācija visos šajos paraugos bija salīdzinoši neliela.

Salīdzinot 15 ES prioritāro PAO korelācijas un determinācijas koeficientus ar PAO summu dažādos pārtikas produktos, ieguvām, ka eļļu paraugos vislabākā korelācija ( $R=0.96$ ) ar kopējo PAO summu ir BbF+BjF, BkF un BaP. Kūpinātos zivju produktos laba korelācija ar kopējo PAO saturu bija ļoti daudziem savienojumiem (CPP ( $R=0.96$ ), BaA ( $R=0.993$ ), CHR ( $R=0.97$ ), BbF+BjF, BaP, DaeP un DaiP ( $R=0.98$ )). Sliktu korelāciju gan eļļas ( $R=0.24$ ), gan zivju ( $R=0.27$ ) paraugos uzrādīja DahP, ko var izskaidrot ar to, ka lielākajā daļā paraugu DahP bija zem nosakāmās robežkoncentrācijas vai tuvu tai. Slikta

korelācija ( $R=0.36$ ) ar kopējo PAO saturu bija arī 5MC eļļās. Pilnīgi pretējus rezultātus ieguvām ar CPP zivīs un eļļās, kur zivīs CPP uzrāda ļoti labu korelāciju ( $R=0.96$ ), savukārt eļļās ļoti sliktu korelāciju ( $R=0.36$ ) ar kopējo PAO saturu.

Apkopojot rezultātus redzams, ka vēlams būtu ne tikai BaP, bet arī citu PAO kontrole, jo kā novērojām, vairākos produktos, piemēram, olīveļļās, ļoti lielu piesārņojumu dod tieši PAO ar mazāku molekulmasu, kas arī atzīti kā genotoksiski un kancerogēni savienojumi. Aprēķinot korelāciju dažādu PAO summai pret kopējo PAO saturu, ieguvām, ka izmantojot divu individuālo PAO (piemēram, benzo(a)pirēna un hrizēna) summu jau ievērojami pieaug korelācijas koeficients ar kopējo PAO saturu.

### **Dažādu faktoru ietekme uz PAO saturu pārtikas produktos**

Kā zināms, ir vairāki faktori (piemēram, kūpināšanas ģeneratora tips, temperatūra, ilgums, gaisa padeve kūpināšanas laikā, krāsns dimensijas), kas ietekmē PAO saturu pārtikas produktos to ražošanas gaitā. Un dažkārt ražotājiem ir ļoti sarežģīti panākt PAO satura samazinājumu tajā pat laikā nezaudējot produktam raksturīgo krāsu un garšu, ko iecienījuši patērētāji.

### **PAO saturs rafinētās un nerafinētās eļļās**

Kaut arī rafinētās eļļas parasti satur mazākas PAO koncentrācijas, jo rafinēšanas procesā ir iespējams samazināt PAO saturu, tomēr pēc mūsu analīžu rezultātiem, tirdzniecībā sastopamā rafinētā saulespuķu eļļa saturēja daudz augstākas (vidēji 6 reizes) PAO koncentrācijas. Līdz ar to pieņēmums, ka patērētāji, kas iecienījuši nerafinētās eļļas, varētu būt vairāk neaizsargāti no kaitīgu vielu uzņemšanas, neatbilst patiesībai.

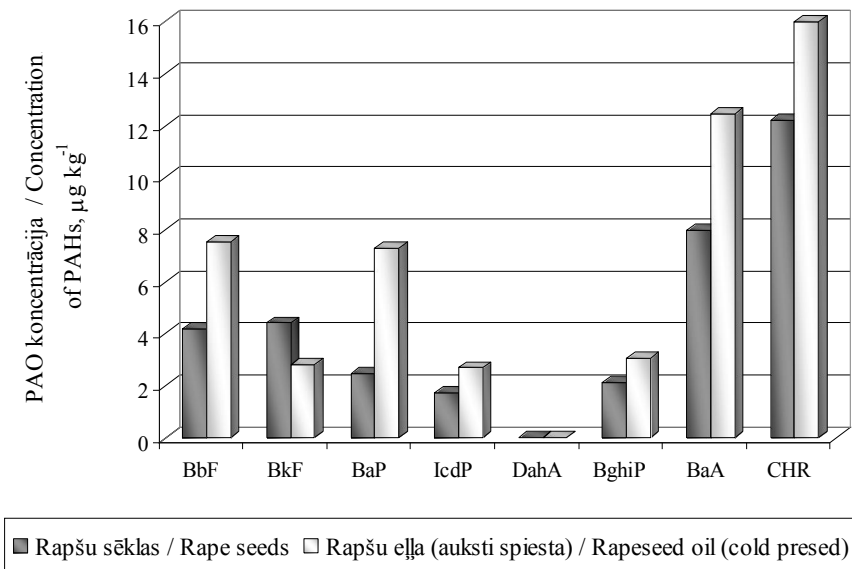
Augstākas PAO koncentrācijas, kas konstatētas rafinētās eļļās, varētu izskaidrot ar piesārņotāku izejvielu vai nepietiekami no PAO viedokļa kontrolētu eļļu iegūšanas tehnoloģiju izmantošanu, palaujoties uz to, ka rafinēšanas procesā izmantotās dažādās metodes pazeminās PAO saturu, piemēram, deodorācija, balināšana, apstrāde ar bāzēm un skābēm kombinācija, bet tas nav noticis vai arī iespējama eļļu piesārņošana rafinēšanas gaitā, ja reaģenti satur PAO.

Tā kā nav zināms mūsu pētījumā analizētās rafinētās eļļas ražošanā izmantotie tehnoloģiskie procesi un to parametri, tad grūti noteikt iespējamās piesārņojuma avotus. Augstās PAO koncentrācijas iespējams radušās izmantojot piesārņotas izejvielas ar vēlmi to attīrīt rafinēšanas procesā, nepietiekošas rafinēšanas vai arī vēlākas piesārņošanas dēļ. Tāpēc, lai izvairītos no eļļu piesārņošanas, būtu nepieciešama PAO kontrole arī eļļu ražošanas procesā, gan izejvielām, gan eļļu iegūšanas laikā.

Savukārt salīdzinot individuālo PAO relatīvo saturu rafinētā un nerafinētā saulespuķu eļļā novērojām, ka lielākajai daļai PAO procentuālās attiecības abās

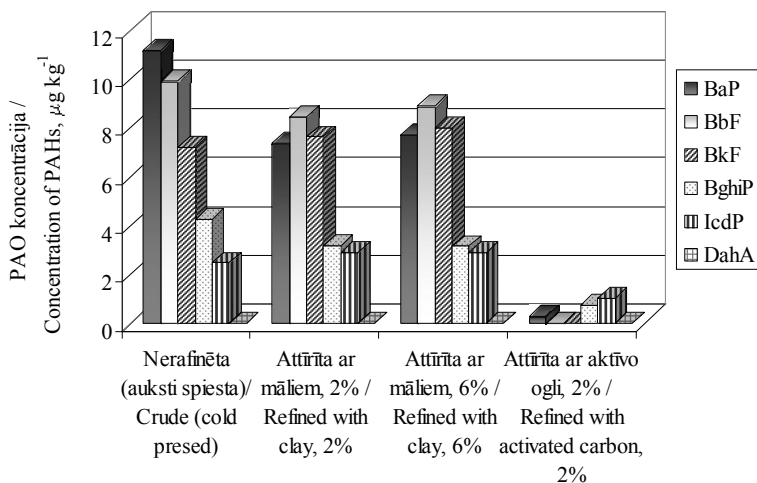
eļļās bija samērā līdzīgas, izņemot CHR, 5MC, DaiP un DahP relatīvais saturs bija (par 0.3% līdz 3.7%) lielāks nerafinētā saulespuķu eļļā, savukārt atrastais BaA un BaP relatīvais saturs (par 1.5 % un 3.2 % attiecīgi) bija lielāks rafinētā saulespuķu eļļā, bet DaepP konstatējām tikai rafinētā saulespuķu eļļā.

Viens no galvenajiem eļļu piesārņošanas izcelsmes avotiem ražošanas procesā ir sēkļu tiešā žāvēšana, kad tās nonāk saskarsmē ar sadegšanas produktiem. Rapša sēkļu un no tām iegūto eļļu analīžu rezultāti liecina, ja rapša sēkļu žāvēšanas procesā ir izveidojies augsts PAO saturs, tad, spiežot eļļu arī pat pie zemas temperatūras (aukstā spiešana), PAO koncentrācijas vēl pieaug, skatīt 6. att., jo PAO ir koncentrējušies sēkļu lipīdu daļā, kā arī notiek to ekstarģēšana ar eļļu no izspiedām.



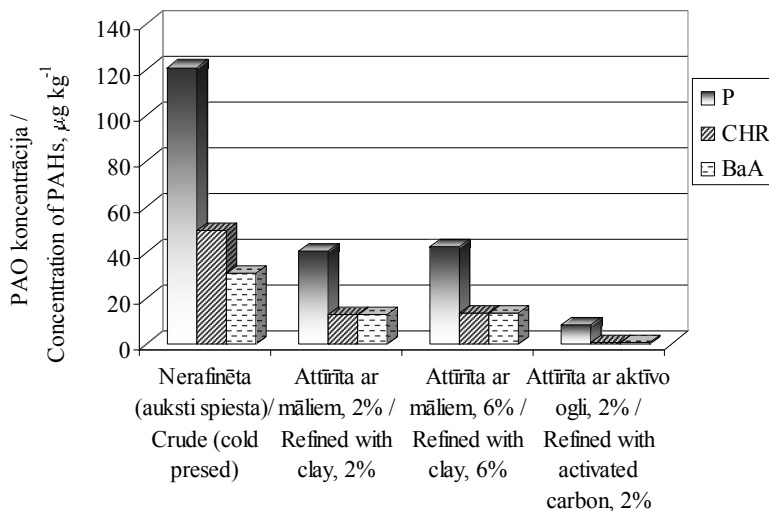
**6. att. PAO saturs rapšu sēklās un eļļā.**  
**Fig. 6. Content of PAH in rape seeds and oil.**

Veicām arī pētījumu par iespēju samazināt BaP saturu, pielietojot dažādas attīrīšanas metodes. Eksperimentu rezultāti parāda, ka eļļas attīrīšanai no BaP un citiem PAO var izmantot aktīvo ogli, savukārt balināšana ar māliem nav sevišķi efektīva, jo no „smagajiem” PAO (satur piecus vai vairāk benzola ciklus) nedaudz samazina tikai BaP saturu, bet pārējie saglabājas tādās pašās koncentrācijās (skat. 7. att.).



7. att. „Smago” PAO saturs rapšu eļļā pirms un pēc attīrīšanas.  
Fig. 7. Content of „heavy” PAH in rapeseed oil before and after refining.

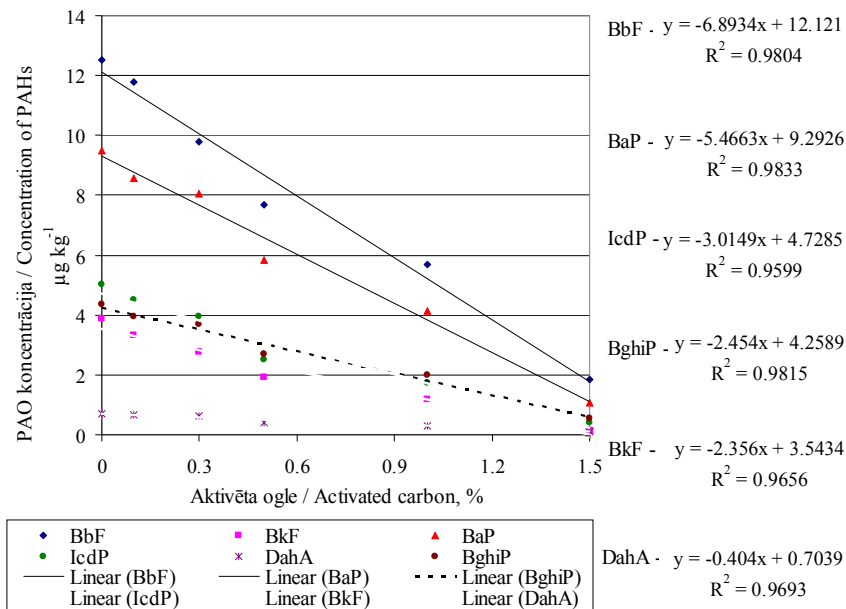
Attīrīšana ar māliem deva labus rezultātus „vieglo” PAO (satur līdz četriem benzola cikliem) koncentrācijas samazināšanā rapšu eļļā. „Vieglo” PAO saturu var samazināt arī apstrādājot eļļu ar aktīvo ogli (skat. 8. att.).



8. att. „Vieglo” PAO saturs rapšu eļļā pirms un pēc attīrīšanas.  
Fig. 8. Content of „light” PAH in rapeseed oil before and after refining.

Pārbaudot PAO samazināšanas iespējas saulespuķu eļļā, izmantojot 1.5 % aktivēto ogli no eļļas masas, novērojām visu PAO ievērojamu samazināšanos par 85 līdz 96 % (skat. 9. att.).

Procentuālā ziņā visvairāk samazinājās BbF, kam jau pēc eļļas apstrādes ar 0.1 % masas daļu aktivētās ogles novērojām samazināšanos par 14 %. Bez tam pirms apstrādes ar aktīvo ogli eļļa 4 reizes pārsniedza maksimāli pieļaujamo BaP līmeni – 2.0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , bet pēc apstrādes BaP saturs eļļā bija vairs tikai 1.1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .



9. att. PAO samazināšana eļļā, apstrādājot ar aktivētu ogli.

Fig. 9. Decrease of PAH in oil by treatment with activated carbon.

Tomēr ražotājiem iesakāmas tādas ražošanas un pārstrādes metodes, kuras nepieļauj sākotnējo pārtikas eļļas izejvielu piesārņošanu ar PAO.

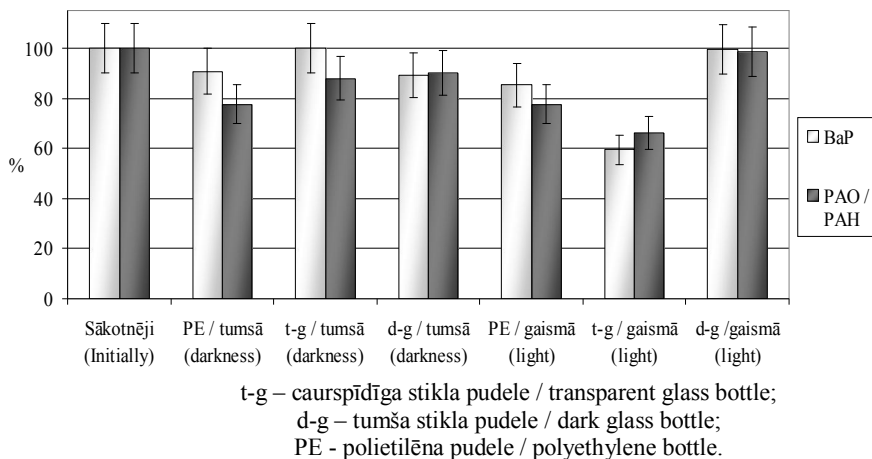
### Iepakojuma ietekme uz PAO saturu eļļās

Lai pārbaudītu gaismas un iepakojuma ietekmi uz PAO saturu eļļās, eļļai pievienojām PAO standartus līdz koncentrācijām no 6.1 līdz 22.1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  un veicām 15 ES prioritāro PAO analīzi pēc 24 h.

Salīdzinot BaP saturu (skat. 10. att.), redzams, ka neatkarīgi no iepakojuma, paraugus uzglabājot tumsā, tas nemainījās. Paraugos, kas uzglabāti gaismā tumša stikla pudelē, BaP saturs bija tāds pats kā sākotnēji. Ļoti nelielas izmaiņas novērojām paraugiem PE iepakojumā un lielākas gaiša stikla pudelē. No

iegūtajiem datiem var secināt, ka BaP saturu eļļās maz ietekmē PE vai stikla iepakojums, bet vairāk ietekmē gaisma.

Salīdzinot kopējo PAO saturu, novērojām, ka arī to ietekmē gaisma, jo kopējais PAO saturs bija nemainīgs paraugos tumša stikla pudelē, bet samazinājies gaiša stikla un PE pudelēs.



**10. att. BaP un kopējais PAO saturs eļļās pēc 24h uzglabāšanas.**

**Fig. 10. Content of benzo(a)pyrene and PAH in oils after 24h storage.**

Taču eļļas novietojot PE iepakojumā gan gaismā, gan tumsā, kopējais PAO saturs eļļās bija nedaudz samazinājies, kas varētu liecināt gan par PAO virsmas adsorbciju, gan difūziju polimēra iekšienē. Kā arī gaismā un skābekļa ietekmē PAO var oksidēties, veidojoties hidroperoksīdiem, peroksīdiem, epoksīdiem, un karbonilsavienojumiem.

Kā liecina mūsu pētījuma rezultāti, ievērojamu (49 līdz 57 %) PAO samazināšanos novērojām tikai PAO ar mazāku molekulmasu – CPP, BaA, CHR un 5MC. Pārējiem PAO, analizējot eļļas pēc 24 h, saturs bija samazinājies vidēji par 9 līdz 35 %.

PAO ar mazāku molekulmasu ir mazāka molekula un līdz ar to iespējams mazāka mijiedarbība ar citiem savienojumiem un salīdzinoši atvieglota difūzija. Kā arī mazākiem PAO ir lielākas iespējas iespiesties PE polimēru režģī.

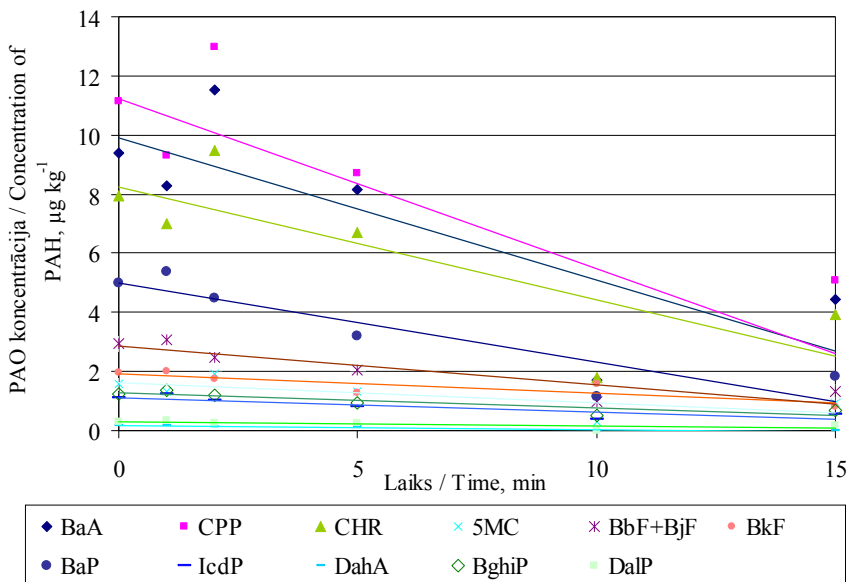
Visticamāk, liela nozīme ir arī individuālo PAO koncentrācijām eļļā, kā arī vides viskozitātei un citiem eļļās esošiem savienojumiem, piemēram, vitamīniem un steroliem, kuri konkurē ar PAO un ietekmē PAO difūziju un adsorbciju. Kā novērojām, mazākmolekulārie PAO, uzglabājot PE iepakojumā samazinājās vairāk.

Varētu būt, ka iepakojumu varētu izmantot dažu PAO samazināšanai eļļā, bet nav zināms, vai sorbcijai nebūs negatīvs efekts, samazinot citus produkta kavitātes parametrus.

### UV apstarošanas ietekme uz PAO saturu kūpinātās zivīs

PAO galvenokārt ir koncentrēti kūpinātu zivju produktu ādā (Larsson, 1982) un tā ir samērā efektīva barjera pret PAO iespiešanos dziļākos audos (Moret et al., 1999). Bez tam dažkārt pēc kūpināšanas procesa kūpinātās zivis izkar saulē žāvēties (Stolyhwo, Sikorski, 2005), līdz ar to mēs pārbaudījām PAO fotoķīmisko jutību pret UV apstarošanu un PAO samazināšanos kūpinātās zivīs.

Mūsu pētījumā kūpinātās zivis novietojām zem UV lampas un apstarojām 0-15 min. PAO saturs kūpinātās zivīs tika mērīts pēc 1, 2, 5, 10, un 15 min. Novērojām ievērojamu kancerogēno PAO samazināšanos (skat. 11. att.).



11. att. PAO samazināšanās kūpinātās zivīs atkarībā no apstarošanas laika zem UV lampas.

Fig. 11. The dependence between the decrease in PAH concentration in smoked fish and the exposure time under UV lamp.

Pēc 2 minūšu apstarošanas ar UV, BaP saturs kūpinātās zivīs bija samazinājies par 10 %, bet pēc 15 min apstrādes individuālo PAO saturs bija no 37 līdz 64 % no sākotnējā. Pētījuma rezultāti uzrādīja, ka no 11 analizētajiem PAO, pret UV apstarošanu visjutīgākais ir BaP.

Savukārt, veicot BaP standartšķīduma UV apstarošanu, iegūtie rezultāti liecina, ka BaP samazināšanās nenotika tik ātri. Pēc 30 minūtēm BaP saturs samazinājās par 30%. Acīmredzams, PAO samazināšanas pakāpe atkarīga ne tikai no mijiedarbības laika, to ietekmē daudzi faktori, gan sākotnējā koncentrācija, gan parauga tips, gan PAO difūzija, kas notiek ne tikai kūpināšanas laikā, bet arī pēc kūpināšanas procesa beigām.

Pētījuma rezultāti norāda uz PAO koncentrācijas samazināšanos fotoķīmiskās reakcijās. Lai izpētītu šo procesu, nepieciešami papildus pētījumi, jo kā redzams, izmantojot UV lampu, samazinās PAO saturs, tomēr jāņem vērā, ka fotooksidācijā veidojušos nepiesātināto taukskābju oksidēto savienojumu klātbūtnē, toksicitāte var daudzkārt palielināties. Gan mūsu gan citu autoru pētījuma rezultāti norāda ka, lai iegūtu pareizus analīžu rezultātus, paraugus PAO noteikšanai pārtikas produktos nepieciešams glabāt tumsā un sagatavošanas analīzei laikā jāsargā no gaismas.

### **PAO saturs kūpinātā gaļā atkarībā no izmantotā kurināmā**

Literatūrā atrodams ļoti ierobežots skaits pētījumu par kurināmā ietekmi uz PAO saturu pārtikā. Līdz ar to mēs veicām pētījumu par izmantotā malkas veida ietekmi uz PAO saturu kūpinātā gaļā, kontrolējot temperatūru kūpināšanas kamerā (temperatūra kūpināšanas kamerā tika uzturēta 80 °C) un kūpinot gaļu 5h mājas apstākļos. Kūpināšanā izmantojām 10 dažādu koku sugu malku un kokogles.

Lai salīdzinātu PAO saturu un atsevišķo savienojumu attiecības kūpinātajos paraugos, analizējām Eiropas Komisijas rekomendācijā (Commission Recommendation 2005/108/EC) minētos 15 PAO. Visos paraugos bija sastopami 12 policikliskie aromātiskie ogļūdeņraži. Kopumā atrastās PAO koncentrācijas bija augstākas PAO ar mazāku molekulmasu ( $m/z$  226 and  $m/z$  228) un vismazākās PAO koncentrācijas vai zem metodes minimālās noteikšanas robežkoncentrācijas ar molekulmasu  $m/z$  302. Vienīgi gaļas paraugos, kas kūpināti ar egli tika atrasti visi 15 analizētie PAO, kaut gan BaP koncentrācijas visos paraugos pārsniedza Eiropas Savienībā noteikto maksimāli pieļaujamo koncentrāciju ( $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) kūpinātai gaļai.

Vismazākais individuālo savienojumu, kā arī kopējais PAO saturs bija analizētajos gaļas paraugos, kas kūpināti ar ābeli, kam seko alksnis (skat. 7. tabulu).

BaP saturs kūpinot ar kļavu tika iegūts līdzīgs kā ar alksni, tomēr kopējais PAO saturs bija ievērojami lielāks, jo ar kļavu kūpinātos gaļas paraugos bija augstāks ciklopenta(c,d)pirēna, benzo(a)antracēna un hrizēna saturs.

Neraugoties uz to, ka literatūrā kūpināšanā iesaka izmantot lapu kokus un kā kurināmā veidi tiek ieteikti arī lazda un apse (Kypko, 1969), tomēr veicot kūpināšanu ar šo koku malku, tika iegūtas augstas BaP koncentrācijas (skat. 7. tabulu). Arī izmantojot ievu kā kurināmo tika iegūtas daudz augstākas benzo(a)pirēna koncentrācijas, nekā kurinot ar ābeli un alksni.

7. tabula / Table 7.

**PAO vidējā koncentrācija gaļas paraugos, kas kūpināti ar dažādiem  
malkas veidiem**

**Mean concentration of PAH determined in samples of meat smoked with  
different species of wood**

| PAO /<br>PAH                       | Ābele /<br>Apple                                                                | Alksnis /<br>Alder | Alksnis + kadiķis /<br>Alder + juniper | Egle /<br>Spruce | Klava /<br>Maple | Lazda /<br>Hazel | Plūme /<br>Plum | Apse /Aspen | Ieva / Bird-cherry | Pīlādzis /<br>Rowan-tree | Kokogles /<br>Charcoal |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-------------|--------------------|--------------------------|------------------------|
|                                    | Vidējā noteiktā koncentrācija / Mean concentration found, $\mu\text{g kg}^{-1}$ |                    |                                        |                  |                  |                  |                 |             |                    |                          |                        |
| CPP                                | 8.97                                                                            | 16.10              | 44.25                                  | 138.19           | 31.81            | 85.01            | 59.13           | 75.75       | 24.52              | 40.20                    | 12.75                  |
| BaA                                | 8.43                                                                            | 12.97              | 40.14                                  | 111.80           | 25.84            | 76.88            | 82.07           | 49.28       | 20.79              | 36.35                    | 17.10                  |
| CHR                                | 9.53                                                                            | 13.82              | 37.90                                  | 114.66           | 26.59            | 75.71            | 92.05           | 45.51       | 19.67              | 38.27                    | 17.69                  |
| 5MC                                | 1.34                                                                            | 1.95               | 4.57                                   | 14.06            | 2.73             | 8.00             | 8.43            | 7.24        | 2.91               | 6.06                     | 2.54                   |
| BbF+<br>BjF                        | 3.30                                                                            | 5.32               | 10.75                                  | 6.34             | 4.37             | 16.86            | 17.03           | 16.96       | 10.11              | 10.27                    | 5.67                   |
| BkF                                | 2.12                                                                            | 3.24               | 6.76                                   | 10.46            | 2.64             | 10.08            | 10.63           | 9.67        | 5.43               | 5.55                     | 3.30                   |
| BaP                                | 6.04                                                                            | 9.43               | 20.38                                  | 32.34            | 9.31             | 30.97            | 30.59           | 35.07       | 17.30              | 20.06                    | 10.01                  |
| IcdP                               | 2.62                                                                            | 4.22               | 9.83                                   | 13.78            | 3.05             | 13.11            | 9.18            | 20.89       | 9.32               | 10.43                    | 5.09                   |
| DahA                               | 0.44                                                                            | 0.62               | 1.36                                   | 2.08             | 0.62             | 1.84             | 1.23            | 2.77        | 1.44               | 1.66                     | 0.84                   |
| BghiP                              | 2.99                                                                            | 5.01               | 10.21                                  | 15.44            | 3.75             | 15.89            | 9.68            | 23.99       | 10.69              | 10.05                    | 4.96                   |
| DalP                               | 1.14                                                                            | 1.74               | 4.42                                   | 7.13             | 1.46             | 5.63             | 3.11            | 10.87       | 4.19               | 5.03                     | n.d. <sup>a</sup>      |
| DaeP                               | 0.50                                                                            | 0.45               | 1.09                                   | 1.89             | 0.44             | 1.58             | 0.86            | 3.03        | n.d.               | n.d.                     | n.d.                   |
| DaiP                               | 0.52                                                                            | 0.43               | 1.01                                   | 1.95             | 0.34             | 2.10             | 0.68            | n.d.        | n.d.               | n.d.                     | n.d.                   |
| DahP                               | n.d.                                                                            | n.d.               | n.d.                                   | 0.79             | n.d.             | n.d.             | n.d.            | 6.04        | n.d.               | n.d.                     | n.d.                   |
| PAO<br>summa<br>/ Sum<br>of<br>PAH | 47.9                                                                            | 75.3               | 192.7                                  | 470.9            | 113.0            | 343.7            | 324.7           | 307.1       | 126.4              | 183.9                    | 80.0                   |

<sup>a</sup> vērtība zem metodes minimāli nosakāmās robežkoncentrācijas ( $<0.10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Tā kā pēdējo gadu laikā tirdzniecībā ir pieejamas kokogles, un to izmantošana produktu gatavošanā (tajā skaitā kūpināšanā) ir ieguvusi popularitāti, jo nav nepieciešams sagatavot kurināmo pašiem, turklāt dažkārt tās tiek uzskatītas par mazāk kaitīgu kurināmo, mēs pārbaudījām kokogļu ietekmi uz PAO saturu, izmantojot tās kūpināšanā. Šādi kūpinātā gaļā piesārņojums ar benzo(a)pirēnu bija līdzvērtīgs, kā izmantojot alkšņa malku, kaut gan paraugos netika atrasti dibenzopirēni.

Lai kūpinājumam būtu īpašs aromāts, garša vai arī vēlamais krāsojums, izmantotā kurināmā veidus dažkārt variē, vai pievieno augus, piemēram, viršus (Toth et al., 1972). Kadiķa pievienošana kūpināšanā izmantotajam kurināmajam, ir viens no populāriem veidiem, kas tiek plaši pielietots, lai uzlabotu dūmu tehnoloģiskās īpašības, kūpinājumu aromātu un garšu. Kā mēs novērojam, kūpinot ar alksni un tam pievienojot kadiķi, benzo(a)pirēna, kā arī kopējais PAO saturs palielinājās vairāk nekā 2 reizes (skat. 7. tab.).

Viens no iemesliem, kāpēc skuju kokus nevar izmantot kūpināšanā, varētu būt sveķos esošie cikliskie terpēni, kas varētu būt cēlonis arī augstām PAO koncentrācijām šādi kūpinātos produktos (Toth, Blaas, 1972). Iespējams šī iemesla dēļ, lieli BaP un arī citu PAO daudzumi tika atrasti ar plūmi kūpinātā gaļā, jo uz plūmes stumbra mēdz veidoties sveķi. Līdz ar to, kaut arī plūme ir lapu koks ar cietu koksni, mūsu pētījumi rāda, ka plūmi nav ieteicams izmantot kūpināšanā.

Analizējot gaļas paraugus, kas kūpināti ar egli, atradām visaugstākās individuālās PAO koncentrācijas un arī kopējo PAO saturu, kas saistīts ar lielākām CPP, BaA, CHR un 5MC koncentrācijām ar šāda veida kurināmo kūpinātos paraugos.

BaP saturs gaļā, kas kūpināta ar egli bija 5 reizes lielāks nekā gaļā, kas kūpināta ar ābeli. Savukārt procentuālais BaP saturs ar egli kūpinātā gaļā bija mazāks, nekā izmantojot cita veida kurināmo, jo arī citi PAO, it īpaši CPP, BaA, CHR un 5MC bija augstās koncentrācijās. Summārais PAO piesārņojums kūpinot ar egli bija 10 reizes lielāks, nekā kūpināšanā izmantojot ābeli.

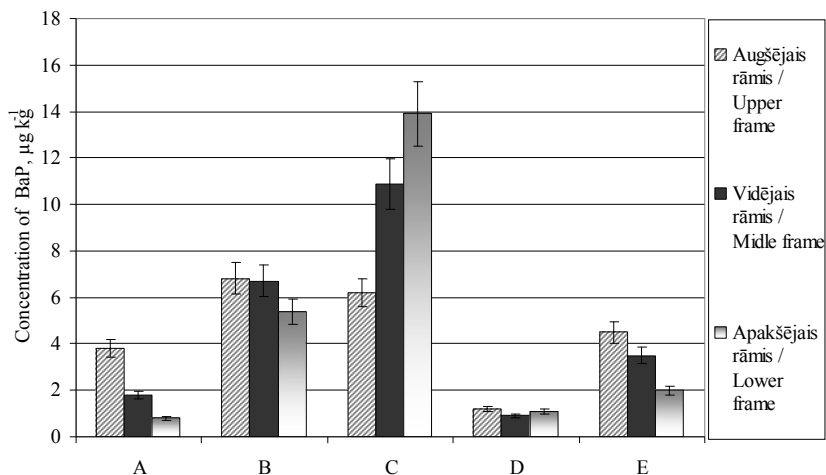
### **Benzo(a)pirēna satura izmaiņas kūpinātās zivīs atkarībā no kūpināšanas kameras, izvietojuma un krāsns tīrīšanas biežuma**

Šajā darbā veicām pētījumu par kūpināšanas krāsns veida, zivju novietojuma kūpināšanās kamerā un citu faktoru ietekmi uz BaP saturu produktā ražošanas procesa laikā. Tā kā, benzo(a)pirēna saturu šprotēs veido summa no benzo(a)pirēna koncentrācijas svaigās un atvēsinātās zivīs, BaP koncentrācijas, kas veidojas kūpināšanas procesā (apžāvēšanas, vārīšanas un kūpināšanas laikā) un BaP satura konservos izmantotajā eļļā, tika analizētas svaigas (neapstrādātas) zivis, augu eļļa pirms konservēšanas, kūpinātas zivis konserviem, kūpinātu zivju konservi (atsevišķi zivju un eļļas frakcija).

Analizējot svaigas zivis, secinājām, ka BaP saturs tajās ir nenozīmīgs. BaP saturs 30 dažādos reņģu un brētliņu paraugos bija zem metodes minimāli nosakāmās robežkoncentrācijas ( $<0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Atkarībā no krāsns tipa un zivju izvietojuma kūpināšanas krāsnī noteiktais benzo(a)pirēna saturs kūpinātās zivīs bija robežās no 7 līdz  $13.9 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Būtiski atšķiras iegūtie dati par BaP saturu kūpinātās zivīs atkarībā no zivju izvietojuma krāsnī dažādos uzņēmumos (skat. 12. att.). Zivis, kas tika kūpinātas krāsnī (C) ar ventilatoru un dūmu padevi no apakšas, vidēji saturēja visaugstākās BaP

koncentrācijas, salīdzinot ar zivīm, kas kūpinātas, izmantojot krāsni ar dūmu ģeneratoru un elektrisko kūpināšanas krāsni.



**A** – div-tuneļu konveijera tipa kūpināšanas krāsns ar dūmu ģeneratoru un dūmu ieplūdes vietu no augšas, ražota AS Miiduranna Texas, Igaunija / smokehouse with two tunnel conveyor-type smoking chambers with smoke generator, produced by AS Miiduranna Texas, Estonia and upper smoke inflow; **B** – div-tuneļu konveijera tipa kūpināšanas krāsns ar dūmu ģeneratoru un dūmu ieplūdes vietu no augšas, ražota SIA Peruza, Latvija / smokehouse with two tunnel conveyor-type smoking chambers with smoke generator, produced by SIA Peruza, Latvia and upper smoke inflow; **C** - Kverner-Bruk kūpināšanas krāsns ar ventilatoru un dūmu ieplūdes vietu no apakšas / Kverner-Bruk smokehouse with fan and with underneath location of smoke generating furnace and smoke inflow from below; **D** - Kverner-Bruk modificētā kūpināšanas krāsns ar dūmu ģeneratoru un dūmu ieplūdes vietu no augšas / Kverner Bruck smokehouse with modified smoking chambers with smoke generator and upper smoke inflow; **E** – elektriskā kūpināšanas krāsns ar dūmu ģeneratoru un dūmu ieplūdes vietu no augšas / electrical smokehouse with smoke generator and upper smoke inflow.

**12. att. Vidējais BaP saturs paraugos, kas kūpināti izmantojot dažādas krāsni un ņemti dažādās vietās (vertikālā plaknē) kūpināšanas kamerā.**  
**Fig. 12. Average BaP levels in samples smoked in different smokehouses and in different places (in vertical plane) into smoking chamber.**

BaP saturs kūpinātās zivīs atšķiras ne tikai no kūpināšanas krāsns tipa, bet arī no atrašanās vietas kūpināšanas krāsnī pa vertikāli (skat. 12. att.).

Salīdzinot BaP koncentrācijas kūpinātu zivju paraugos, kuri ņemti no dažādiem rāmjiem, redzams, ka, izmantojot krāsni ar dūmu ģeneratoru un dūmu padevi no augšas, visaugstākais BaP saturs sastopams paraugos no augšējā rāmja, savukārt izmantojot krāsni (C) ar dūmu padevi no apakšas, visaugstākais BaP saturs bija zivīs no apakšējā rāmja, kas saistīts ar dūmu ieplūdes vietu un

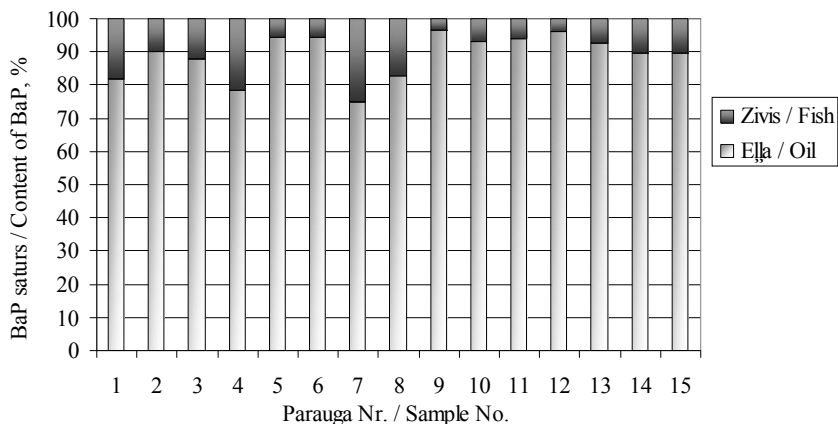
vislielāko dūmu koncentrāciju šajā zonā. Arī kūpinot zivju paraugus elektriskajā krāsnī, vislielākais BaP saturs bija paraugiem uz augšējā rāmja BaP koncentrāciju sadalījuma intervāls starp zivīm, kas noņemtas no dažādiem rāmiem kūpināšanas krāsnī ar ventilatoru (C), bija augstāks nekā izmantojot krāsnis ar dūmu ģeneratoru un dūmu padevi no augšas. Savukārt, salīdzinot krāsnis ar dūmu ģeneratoru, vislielākais BaP koncentrāciju intervāls atkarībā vertikālā no izvietošanas tika atrastas zivīs, kas kūpinātas krāsnī (A), salīdzinot ar krāsnī (B) un krāsnī (D), kaut gan tas varētu būt saistīts arī ar dažādu kūpināšanas metožu izmantošanu.

Kaut arī var novērot vispārīgas tendences, analizējot BaP saturu dažādās kūpināšanas krāsnīs un dažādās atrašanās vietās, tomēr veiktā testēšana uzrāda augstas BaP satura izkliedes kūpinās zivīs pat izmantojot vienu iekārtu un zivis novietojot tajā pašā atrašanās vietā. Atšķirības iespējams saistītas ar dažādu tauku saturu zivīs vai dūmu ķīmiskā sastāva izmaiņām kūpināšanas laikā, kā arī nevar izslēgt citu nezināmu faktoru ietekmi uz piesārņojuma veidošanos.

Tā kā kūpināšanas krāsnis netiek tīrītas katru dienu, teorētiski produkti varētu tikt piesārņoti no darvas atlikumiem, kas izveidojušies iepriekšējā produkta ražošanā. Lai pārbaudītu šo hipotēzi, salīdzinājām BaP saturu kūpinātās zivīs vairākas dienas pēc kārtējās krāsns tīrīšanas. Analīžu rezultāti uzrādīja, ka BaP koncentrācijas paraugos nevis pieauga, bet samazinājās, trešajā līdz piektajā dienā sastādot vairs tikai pusi no pirmajā dienā atrastās BaP koncentrācijas. BaP satura samazināšanos kūpinātās zivīs nedēļas beigās varētu izskaidrot ar PAO sorbciju darvas nogulās uz kūpināšanas kameras sienām vai citu faktoru ietekmi.

### **PAO satura samazināšanās kūpinātās zivīs to konservos eļļā un tomātu mērcē**

Būtisks faktors, kas ietekmē BaP koncentrāciju kūpinātu zivju konservu gala produktā ir BaP difūzija no zivju frakcijas uz eļļas frakciju, tādējādi samazinot BaP līmeni zivīs. Atsevišķi analizējot BaP koncentrācijas kūpinātu zivju konservu eļļas un zivju frakcijā, kā arī produktu kopumā, novērojām, ka difūzijas rezultātā BaP saturs zivju frakcijā ievērojami samazinās. Salīdzinot BaP saturu zivju un eļļas frakcijā, BaP saturs eļļas frakcijā bija vidēji 11 reizes lielāks nekā analizējot tikai zivju frakciju. BaP procentuālās attiecības zivju un eļļas frakcijā skat. 13. attēlā.



**13. att. Benzo(a)pirēna procentuālās attiecības zivju un eļļas frakcijās.**

**Fig. 13. Comparative ratio of benzo(a)pyrene (%) in fish and oil fractions.**

Līdz ar to var pieņemt, ka patērētājs faktiski ar zivīm uzņem mazāku piesārņotāju daudzumu nekā produktā kopumā un svarīgi, ka, kaut arī eļļas masas daļa salīdzinoši ar zivju masu konservos ir aptuveni tikai 1/3 daļa, eļļu no kūpinātu zivju konserviem nav ieteicams lietot uzturā. Tā kā PAO ir lipofilas īpašības un balstoties uz šiem rezultātiem, redzams, ka eļļu varētu izmantot kā šķīdinātāju, lai izekstrahētu PAO no piesārņotiem produktiem.

## SECINĀJUMI

1. Izstrādāta pārtikas produktu efektīva PAO satura GH-MS analītiskā metode. Laikietilpīgo paraugu sagatavošanas metodi zivju produkcijas analīzēm iespējams pārstrādāt, atmetot pārziemošanu un iegūstot līdzvērtīgus rezultātus.
2. Izmantojot izstrādāto AEŠH-MS-MS metodi benzo(a)pirēna noteikšanai, var iegūt līdzvērtīgus rezultātus salīdzinot ar GH-MS metodi, turklāt 4 reizes saīsinot hromatogrāfiskās analīzes laiku, tādējādi to var izmantot kā ātru un efektīvu BaP rutīno analīžu metodi.
3. GH-MS analītisko metožu validācijas dati liecina, ka tās ir efektīvas PAO satura noteikšanai kūpinātās gaļas, zivju un eļļas produktos.
4. Latvijas tirgū sastopamajās eļļās un kūpinātos produktos kopējais PAO saturs variē no 0.21 līdz 197  $\mu\text{g kg}^{-1}$  un piesārņojuma saturs nav viennozīmīgi saistīts ar produkta tipu. Kopumā eļļās, kūpinātās zivīs un gaļā dominē PAO ar mazāku molekulmasu.
5. Eļļām, kūpinātiem gaļas un zivju produktiem ir laba korelācija starp BaP un kopējo PAO saturu.

6. Zivju novietojums kūpināšanās kamerā, kā arī kūpināšanas krāsns veids būtiski ietekmē BaP saturu kūpinātos produktos.
7. Kūpinātu zivju konservos difūzijas rezultātā lielākā daļa BaP pāriet eļļas frakcijā, tādējādi patērētāji, uzturā lietojot kūpinātu zivju produktus eļļā, uzņem mazāku BaP daudzumu nekā produktā kopumā. Eļļu no kūpinātu zivju konserviem nav ieteicams lietot uzturā.
8. Kūpināšanā izmantotais malkas veids būtiski ietekmē PAO saturu kūpinātā gaļā un ir viens no kritiskajiem parametriem, lai samazinātu pārtikas produktu piesārņojumu. Lai izvairītos no augstām PAO koncentrācijām, gaļas kūpināšanā ieteicams izmantot ābeles un alkšņa malku vai kokogles.
9. Eļļas attīrīšanai no BaP un citiem PAO var izmantot aktīvo ogli. Eļļu apstrādājot ar 1.5 % aktivēto ogli, visi PAO samazinājās par 85 līdz 96 %. Bez tam PAO molekulmasai un struktūrai ir būtiska loma absorbcijā.

## **IETEIKUMI RAŽOTĀJIEM**

1. Kūpināšanā ieteicams izmantot krāsni ar dūmu ģeneratoru, kur iespējams kontrolēt dažādus tehnoloģiskos parametrus, vai elektrisko kūpināšanas krāsni.
2. Lai izvairītos no augstām PAO koncentrācijām, gaļas kūpināšanā ieteicams izmantot ābeles un alkšņa malku vai kokogles. Kūpināšanā nebūtu ieteicams izmantot lazdas, plūmes, apses un egles malku, kā arī pievienot kadiķi, lai iegūtu dažādas smaržas un garšas variācijas kūpinājumiem, jo materiāli, kas satur sveķus, var veicināt intensīvu kvēpu rašanos un līdz ar to kūpināšanas produkti piesārņojas ar PAO.
3. Eļļas attīrīšanai no BaP un citiem PAO var izmantot aktīvo ogli. Balināšana ar māliem ir efektīva tikai „vieglo” (satur līdz 4 benzola cikliem) PAO samazināšanai. Iesakāmas tādas ražošanas un pārstrādes metodes, kuras nepieļauj sākotnējo pārtikas eļļas izejvielu piesārņošanu ar PAO.
4. Kūpināšanā ieteicams izvēlēties gaļu vai zivis ar mazāku tauku saturu. PAO lipofilitātes dēļ, produktos ar lielāku tauku saturu novēro augstākas PAO koncentrācijas.

## TOPICALITY OF THE RESEARCH

In the last years consumers pay the special attention to the food safety and higher standard desires has set up. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are one of the greatest classes of organic compounds that have carcinogenic activity. To build on carcinogenic and mutagenic properties already in the eighties they have been included in the list of priority pollutants of European Union and Environmental Protection Agency (EPA). PAH have been found in water, soil, as well as in different food categories, including fats, oils, smoked/grilled products, plants, sea products, smoke flavourings, coffee, tea, beverages. Its originating sources are different, for example, smoke from tobacco, and exhaust fumes, petroleum products, coal and other substances that arise in combustion process. The contamination of food with PAH can occur both by taking from environment, and also during the food processing, for example, ignition, grilling, smoking, drying, etc.. The formation of PAH depends on numerous processing parameters of food products: time, fuel, distance from heat source, horizontal or vertical location, type (grilling, fritting, frying), and technology used. The content of these substances can differ even more than tenfold. Essential food contamination sources are also with PAH polluted food dressings and PAH migration from packaging.

Established that by using traditional smoking in fumes existent PAH condense as well as occurs the adsorption of smoke solid particles on surface of product and diffusion in it. Real PAH content in smoked products depends on different factor of smoking process, including type of smoking oven or generator, combustion temperature, degree of smoking, etc..

To simplify the problems involving PAH diversity and content variety, benzo(a)pyrene (BaP) has been accepted as indicator for determination of presence of PAH in food products, regardless of fact, that it constitute only 1-20% from carcinogenic PAHs. In Germany BaP maximum permitted concentration  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  has been set already since year 1973. Later also other countries, like Austria, the Czech Republic, Italy and Slovakia have adapted this maximum permitted concentration. To protect the health of society also in European Union since year 2005 the maximum permitted BaP concentrations for several food products have been established.

One of essential preconditions of control effectivity is the application of precise, rapid and sensitive methods of analysis. The traditional sample preparation methods for determination of PAH are complicated and timeconsuming. Those include extraction that follows one or several procedures of clean up, therefore it is important to find optimal sample preparation method as well as analytical determination method that can be used in routine testing.

Summarizing the data of literature **the aim of the research work** was set as follows – to investigate the content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)

in oils, smoked meat and fish products in the market of Latvia and to assess the impact of different technological parameters on the content of PAH.

**Tasks of the doctoral thesis:**

- 1) to elaborate efficient analytical method for determination of PAH content and routine analytical determination of benzo(a)pyrene content in food products;
- 2) to validate PAH determination methods for oil, fish and meat matrixes;
- 3) to collect the information about content of PAH in oil, meat and fish and its products in Latvia;
- 4) to evaluate impact of different parameters on content of PAH;
- 5) to verify the possibilities of diminishing of PAH content in oils, smoked meat and fish.

**Novelty of the research:**

- the contamination with PAH in oils, smoked fish and meat products from market of Latvia was tested;
- the influence of fuel on content of PAH in smoked meat products was investigated;
- the method of high resolution liquid chromatography - tandem mass spectrometry for determination of benzo(a)pyrene content in food products was developed;
- the effect of UV irradiance on content of PAH in smoked fishes was investigated;
- the influence of oven type and fish location into the smoking chamber on content of PAH in smoked fishes was evaluated;
- the influence of PAH diffusion in to the oil on content of carcinogenic substances in final product was determined.

**The scientific importance of the research** – the methods for determination of PAH and also BaP content in food products was developed. According to European Commission Recommendation (European Commission, 2005), the monitoring of PAH content on food was made. The changes of PAH content by impact of a number of factors was investigated.

**The economic significance of the research** – the using of analysis methods for determination of PAH content it is possible to assess the content of hazard substances in food products, but using of purification steps in oil production or by evaluation of influence of different technological parameters on content of PAH in smoked food products, it is possible to reduce concentrations of PAH in production.

Investigations about the influence of different technological factors on content of PAH in final product allow to gather information about the exposure to people health and also elaborate the recommendations for PAH reduction in production.

## APPROBATION OF THE RESEARCH WORK

**The results have been presented** at 10 international scientific conferences, symposiums and congresses in Latvia, Czech Republic, France, Bulgaria and Russia (see the list on pages 5-6).

**The research results are reflected** in nine established and reviewed scientific publications in Latvian and English, 8 of them are published in the editions approved by international external and Latvian Council of Science. The list of publications is presented on page 7.

## MATERIALS AND METHODS

The research work was being performed in Laboratory of Food and Environmental Investigations at Food and Veterinary Service National Diagnostic Centre during the period from 2004 to 2008.

### **The materials used in PAH content determination experiments:**

- Oils from market of Latvia produced in different countries: refined and crude sunflower oils („Brölio” – produced in Germany, „Saulīte” – produced in Lithuania; „Dikaņka” – produced in Ukraina; „Natural” – produced in Argentina), rapeseed oils („Risso” – produced in Belgian, „Floriol” – produced in Poland; „Iecavas”, „Vidzemes”, „Ideal” – produced in Latvia), olive oils („Dolores”, „Olitalia” – produced in Italia), lineseed oils („Latgales”, „Iecavas”, „Iecavnieks” – produced in Latvia), corn oil („Risso” – produced in Belgian), soya („Brölio” – produced in Germany), cannabis oil („Iecavas” – produced in Latvia), ground-nuts oil – produced in England, caraway oil – produced in Latvia, pumpkin oil „Gloria” – produced in „Schell GmbH” Germany.

- smoked fishes (hot smoked tench, mackerel, Baltic herring, sprats, perch, cold smoked mackerel) and in Latvia produced canned smoked fishes (Sprats in oil, Pate of Sprats, Fish noisette in tomato sauce, Baltic herring in tomato sauce, Sprats in tomato sauce, Baltic herring in oil) purchased in market in Latvia;

- smoked pork and smoked chicken products produced in Latvia from market in Latvia.

**In research about PAH content in refined and crude oils** the rapeseed oil used was from oil producers in Latvia. In research about package influence on content of PAH in oils used sunflower oil purchased in market.

**In experiments about PAH content in smoked meat depending on fuel** the pork used purchased in market. The wood (alder, apple, spruce, maple, hazel, plum, aspen, bird-cherry, rowan-tree, juniper) used hewed before smoking process and charcoal (“Dr. Miller”, producer SIA „Kamene”).

**In research about benzo(a)pyrene content in fishes smoked in different conditions** fresh, frapped or freezed Baltic sea or Riga sea gulf herring were used.

### **Oil purification with activated carbon**

To 100 ml of sunflower oil 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 or 1.5 g activated carbon were added, the resulting mixture was stirred 30 min at room temperature, filtered and analysed according to sample preparation and analysis of the method.

### **Decrease of PAHs in smoked fishes by UV irradiation**

The fish samples were placed in UV chamber (DRT 400, 400W) and irradiated at 254 nm (30 cm distance from a UV source) for 0-15min. The standard solution of BaP with concentration of 10 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  was placed on glass Petri dish in UV chamber and irradiated for 0-30 min.

### **Ovens used in fish smoking and general description of smoking**

The smoking of fish was performed in collaboration with fish processing companies in Latvia. In this research five different smoking ovens have been used:

A - oven with two-tunnel conveyor-type smoking chambers with smoke generator, produced by AS Miiduranna Texas, Estonia;

B - oven with two-tunnel conveyor-type smoking chambers with smoke generator, produced by SIA Peruza, Latvia;

C - Kverner-Bruk oven with smoke chambers with ventilator and underneath location of smoke generating furnace;

D - Kverner-Bruk oven with tunnel-type modified smoking chambers with smoke generator;

E - electrical oven with smoke chamber with smoke generator.

Alder chips were used as fire-wood, moisture content of alder chips was 35 - 45 %. Burning temperature of woodchips and the grating reached 400 - 450 °C. Temperature of smoke was 60-80 °C.

### **Smoking of meat using different firewood**

The pork obtained from local supermarket has been used for the experiments. It was smoked in home made smoking kiln using 10 different wood types and commercial charcoal. Temperature in smoking chamber was maintained 80 °C. Smoking time was 5 h.

### **Sample preparation**

Homogenized samples were hydrolyzed with solution of potassium hydroxide in ethanol, extracted with cyclohexane. The cyclohexane solution was washed with water and then with a mix of methanol and water and after re-extracted with N,N-dimethylformamide/water (9:1) blend and repeatedly extracted from it with cyclohexane. After sample cyclohexane solution purification on Silica SPE column it was concentrated and analyzed. PAH ((pyrene (P), benzo(a)anthracene (BaA), chrysene (CHR), benzo(b)fluoranthene (BbF), benzo(k)fluoranthene (BkF), benzo(j)fluoranthene (BjF), BaP, indeno(1,2,3-c,d)pyrene (IcdP), benzo(g,h,i)perilene (BgHiP), 5-methylchrysene

(5MC), cyclopenta(c,d)pyrene (CPP), dibenzo(a,h)anthracene (DahA), dibenzo(a,l)pyrene (DalP), dibenzo(a,e)pyrene (DaeP), dibenzo(a,i)pyrene (DaiP), dibenzo(a,h)pyrene (DahP)) were analysed on Agilent Model 6890 gas chromatograph equipped with the mass selective detector Model 5973. The high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry benzo(a)pyrene determination method analysis were made using tandem mass spectrometer *QuattroLC* with atmospheric pressure chemical ionizing, that connected with HPLC *Waters Alliance 2690* (I. Stumpe-Viksna et al., 2007).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Development of analytical method and validation**

The major problems connected with PAH determination in food products are the low concentration of compounds to be analysed and potential variety of present disturbance. Except for fact that BaP can be use as marker to determine carcinogenic PAH in food products, the analytical methods that have been used in official food control and monitoring require including all 15 EU priority PAH.

The aim of the method development was to establish analytical method that could be 1) specific, accurate, sensitive and reproducible; 2) applicable for analysis of different food matrices; 3) reasonably rapid and not too expensive; 4) meet the method performance characteristics required by the legislation.

### **Optimization of sample preparation**

#### **Development of accelerated metod for sample preparation of smoked fish analysis:**

Because sample preparation for determination PAH content in smoked fish analysis are very time-consuming, the experiments were made to accelerate the sample preparation, without using of saponification with potassium hydroxide solution that could economize the time and amount of reagents used.

In the testing of the parameters of accelerated method, results shows that method is suitable for determination of PAH content in smoked fish samples. Reproducibility in PAH determination of accelerated method by analysis of 6 samples was from 7.0 % to 17 %. Besides the average values substantially did not differ from those obtained with previous used method with saponification step (see tab. 1). Those the shortened method can be used for PAH content determination if smoked fish analysis because the sample have been sufficient cleaned-up from interfering substances.

#### **Selection of sorbents for solid phase extraction:**

To assess the suitability of different sorbents in PAH analysis, the sorption of oil on four sorbents was tested: silica, fluorisil, neutral and acid alumina.

1g of rapeseed oil that dissolved in 5 ml of cyclohexane was transferred on 2 g of sorbent. In elution with cyclohexane 5 fractions were collected. The fractions were dried and the residue was determined gravimetrically. The highest amount of oil eluted in the first two fractions with all used sorbents. The results obtained showed that the thighest sorption ability of lipids is charasteristic for silica.

Besides to appraise the suitability of sorbents for PAH analysis and sample purification from interfering substances, the PAH sorption on these sorbents was tested. The standard solutions were taken on sorbent and eluted with cyclohexane and after than with dichlormethane. When as sorbent alumina was used the PAH eluted only with dichlormethane fraction. But PAH sorption on fluorisil and silicagel was comparatively low and PAH eluted already with first milliliters of cyclohexane.

After summarizing of results of experiments for further studies the silica was chosed, that has effective sorption ability of interfering substances. Application of alumina and fluorisil prevents the lower sorption of lipids on these sorbents.

### **Analytical determination and quantification of PAH using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)**

For analytical PAH determination 2 GC-MS methods were used: for 15 EU priority PAH determination and method for determination of US EPA PAH.

To improve the precision and compensate the losses in the sample preparation process, in PAH determination method the internal standard solution benzo(a)pyrene-d<sub>12</sub> was introduced.

Because in analysis of 15 EU priority PAH for determination of cyclopenta(c,d)pyrene (CPP), chrysene (CHR), benzo(a)anthracene (BaA) and 5-methylchrysene insufficient accuracy was observed, for determination of these PAH the internal standard chrysene-d<sub>12</sub> was established.

### **Validation of methods**

According to the developed methods two validations were made: for US EPA PAH determination (method No. 1) and for determination of 15 EU priority PAH in food products (method No. 2).

#### **Validation of method No. 1:**

**The selectivity** of method was verified by analysis of sample without PAH. No peaks from the matrix in corresponding retention times of polycyclic aromatic hydrocarbons were found.

**The linearity** test of GC-MS determination method was performed by analysis of PAH standard solutions in concentrations from 0.05 to 0.25 µg µl<sup>-1</sup>. The data of regression analysis shows that PAH signal – concentration

relationship is linear in the tested concentration range and all values of PAH calibration line determination coefficients are from 0.995 to 0.999.

To verify **the reproducibility** of the GC-MS method, six parallel oil samples and six parallel smoked fish samples with established concentrations of internal standards were analysed. The relative standard deviation for oil samples were from 2.7 to 8.5% (see table 2).

In analysis if reproducibility of smoked fish samples, the values of relative standard deviation obtained were from 7.7 to 35%. Obviously (see in table 2), the deviations of parallel measurements were high, that could be explained that it is difficult to obtain complete homogeneity in samples, as well as fishes in term of analytical properties are complicated and worse matrix for clean up as oil.

In testing of method **the accuracy** to the samples with different concentrations of PAH, the standard solutions with concentration  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  (for smoked fish samples) and  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  (for oil samples) were added. The average accuracy of benzo(a)pyrene for oil samples was 115%, but for smoked fish samples it was 111%.

The sensitivity of method was tested by analysis of PAH sample with standard solution and by determination of signal to noise (S/N) ratio. For the determination of limit of determination ratio  $S/N=3$  has been used but for determination of limit of quantitation  $S/N=10$ . Information about results obtained summarized in table 3. The method fully satisfies to necessary in European Commission regulation No. 333/2007 listed requirements.

The precision of method was verified in FAPAS interlaboratory testing of olive oil samples with 57 other laboratories in Europe. In analysis of PAH in oil samples satisfactorily results were obtained, that lays within the 95% confidence interval of the target standard deviation ( $z\text{-scores} < |2|$ ). For oil samples the values of  $z\text{-scores}$  of BaP, BaA, benzo(b)fluoranthene (BbF), benzo(g,h,i)pyrene (BghiP) and indeno(1,2,3-c,d)pyrene (IcdP) were from -1.0 to +1.0. For oil sample  $z\text{-scores}$  were calculated according to the equation (1):

$$z = \frac{x - X}{\sigma} \quad (1)$$

where:  $z$  – the distance between the raw score and the mean in units of the standard deviation;  $x$  – the mean reported value;  $X$  – the assigned value (gravimetric preparation data);  $\sigma$  – target standard deviation.

### **Validation of Method No. 2:**

**The selectivity** of method was verified by analysis of sample without PAH. No peaks from the matrix in corresponding retention times of polycyclic aromatic hydrocarbons were found.

**The linearity** test of GC-MS determination method was performed by analysis of PAH standard solutions in concentration range from 0.05 to  $0.25 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ . The data of regression analysis shows that PAH signal – concentration relationship is linear in the tested concentration range and all

values of PAH calibration line determination coefficients are from 0.996 to 0.999.

To verify **the reproducibility** of the GC-MS method, six parallel oil samples and six parallel smoked fish samples with known concentrations of internal standards were analysed. The relative standard deviation for oil samples were from 2.3 to 7.5%, but for smoked fish samples from 7.1% to 24%.

In testing of method **the accuracy** to the samples with different concentrations of PAH, the standard solutions with concentration  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  (for smoked meat, fish and canned fish samples) and  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  (for oil samples) were added. The average accuracy of PAH for oil samples was from 56% to 111%, but for smoked fish, meat and canned fish samples from 56% to 111% (see table 4). The low accuracy for dibenzopyrenes can be explained that benzo(a)pyrene- $\text{d}_{12}$  is not plenty good internal standard for calculation and determination of dibenzopyrenes and it will be necessary better internal standard who conforms to dibenzopyrenes. Although in general the method quality parameters obtained correspond to necessary requirements.

The sensitivity of method was tested by analysis of PAH sample with standard solution and by determination of signal to noise (S/N) ratio. For the determination of limit of determination ratio  $S/N = 3$  has been used but for determination of limit of quantitation  $S/N=10$ . Limits of determination of PAH were from 0.02 to  $0.08 \mu\text{g kg}^{-1}$ , and limit of quantitation from 0.05 to  $0.26 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

The method fully satisfies to necessary in European Commission regulation No. 333/2007 listed requirements. The precision of method was verified in Community Reference Laboratory interlaboratory testing of PAH standard solution and olive oil and samples with 23 other laboratories in Europe. In analysis of PAH in oil samples satisfactorily results were obtained, that lays within the 95% confidence interval of the target standard deviation ( $z\text{-scores} < |2|$ ). For  $z\text{-scores}$  obtained see table 6. For oil samples  $z\text{-scores}$  were calculated according to the equation (1.) (see previous).

### **Using of high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method in determination of PAH**

The high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS) method was developed for analysis of benzo(a)pyrene in different food products. In selected HPLC-MS-MS conditions and with column used in research good selectivity of benzo(a)pyrene was obtained.

To assign the reproducibility and accuracy of HPLC-MS-MS method, to oil samples without PAH, the standard solutions up to concentration  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  were added.

Relative standard deviation for 6 samples was 6.7% and accuracy obtained was 92%. For the determination of limit of determination ratio  $S/N = 3$  has been

used. The sensitivity of method was  $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ . The data of method quality parameters proclaims that method can be used for determination of benzo(a)pyrene in food products.

The HPLC-MS-MS method was compared with gas chromatography - mass spectrometry method by analysis of the same analytical samples. The results obtained with both methods showed good correlation ( $R^2=0.9991$ ).

The total time for analysis with developed HPLC-MS-MS method is considerably shorter (10 min) as using the GC-MS method (40 min) and it is possible to analyse much more samples.

### **Content of polycyclic aromatic hydrocarbons in food products**

In food products PAH are as complex mixtures. In different food matrix PAH was found in different concentrations, but the most occurrence PAH is CPP, BaP, BaA, CHR, the sum of BbF and BkF and BjF as well as in general these compounds were found in higher concentrations.

The highest concentrations of PAH were determined in smoked chicken meat. In other analysed food groups PAH concentrations were lower however in some cases the maximum in European Union permitted level of BaP was exceeded.

### **Content of PAH in oil samples on sale in market of Latvia**

As benzo(a)pyrene have been used as marker for determination of PAH content, wherewith it is the most studied compound. Likewise in our research large part of investigations was based on determination of BaP content. In year 2004./2005 in assessment of oils (rapeseed, sunflower, olive, linseed, corn, soya, cannabis, ground-nuts, caraway) in market of Latvia the highest concentrations of benzo(a)pyrene was found in rapeseed oils (max.  $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), caraway ( $5.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) and sunflower (max.  $5.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) oils, but the lowest concentrations of BaP were in ground-nut and corn oils ( $\leq 0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Though in general oils from Latvian market contained small concentrations of benzo(a)pyrene.

To compare the content of PAH and ratios of individual PAH compounds in oils, 15 EU priority PAH (Commission Recommendation 2005/108/EC) were analysed in four different oil types. Benzo(a)pyrene content in oil samples was from ( $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) up to  $7.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ , but the total content of PAH from 0.21 up to  $46 \mu\text{g kg}^{-1}$ . In analysed samples of rapeseed and sunflower oils all 15 priority PAH were detected (see fig. 2).

In general the highest content of BaP in analysed samples was in sunflower oils, but the highest content of total PAH in analysed samples of olive oil. For sunflower oil it was 83.2%, in pumpkin oil 45.2% and rapeseed oil 24% from total PAH content in olive oil. However in olive oil the mainly PAH found were with lower molecular weight (CPP, BaA, CHR and 5MC) that are less harmful to

health. Comparatively in rapeseed oils these PAH were few, while dibenzopyrenes and dibenz(a,h)anthracene were found. Whereas dibenzopyrenes and DahA were not found in olive and pumpkin oils (see fig. 2). For PAH content comparison in different oils, the rating against to highest total PAH content found in olive oil was used.

In analysis of the same type (refined or crude) oil very different concentrations of PAH were found, thus the regular control of PAH content in oils is advisable.

To take toxic equivalence factors (TEF), comparison of total PAH content in analysed oils and exposure to people health was made.

By evaluation of literature data induced that for the same PAH various scientists different value of TEF have assigned. Wherewith after summarizing of literature data and using different published values of various scientists, the joint average TEF scale was made. In calculations of potential toxicity of analysed oil using created scale, was achieved that the highest contamination risk to people health has sunflower oil, but the smallest pumpkin oil (see fig. 3).

Employing our created TEF scale, results shows that the highest portion of toxic compounds in contamination of oils give dibenzopyrenes as well as benzo(a)pyrene.

### **Content of PAH in smoked fish and canned fish products**

The levels of 15 EU priority (Commission Recommendation 2005/108/EC) polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish and canned smoked fish purchased from Latvian market were investigated.

Table 7 shows the contamination of PAHs in canned fish products. Almost all 15 PAHs were quantified in the examined canned fish samples, except DahP was below detection limit ( $<0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Minimum and maximum values of individual compounds and of the sums of 15 PAHs are given for each set of samples.

As shown, the concentrations of BaP and total PAHs in the canned fish samples ranged between not detectable and  $14 \mu\text{g kg}^{-1}$  and  $0.68\text{-}104 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively, with CPP, BaA and CHR consistently being the most abundant compounds. DahA, DaIP, DaEP, DaiP, and DahP were not found in canned fish samples in tomato sauce.

However, as we can see from Table 7, there is a large variability in PAH levels for samples of the same type, thus the contamination level is not strongly correlated with the type of product.

The smoked fish samples contained no detectable up to  $13 \mu\text{g kg}^{-1}$  amounts of BaP and 0.26 up to  $94 \mu\text{g kg}^{-1}$  of total PAHs. Samples of smoked „Sprats” and Baltic herring showed the highest PAH levels in this study (see Fig. 4). The somewhat higher levels for hot smoked „Sprats” and Baltic herring could be explained by its large surface to weight ratio. As known, the highest content of PAH are on surface of the products and although in presence of light and oxygen

occurs decomposition, though a part of hazard compounds migrate into the product.

The higher PAH concentrations in smoked tench in comparison to smoked perch could be because tenches are more fatty fishes, and PAHs trend to form in products with higher content of fat.

In general, the predominating PAHs in smoked fish were compounds with lower molecular-weight (BaA, CHR, and CPP). In cold smoked mackerel we found very low content of PAHs and determined only BaA, CHR, and BkF, with concentrations close to the detection limit. However in hot smoked fish products concentrations of CPP, BaA and CHR mainly were higher than concentrations of other PAHs, in hot smoked perch these PAHs were below detection limit and only BbF+BjF, BkF and BaP were found close to the detection limit.

DahP and DaiP were not found in any of smoked fish samples, but DalP, DaeP and DahA were found in samples of smoked „Sprats” and Baltic herring in very low levels.

### **Content of PAH in smoked meat products**

To inspect shows smoked meat products the same PAH concentration and percentage ratio tendencies as smoked fish products or not, selected samples of smoked chicken and smoked pork products were analysed. The concentration of BaP and total PAH varied between concentration under detection limit up to  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  and 0.06 up to  $197 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. Likewise in smoked meat samples results of analysis show the great differences in PAHs concentrations in samples of the same type that, probably, is due to the differences in smoking technology. As well as the highest concentrations were found for CPP, BaA and CHR.

### **Investigations on appropriate marker for determination of PAH content**

Up to now BaP was considered as good marker for detection of PAH content in food products. BaP is most frequently studied and most known PAH, because it is one of mainly investigated potential carcinogens for living organisms and it is relative easy to analyse and it has been found in large variety of food products.

To verify whether there are significant statistical correlation between BaP concentration and total PAHs concentration, all the data from the smoked fish and meat samples were submitted to linear regression analysis. Fig. 5 shows the regression lines obtained by plotting BaP concentrations against total PAH concentrations. There was strong correlation ( $R^2=0.98$ ) for smoked meat products and also significant for oil and smoked fish products ( $R^2=0.92$ ), however the  $R^2$  value for canned smoked fish products was 0.84

In general, to simplify analytical control ensuring adequate consumer protection, using of BaP as a marker for the determination of total genotoxic PAH seems to be a good solution, however in some cases the deviations are high.

Though, the European Food Safety Authority (EFSA) in recent findings on PAHs in food reported that crysene was the most problematic compound with 22% of positives in samples negative for benzo(a)pyrene and the assumption that benzo(a)pyrene is a good indicator of any PAH contamination was proved dubious. EFSA found also that benzo(c)fluorene had the second highest maximum of almost  $27 \mu\text{g kg}^{-1}$  in a sample testing negative for benzo(a)pyrene (EFSA, 2007). In analysed samples ( $n=134$ ) we found 4 positive samples of crysene with highest concentration  $0.28 \mu\text{g kg}^{-1}$  in samples negative for benzo(a)pyrene, but also 29 positives samples of benzo(a)pyrene with highest concentration  $0.26 \mu\text{g kg}^{-1}$  in samples negative for crysene. However the total PAH concentrations in all these samples were low.

By comparison of correlation between 15 EU priority PAH and total PAH content in different food products, we found that in oil samples strong correlation ( $R=0.96$ ) with total PAH were for BbF+BjF, BkF and BaP. In smoked fish samples strong correlation with total PAH content were for many compounds (CPP ( $R=0.96$ ), BaA ( $R=0.993$ ), CHR ( $R=0.97$ ), BbF+BjF, BaP, DaeP and DaiP ( $R=0.98$ )). Low correlation both in oil ( $R=0.24$ ), and smoked fish samples showed DahP, that could be because in most of samples DahP was below or close to the detection limit. Low correlation ( $R=0.36$ ) with total PAH content was found also for 5MC in oil samples. Diametrically opposed results was obtained for CPP in oil and fish samples where in fish samples CPP showed strong correlation ( $R=0.96$ ) and in oil samples low correlation ( $R=0.36$ ) with total PAH content.

Summarizing results obvious that advisable not only control of BaP but also control of other PAHs, because as we observed in several products, for example, in olive oils, the great contamination was exactly from PAH with lower molecule mass, that also have been recognized as genotoxic and carcinogenic compounds. In calculations of correlation of different sum of PAH against total content of PAH, was achieved that using sum of two individual PAH (for example, BaP and CHR) noticeably increase the correlation coefficient against total sum of PAH.

### **Influence of different factors on content of PAH**

As known, content of PAH in food products during production influences some factors (for example, type of smoking generator, smoking temperature, time, amount of oxygen during smoking, oven dimensions, etc.). Sometimes producers have very difficult to obtain decrease of PAH content in the same time not to lose color and taste characteristic to product that favour consumers.

## Content of PAH in refined and crude oils

Although usually content of PAH in refined oils are lower because it is possible to decrease content of PAH during refining process, though results showed that in market available refined sunflower oil contained higher (about 6 times) PAH concentrations as crude. Thus assumption that consumers which likes crude oils could be more unprotected from taking of hazard compounds is not truth.

Higher concentrations of PAH established in refined oils can be explained with using of contaminated raw materials or can be related with technological process of insufficient purchase because in refining process different combinations of methods, for example, deodorization, bleaching, treatment with bases and acids can be used as well as oil contamination during refining process is possible, if reagents contain PAH.

Because there is no knowing technological process and parameters used for refined oil production used in our research, it is difficult to determine possible sources of contamination. Thus to prevent from contamination of oil regular control of PAH content also during oil processing time is needed, both for raw materials and for oils during purchase time.

By comparison of relative content of individual PAH in refined and crude sunflower oil we observed that majority of PAH percentage proportions in both oils are comparatively equal, except CHR, 5MC, BaP and DahP relative content was (on 0.3% till 3.7%) higher in crude sunflower oil, but determined relative content of BaA and BaP was higher (1.5% and 3.2%, respectively) in refined sunflower oil, but DaeP was only in refined sunflower oil.

One of main originating sources of oil contamination during processing is direct drying of seeds, when those come in contact with combustion products. Analysis of rape seeds and its rape seed oils shows that by pressing of oil even by low temperature, the concentrations of PAH more increase (see fig. 6), in comparison with content of PAH in seeds, because concentration of PAH in lipidic part of seed as well extraction from oil pomace occurs.

We studied also the possibility of decrease of PAH content using different purification methods. Results of experiments showed that for reduction of PAH in oils, active carbon can be used, but purification with clay is not particularly efficient because from "heavy" PAH (contains five or more benzene rings) slightly decrease only content of BaP, but others stayed in the same concentrations (see fig. 7).

Purification with clay in rapeseed oils showed good results for reduction of "light" PAH (contains up to four benzene rings). For decrease of "light" PAH active carbon also can be used (see fig. 8).

By treatment of oil with 1.5 % (from oil mass) of active carbon, all PAH decrease was 85 % up to 96 % (see fig. 9). In terms of percentage the highest decrease was observed for BkF, who already after treatment with 0.1% activated carbon reduced for about 14%. Besides before treatment with activated carbon

content of BaP in oil four times exceeded maximum permitted level ( $2.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), but after treatment content of BaP in oil was only  $1.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

However for producers suggested such production and processing methods that not allow contamination with PAH of initial raw material of edible oil.

### **Influence of package on content of PAH on oil**

By evaluation of influence of package on content of PAH in oils, we obtained that filling in PE and putting in darkness and in light the content of PAH in oils slightly decreases, that can be result of surface adsorption of PAH and diffusion inside of polymer.

To verify influence of light and package, commercially available vegetable oil was spiked with PAHs at the levels from  $6.1$  to  $22.1 \mu\text{g kg}^{-1}$  and the contaminated oil was filled into polyethylene (PE), transparent glass and dark glass bottles. The samples were placed in darkness and in light and concentration of 15 EU priority PAHs was tested after 24 h.

Comparison of BaP content in samples in tested packages before and after 24h (see fig. 10) indicates that the concentration of BaP changes did not exceed error limits both in darkness and light in dark glass bottles. A little decrease of BaP concentration was observed in samples packaged in PE bottles both in darkness and light. The greatest one was found with transparent glass bottles in light.

From obtained data can be concluded that concentration of BaP is affected by light but material has little influence in non-transparent package.

The total PAH content was also influenced by light. It remained practically at a constant level in oil samples in dark glass bottle, but reduced in transparent glass and PE bottles in light. Though, by oil storage in PE package both in light and darkness the total PAH content was decreased, that could be result of PAH adsorption on the surface with subsequent diffusion into the bulk of polymer.

Difference between changes in BaP and total PAH contents will indicate to different absorption of individual PAH compounds. The concentrations of PAHs can decrease by diffusion when PAHs migrate to PE matrix. More than in half decrease of PAHs content was observed by PAHs with lower molecular weight - CPP, BaA, CHR and 5MC. For other PAHs decrease after storage of 24 h was from 9 up to 35 percents.

Apparently, the polarity and viscosity of liquid media (in this case of oil) also play an important role as well as other compounds contained in the oil, for example, vitamins and sterols compete with PAHs and affect the diffusion and adsorption of PAHs. Besides, by limited surface adsorption and diffusion, removal of BaP hampers also other PAHs (evidently, PAHs with lower molecular weight).

Probably, the package could be used to diminish content of PAHs in oil, but there are unknown negative effects of sorption that could decrease also the quality of product.

## **Effect of UV irradiation on PAH in smoked fish**

PAHs are mostly concentrated on the skin of smoked fish products (Larsson, 1982) and it is an effective barrier against PAH penetration in the inner tissue (Moret et al., 1999). As well sometimes after smoking process smoked fish products have been hanged in sun for drying (Stolyhwo, Sikorski, 2005), thus we checked sensitivity of PAHs to the photochemical effects of UV irradiation and decrease of PAHs in smoked fish.

In our study smoked fish samples were placed under UV lamp and exposed to UV irradiation 0-15 min. PAH contents in the smoked fish were measured after 1, 2, 5, 10, and 15 min. Significant decrease in carcinogenic PAH content in smoked fish was found (see Fig. 11). After 2 min the decrease of BaP content was already 10%, but residual PAHs in smoked fish samples were from 37 up to 64% after a 15 min treatment. Among the 11 selected PAHs, BaP was found to be the most sensitive to UV radiation

However, by UV irradiation of BaP standard solution, the decrease in BaP concentration was not so quick. After 30 min treatment, the concentration of BaP has dropped by 30%. Apparently, degree of decrease of PAHs depends not only on the duration of exposure, but also on other factors, which can be type and concentration of sample and diffusion of PAHs, that occur not only during the smoking time, but also after finishing of smoking procedure. However, the specific mechanism that controls this process will require further investigation.

Results of investigation shows decrease of PAH concentrations in photochemical reactions. To study this process further investigations are necessary because as shown by using of UV lamp, content of PAH decreased, though it must be considered that in presence of oxidized compounds possible that toxicity can be increased in comparison to original PAH compounds. Besides as these investigations indicate on photounstability of PAH, it must be required to make sure that by storage in light products with high PAH content does not develop other more toxic compounds than PAH.

Our investigations ever researches of other scientists indicates to obtain reproducible results, the samples for PAH analysis must be stored in darkness and during preparation of samples must avoid from light.

## **Content of PAH in smoked meat depending on wood used**

In literature there have been found only limited number of studies devoted to the influence of wood nature on the level of PAH in food. In this research the influence of species of wood on the PAH content in smoked meat has been studied. 10 different wood types and in market available charcoal were used for smoking of meat. Temperature in smoking chamber was maintained 80 °C that was controlled with ventilator and temperature regulator. Smoking time was 5 h.

To compare the content of PAH and relative proportions of single PAHs in smoked samples, in EU Commission Recommendation (2005/108/EC) noticed

PAH were analysed. First, it must be noticed that Table 10 shows that in samples were abundant 12 up to all 15 in EU recommendation listed PAH. The concentrations of PAH generally were higher for PAH with smaller molecular weight ( $m/z$  226 and 228) and were smaller or below detection limit for PAH with the molecular weight  $m/z$  302. Only in samples smoked with spruce all 15 PAH were detected however the concentrations of BaP in all samples were exceeding the maximum permitted limit ( $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) in Europe.

The samples smoked with apple-tree and alder generally contained the smallest concentrations both of individual and of total PAH (see table 7). However concentration of BaP in samples smoked with maple generally was similar in the samples smoked with alder, the total PAH concentration is much higher, due to higher concentrations of CPP, BaA and CHR

Despite the fact that hardwoods including hazel and aspen are recommended for smoking (Kypko, 1969), we obtained high concentrations of BaP in smoked meat using this type of wood (see Table 7). Bird-cherry as well indicated higher BaP concentration in products in comparison with apple-tree and alder.

Lately charcoal is often used as fuel in food processing, including the smoking of meat, besides charcoal sometimes are considered as less hazardous firewood. We performed the smoking using the commercial charcoal as well. Results show that meat smoked with charcoal contains concentrations of BaP similar to the meat smoked with alder, however no dibenzopyrenes were found.

Woods can be mixed in the smoking process to add flavour to meat. One of such wood type used in the smoking process is juniper, which is widely used to improve the flavour and taste of smoked product. We observed that smoking with alder with addition of juniper increases the concentration of BaP and total PAH more than 2 times (see table 7).

One of reasons why softwoods are not advised for use in food smoking could be connected with high content of resin that causes high concentrations of PAH. Materials that contain resin can promote intensive origination of soot and wherewith smoking products can be polluted with PAH. Probably the reason of elevated concentrations of PAH found in meat smoked with plum can be a gum that is present on bole of plum.

The samples smoked with spruce has generally the highest values of individual and total PAH concentrations. That is due to higher concentrations of CPP, BaA, CHR and 5MC in samples smoked with this type of wood. In our study BaP content in meat smoked with spruce was 5 times higher in comparison with smoking with apple. Although percentage of BaP in meat smoked with spruce was less as by using another type of wood the significant quantities of other PAH were found. The total concentration of PAH in samples smoked with spruce was ten times higher as in samples smoked with apple.

## **Changes of benzo(a)pyrene levels in smoked fish depending on smoking oven, location and oven cleaning frequency**

The influence of type of smoking oven, fish location into smoking chamber as well as importance of other factors on content of BaP in products during the production processing was investigated.

Because the total level of benzo(a)pyrene in canned sprats consists of the content of BaP in raw fish, BaP level emerging from smoking process, and benzo(a)pyrene – from oil used for canning, the analysis of raw fish, semi-finished smoked fish, oil before preservation, separately smoked fish and oil from canned sprats were made.

We found that levels of BaP in the raw fish were insignificant. BaP content was under the limit of detection ( $<0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) in 30 different samples of sprats used for canned fish production.

Depending on the used construction of smoking equipment and disposition of fish into the smoking chamber, the average level of benzo(a)pyrene in smoked semi-finished fish (after the smoking stage and before canning) ranged from 0.7 up to  $13.9 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Substantially differs the data obtained of BaP content in smoked fish depending on fish location in oven in different enterprises (see fig. 12). Fish products which were smoked in smokehouses with a ventilator and underneath location of a smoke generating furnace (C), contained the highest BaP levels in comparison to those with a smoke generator or to the electrical smokehouse

The content of benzo(a)pyrene in smoked semi-finished fish products differed substantially depending not only on the type of a smokehouse, but also on fish disposition into the smoking chamber in vertical plane (see fig. 12).

Comparison of BaP concentration in smoked fish by sampling in different places in smokehouses with a smoke generator and with upper input of smoke showed that samples smoked on upper frame contained highest amount of BaP due to its full concentration in incoming smoke. The greatest differences in benzo(a)pyrene content, depending on placement of fish samples, were found in fish samples smoked in the older generation smokehouse (A) with a smoke generator in comparison with the modified smokehouse (B) and Kverner-Bruck smokehouse (D), although between them the greater concentrations of BaP in fish smoked in such type of smokehouse were found in fish samples using smokehouse (B), however probable that could be explained by differences in smoking methods. A higher amount of BaP was also found in fish samples smoked on upper frame of the electrical smokehouse. Alike BaP concentration distribution between smoked fishes sampled in different places in smokehouse (C) with ventilator was higher than in samples from other smokehouses.

Although we observed general tendency towards dependency of BaP content in smoked fish on the construction and operation of a smokehouse as well as on the position of fish in the flux of smoke, the results of samples analysis showed high dispersion of benzo(a)pyrene level in the smoked product even in the same

equipment and at the same fish location. This dispersion could be provoked by differences in fat content in raw fish or by changes in smoke chemical composition during the smoking process. Influence of other unknown factors on the content of contaminants can not be excluded.

Since the smokehouses were cleaned once a week, it can be assumed that the product has been fouled by tar residues from the previous processing. The changes in BaP levels in smoked fish during a week were investigated to verify such hypothesis. Analysis of results showed that the level of carcinogen on 3rd-5th day after smokehouse cleaning had diminished approximately by half. The reduction in BaP levels in smoked fish produced at the end of the week can be explained by the PAH sorption in tar deposits on the walls of the smoking chamber or by some unknown factors.

### **Decrease of PAH content in smoked fish in canned fish in oil and tomato souce**

Another essential factor that affects the concentration of BaP in finished canned fish in oil is a diffusion of benzo(a)pyrene from fish fraction in oil fraction, which could reduce the level of benzo(a)pyrene in fish. By the separate detection of BaP concentration in oil and fish fraction as the result of diffusion the considerable decrease of BaP content in fish fraction was observed. By comparison of BaP content in fish and oil fraction, the content of BaP in oil fraction was found about 11 times higher as analysing the fish fraction separately (see fig. 13).

Wherewith may be supposed, that actually the consumer using smoked fishes as food ingests less content of BaP than total in the product and though the part of oil mass comparatively to fish part in canned sprats are approximately only 1/3 as consequence the oil from canned smoked fish could not be recommended to use in the diet. Because PAH have lipophyle properties and hold on obtained results, it is visible that oil could be used as solvent to extract PAH from contaminated products.

## **CONCLUSIONS**

1. Efficient GC-MS analytical method for determination of PAH content in food products was elaborated. The time-consuming sample preparation method for analysis of fish products can be shortened discarding saponification step and obtaining equivalent results.
2. Using high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for determination of benzo(a)pyrene content the equivalent results can be obtained, besides 4 times decreasing a time for chromatographic analysis, accordingly, that can be used as fast and efficient routine BaP determination method.

3. The data of validation of GC-MS analytical methods indicates that those are effective for PAH determination in smoked meat, fish and oil products.
4. In oil, smoked meat and fish product from market of Latvia the content of total PAH varie from 0.21 to 197  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and the contamination level is not strongly correlated with the type of product. In general in oils, smoked fish and meat products the predominant PAH are with lower molecule mass.
5. The strong correlation between content of BaP and total PAH content for oils, smoked meat and fish products was found.
6. Fish location into smoking chamber as well as type of smoking oven have essential importance on BaP content in smoked products.
7. The most of BaP in canned smoked fish as a result of diffusion moves to oil fraction, wherewith may be supposed, that consumer actually with products of smoked fish in oil ingests less content of BaP than it total content in product. Oil from canned smoked fish could not be recommended to use in the diet.
8. Wood nature has a significant influence on the amount of PAH in smoked meat and it is one of the critical parameter to be controlled in order to diminish the contamination of food products. To avoid from high concentrations of PAH, the application of apple, alder or charcoal in smoking is recommendable.
9. For reduction of PAH in oils, active carbon can be used. By treatment of oil with 1.5 % of active carbon, all PAH decrease was 85 % up to 96 %. Besides the molecule mass and structure of PAH have essential role in absorption.

## **RECOMMENDATIONS FOR MANUFACTURERS**

1. It is recommended to use in smoking oven with smoke generator where is possible to control different technological parameters or electrical smoking oven.
2. To avoid from high concentrations of PAH, the application of apple, alder or charcoal in smoking is recommendable. The use of hazel, plum, aspen or spruce wood as well as adding of juniper to obtain different flavour and taste variations is not recommendable because materials, that contain resins can promote intensive origination of soot and wherewith smoking products can be polluted with PAH.
3. For reduction of BaP and other PAH in oils, active carbon can be used. Purification with clay is efficient only for reduction of „light” PAH (contains up to 4 benzole rings). Production methods that do not admit initial contamination with PAH of raw materials of edible oils are recommended.
4. Meat or fish with lower fat content is recommended to choose for smoking. Maximal concentrations of PAH are observed in products with higher content of fat due to lipophilicity of PAH.