Provjera valjanosti HPLC metode za određivanje benzo(A)pirena u tradicionalnim proizvidima na području Slavonije

Polak, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:471435

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

Ivona Polak

Provjera valjanosti HPLC metode za određivanje benzo(a)pirena u tradicionalnim proizvodima na području Slavonije

Diplomski rad

Osijek, 2018.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

Ivona Polak

Provjera valjanosti HPLC metode za određivanje benzo(a)pirena u tradicionalnim proizvodima na području Slavonije

Diplomski rad

Mentor: doc.dr.sc. Mirela Samardžić

Komentor: doc.dr.sc. Suzana Ćavar, mag.pharm.,spec. analitičke toksikologije

Neposredni voditelj: Andrijana Modic Šabić, mag.ing.proc, univ.spec.oecol

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

PROVJERA VALJANOSTI HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE BENZO(A)PIRENA U TRADICIONALNIM PROIZVODIMA NA PODRUČJU SLAVONIJE

Ivona Polak

Rad je izrađen na: Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije

Mentor: doc.dr.sc. Mirela Samardžić

Sažetak: Validacija analitičke metode je postupak kojim se potvrđuje da je metoda prikladna za namijenjenu svrhu. Ona je regulatorni zahtjev, kao i profesionalna odgovornost analitičara. Ciljevi rada su provesti validaciju HPLC metode za određivanje benzo(a)pirena u tradicionalnim proizvodima i odrediti koncentraciju istoga u uzorcima. Benzo(a)piren je najpoznatiji i najproučavaniji policiklički aromatski ugljikovodik (PAH). Dim nastao tijekom dimljenja sadrži benzo(a)piren, koji se adsorbira na površinu proizvoda. U radu su određivani sljedeći parametri validacije: selektivnost, točnost, linearnost, preciznost, granica detekcije, granica kvantifikacije i područje. Dobiveni rezultati zadovoljavaju postavljene kriterije prihvatljivosti i može se zaključiti da je metoda prikladna za namijenjenu svrhu. Također su određivane i koncentracije benzo(a)pirena u domaćim i industrijskim uzorcima.

Diplomski rad obuhvaća: 68 stranica, 12 slika, 16 tablica, 78 literaturnih navoda

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: benzo(a)piren, parametri validacije, validacija

Rad prihvaćen: 2. listopada 2018.

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. Olivera Galović, doc.dr.sc.

2. Mirela Samardžić, doc.dr.sc.

3. Suzana Ćavar, doc.dr.sc., mag.pharm., spec. analitičke toksikologije

Zamjena: Martina Šrajer Gajdošik, doc.dr.sc.

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD **Diploma Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry; Research Study
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

VALIDATION OF THE HPLC METHOD FOR THE DETERMINATION OF BENZO(A)PYRENE IN TRADITIONAL PRODUCTS IN THE SLAVONIA AREA

Ivona Polak

Thesis completed at: Institute of Public Health for the Osijek Baranja Country

Supervisor: Mirela Samardžić, PhD., assistant prof.

Abstract: Validation of analytical method is a process of proving that the method corresponds to its intended purpose. It is a regulatory requirement as well as the professional responsibility of analyst. The objectives of the paper are to validate the HPLC method for the determination of benzo(a)pyrene in traditional products and to determine their concentration in the samples. Benzo(a)pyrene is the best known and most studied polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH). Smoke developed by smoking contains benzo(a)pyrene which is adsorbed on the surface of the product. The following validation parameters are defined in this paper: selectivity, accuracy, linearity, precision, limit of detection, limit of quantification and area. The obtained results meet the eligibility criteria set, and it can be concluded that the method is suitable for its intended purpose. Concentrations of benzo(a)pyrene in domestic and industrial samples are also determined.

Thesis includes: 68 pages, 12 figures, 16 tables, 78 references

Original in: Croatian

Keywords: Benzo(a)pyrene, validation, validation parameters

Thesis accepted: 2 October 2018

Reviewers:

1. Olivera Galović, Ph.D., assistant prof.

2. Mirela Samardžić, Ph.D., assistant prof

3. Suzana Ćavar, assistant prof., mag.pharm., spec. analytical toxicology

Substitute: Martina Šrajer Gajdošik, Ph.D., assistant prof.

Thesis deposited in: Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED 3
2.1. OSIGURANJE KVALITETE U ANALITIČKOM LABORATORIJU 3
2.2. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA 6
2.2.1. PARAMETRI VALIDACIJE 10
2.3. POLICIKLIČKI AROMATSKI UGLJIKOVODICI (PAH-OVI) 24
2.3.1 PRIRODNI I ANTROPOGENI IZVORI PAH-OVA 26
2.3.2. IZLOŽENOST PAH-OVIMA 28
2.3.3. SVOJSTVA PAH-OVA 31
2.3.4. UKLANJANJE PAH-OVA IZ OKOLIŠA 32
2.4. BENZO(A)PIREN 33
2.5. DIMLJENJE 34
2.6. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI 37
2.7. CILJEVI RADA 38
3. EKSPERIMENTALNI DIO 39
3.1.KEMIKALIJE 39
3.2. OPREMA I PRIBOR 39
3.3. METODA 40
3.4. UVJETI METODE 40
3.5. UZORCI 40
3.6. PRIPREMA KALIBRACIJSKIH OTOPINA I UZORAKA PREMA METODI 40
3.6.1. PRIPREMA KALIBRACIJSKIH OTOPINA 40
3.6.2. PRIPREMA UZORAKA 41
4. REZULTATI I RASPRAVA 42
4.1. KONCENTRACIJA BENZO(A)PIRENA U UZORCIMA 42
4.2. VALIDACIJA ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE BENZO(A)PIRENA HPLC METODOM 43
4.2.1. LINEARNOST 43
4.2.2. PODRUČJE LINEARNOSTI 47
4.2.3. PRECIZNOST 48
4.2.4. GRANICA DETEKCIJE (LOD) 51

4.2.5. SELEKTIVNOST 51
4.2.6. TOČNOST 52
4.3. SAŽETAK REZULTATA VALIDACIJE 54
5. ZAKLJUČAK 55
6. LITERATURA 56
7. PRILOZI 62
7.1. IZRAČUNI KONCENTRACIJA 62

1. UVOD

Tema ovoga diplomskog rada je provjera valjanosti analitičke metode za određivanje benzo(a)pirena u tradicionalnim proizvodima na području Slavonije metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Svakodnevno se vrši preko tisuću analiza i mjerenja u raznim laboratorijima i cilj je svih laboratorija davanje točnih rezultata koji će se moći dalje koristiti za donošenje ispravnih odluka. Svaki odgovorni analitičar provesti će validaciju analitičke metode zbog svoje profesionalne odgovornosti i zbog pružanja pouzdanih i vjerodostojnih rezultata. Opće prihvatljiv propis kako validirati analitičku metodu ne postoji, nego postoje naputci, smjernice i regulatorni zahtjevi. Najopćenitija je definicija validacije da je to postupak kojim se dokazuje da metoda odgovora namijenjenoj svrsi. Kako bi se dokazalo da metoda odgovara namijenjenoj svrsi definiraju se parametri izvedbe i kriteriji njihove prihvatljivosti. Validacija može biti potpuna ili djelomična. U potpunoj validaciji određuju su se svi parametri, a kod djelomične validacije određuju se samo neki parametri koje odabere analitičar ili sam kupac. Nakon usporedbe dobivenih rezultata s unaprijed postavljenim kriterijima prihvatljivosti može se dati izjava da metoda odgovora ili da metoda ne odgovara namijenjenoj svrsi. Validacija metode samo je jedan korak u ukupnom procesu osiguranja kvalitete u laboratoriju.

Brojni laboratoriji svakodnevno vrše rutinske analize uzoraka hrane i voda. Hrana zbog brojnih faktora, poput pripreme, proizvodnje, prerade, skladištenja i dimljenja može biti onečišćena raznim kontaminantima. Kontaminanti smanjuju kvalitetu hrane, ulaze u hranidbeni lanac i dolaze do potrošača kod kojih mogu uzrokovati brojne zdravstvene probleme. Među brojnim kontaminantima nalaze se i policiklički aromatski ugljikovodici (eng. *polycyclic aromatic hydrocarbon*, PAH). Oni predstavljaju veliku skupinu organskih spojeva. Sastoje se od nekoliko spojenih aromatskih prstena koji imaju samo atome ugljika i vodika. Ovisno o broju prstena, razlikuju se „laki“ i teški“ PAH-ovi. Rasprostranjeni su u zraku, tlu, vodi i sedimentima zbog velikog broja prirodnih i antropogenih izvora. Daleko najpoznatiji i najproučavaniji PAH je benzo(a)piren (B(a)P). On nastaje tijekom nepotpunog sagorijevanja ili pirolize organskih tvari.

Slavonija je široko poznata po svojim tradicionalnim proizvodima, koji su od iznimne važnosti za regiju Slavonije i Baranje. Da bi se stvorila karakteristična lijepa i

poželjna zlatno-smeđa boja, meso i mesni proizvodi izlažu se dimu. Proizvodi koji su podvrgnuti toplinskom procesu dimljenja i sušenja izloženi su utjecaju i mogućnosti kontaminacije benzo(a)pirenom. Brojni postupci obrade hrane, kao što su pečenje, prženje, roštiljanje i kuhanje također predstavljaju glavne izvore kontaminacije hrane benzo(a)pirenom te je zbog toga potrebno poduzeti određene mjere tijekom pripreme i proizvodnje hrane kako bi se kontaminacije svele na minimum.

Svrha je ovoga diplomskog rada provjeriti valjanost HPLC metode za određivanje benzo(a)pirena u masnoj hrani. Eksperimentalni dio je proveden u Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije. Uzorci su bili domaći i industrijski tradicionalni proizvodi. Analizirano je 9 domaćih proizvoda (kobasice, šunka i slavonski kulen, koji je zaštitni znak Slavonije) i 6 industrijskih proizvoda (kulen, kulen kvrgavi, slavonska salama, kulenova seka, seljačka šunka i kobasica).

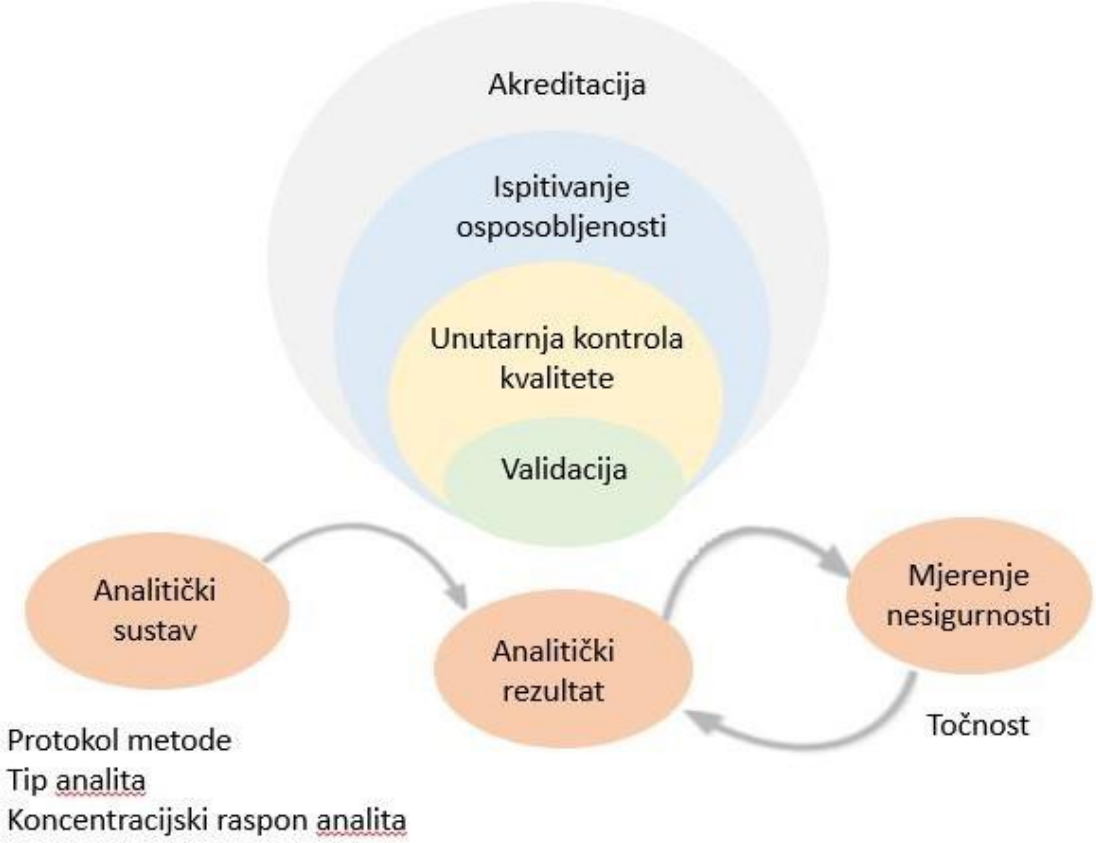
2. LITERATURNI PREGLED

2.1. OSIGURANJE KVALITETE U ANALITIČKOM LABORATORIJU

Kvaliteta je relativan pojam: nikad visoka ili niska u potpunom smislu, nego prije adekvatna ili neadekvatna s obzirom zadovoljava li proizvod, proces ili usluga unaprijed određene uvjete od strane cilja ili potrošača [1]. Osiguranje kvalitete analitičkog laboratorija opisuje sve one mjere koje se primjenjuju u laboratoriju kako bi se osigurao kvalitetan rad koji osigurava pouzdane i vjerodostojne rezultate analize [2]. Temeljni je element u produciranju vjerodostojnih, reproducibilnih i pouzdanih rezultata. Postavke osiguranja kvalitete implementiraju se u rad laboratorija kroz izrađene radne postupke koji obuhvaćaju sve segmente rada laboratorija – od uzorkovanja do ispitnog izvještaja. Svi postupci sustava kvalitete moraju biti temeljeni na sljedivosti. To znači da se svaki postupak, podatak ili rezultat mora moći provjeriti [2]. Osiguranje kvalitete je kontinuirani proces poboljšanja rada koji ima za cilj otkrivanje pogrešaka, pronalaženje rješenja i pravovremeno poduzimanje popravnih, odnosno zaštitnih radnji. Navedeni cilj je moguće postići kroz redovite, unutarnje i vanjske ocjene sustava kvalitete, redovitim ispitivanjem osposobljenosti laboratorija (eng. *Proficiency Testing*), pravilnim definiranjem i primjenom interne kontrole kvalitete te jasnim definiranjem ovlasti i odgovornosti svih djelatnika laboratorija, a osiguranje kvalitete analitičkog laboratorija odgovornost je svih njegovih djelatnika [2].

Različite razine osiguranja kvalitete u analitičkom laboratoriju prikazane su na slici 1. One predstavljaju različite mjere koje laboratorij mora poduzeti kako bi bio sposoban i kvalificiran za obavljanje analitičkih mjerenja [3]. Validacija analitičkih metoda prva je razina u osiguranju kvalitete rada laboratorija [3].

Laboratorij također može provoditi i unutarnju kontrolu kvalitete te može sudjelovati u ispitivanju osposobljenosti, a akreditacija je zadnji korak u osiguranju kvalitete.



Slika 1. Različite razine osiguranja kvalitete u analitičkom laboratoriju

Kvaliteta znanstvenih informacija u cjelini ocjenjuje se međunarodno prihvaćenim standardima objektivnosti, integriteta, ponovljivosti i sljedivosti. Osnovni kriteriji za kvalitetu kemijskih rezultata su korisnost i pouzdanost, koji su međusobno povezani i pokazuju pouzdanost rezultata mjerenja, što se tiče identiteta i koncentracije ciljnih komponenti [1].

Ključni aspekt pouzdanosti ili validnosti rezultata je da su oni usporedivi, bez obzira na podrijetlo. Usporedivost između rezultata u užem smislu je pružena praćenjem odgovarajućih standarda [4].

Kvaliteta rezultata odražava adekvatnost ili neadekvatnost metode u smislu opsega u kojemu metoda ispunjava svoje zahtjeve ili odgovara za vlastitu određenu analitičku svrhu. Kvaliteta je uvijek relativan pojam, koji se odnosi na zahtjeve određene unaprijed na osnovi nacionalnih ili internacionalnih regulacija ili klijentovih potreba. Potreba za pouzdanošću analitičkih podataka naglašena je činjenicom da će rezultati mjerenja biti korišteni i mogu

činiti osnovu za donošenje odluka. Nepouzdani rezultati donose visok rizik za krivo odlučivanje i mogu dovesti do većih troškova, rizika za zdravlje ili ilegalnih praksi [4].

Agencije za standardizaciju, radne skupine ili povjerenstva i regulatorna tijela koja daju smjernice za različite razine osiguranja kvalitete prikazana su u tablici 1 [3].

Tablica 1. Pregled europskih i međunarodnih regulatornih tijela, njihovih smjernica i standarda

TIJELO	**PUNI NAZIV**	**SMJERNICE**
Eurachem	Europska udruga kemijskih laboratorija	Validacija metode
CITAC	Suradnja na međunarodnoj sljedivosti u analitičkoj kemiji	Ispitivanje sposobnosti Osiguravanje kvalitete
EA	Europska organizacija za akreditaciju	Akreditacija
CEN	Europski odbor za normizaciju	Standardizacija
IUPAC	Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju	Validacija metode
ISO	Međunarodna organizacija za standardizaciju	Standardizacija
AOAC	Međunarodno udruženje službenih analitičkih kemičara	Unutarnja kontrola kvalitete Ispitivanje sposobnosti Akreditacija
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove	Validacija metode
USP	Američka farmakopeja	
ICH	Međunarodna konferencija o harmonizaciji	
FAO/WHO	Organizacija za hranu i poljoprivredu/ Svjetska zdravstvena organizacija	Validacije metode
Codex/CCMAS	Codex odbor za metode analize i uzorkovanja	
ILAC	Međunarodna organizacija za akreditaciju laboratorija	Ispitivanje sposobnosti Akreditacija

2.2. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA

Važnost validacije metode naglašena je još kasnih 40-ih godina, kada su Američko kemijsko društvo i Merck & Co. podigli svijest o tome kako su matematika i statistika nužni preduvjeti uspješnih razvoja i prilagodbi novih analitičkih metoda. U ranim 70-im godinama objavljen je niz članaka u kojima se naglašava potreba provedbe dosljednog skupa definicija za utvrđivanje karakteristika razvijenih analitičkih metoda te potreba za usporedbom njihovih prednosti i nedostataka zbog velikog broja novih analitičkih metoda. Riječ validacija potječe od latinske riječi *validus* što znači *jak* i sugerira da je nešto dokazano kao istinito, korisno i prihvatljivog standarda [5].
Opće prihvatljiv propis kako validirati analitičku metodu ne postoji, nego postoje smjernice, regulatorni zahtjevi i naputci. Prema normi ISO 9000 validacija analitičke metode je postupak kojim se potvrđuje da je metoda prikladna za namijenjenu svrhu [6]. Ona je regulatorni zahtjev kao i profesionalna odgovornost analitičara [7]. Prilikom validacije metode definiraju se analitički parametri validacije koji moraju biti zadovoljeni u svrhu dokazivanja njene prikladnosti [3].

Cilj validacije analitičke metode je osigurati da svako buduće mjerenje u rutinskoj analizi bude dovoljno blizu pravoj vrijednosti sadržaja analita u uzorku. U skladu s tim, ciljevi validacije nisu samo dobivanje procjene istinitosti ili odstupanja i preciznosti već također i dobivanje procjene rizika koji se mogu izraziti mjernom nesigurnošću povezanom s rezultatom [8].

Rezultati validacije analitičke metode često se daju kao podatci o ponovljivosti ili reproducibilnosti, a obično kao standardna devijacija ili relativna standardna devijacija [9].

Metoda se validira kada je potrebno dokazati da su njezine karakteristike prikladne za određenu svrhu. U točki 5.4.5.2 HRN EN ISO/IEC 17025: 2007 stoji da laboratorij mora validirati:

- nestandardne metode;
- metode koje je laboratorij sam razvio;
- standardne metode koje se primjenjuju izvan svog opsega rada;
- izmijenjene standardne metode.

Validacija metode mora biti koliko opsežna koliko je potrebno da se zadovolje zahtjevi vezani uz zadanu upotrebu ili danu primjenu. Opseg validacije ovisi o primjeni, prirodi

izmjena te o okolnostima u kojima će se metoda provoditi. Validacija je također potrebna kada je potrebno pokazati istovrijednost rezultata dobivenih dvjema metodama, npr. novo razvijenom metodom i postojećom standardnom/regulatornom metodom [6].

Koraci validacije uključuju izradu validacijskoga protokola s podrobnim uputama, korak po korak te:

• definiciju svrhe i opsega korištenja metode;
• definiranje parametara izvedbe i njihovih granica prihvatljivosti;
• definiranje validacijskih eksperimenata;
• definiranje svojstava opreme;
• definiranje kvalitete kemikalija i analitičkih standarda;
• izvođenje predvalidacijskih ispitivanja u cilju prilagođavanja granica prihvatljivosti;
• izvođenje validacijskih eksperimenata;
• definiranje detalja metode za njezinu uobičajenu primjenu;
• definiranje parametara i granica testa prikladnosti sustava;
• dokumentiranje validacijskih eksperimenata i izradu validacijskoga izvještaja [7].

Metoda ispitivanja se smatra validiranom kada ispunjava kriterije prihvatljivosti iz validacijskog protokola [10]. Općenito se validacijski kriteriji i sama svrha metode definiraju na početku i moraju odgovoriti na sljedeća pitanja: kakvi će se analiti detektirati?, postoje li interferirajuće supstancije?, kakav je matriks uzorka?, koje su očekivana preciznost i točnost?, koje su očekivane koncentracijske razine i rasponi?, koje su granice detekcije i kvantifikacije?, kolika je postojanost metoda?, koja znanja i vještine pretpostavljeni korisnici moraju imati?, koje je specifične regulatorne zahtjeve potrebno zadovoljiti?, može li se koristiti slična oprema različitih proizvođača ili je nužan specifičan instrument? [11].

Ovisno o svrsi primjene analitičkih metoda koje je potrebno validirati, one se mogu podijeliti u četiri osnovne grupe, a to su:

1. identifikacijski testovi;
2. kvantitativni testovi određivanja sadržaja onečišćenja;
3. limit testovi za kontrolu onečišćenja;
4. kvantitativni testovi određivanja sadržaja analita u uzorku [12].

U tablici 2. navedeni su parametri validacije koji se moraju odrediti za pojedinu vrstu analitičke metode.

Tablica 2. Parametri validacije i vrste analitičkih metoda

Parametri	Identifikacija	Analiza onečišćenja		Određivanje
		Kvantitativna	Limit test	sadržaja
Točnost	-	+	-	+
Preciznost				
Ponovljivost	-	+	-	+
Međupreciznost	-	+	-	+
Specifičnost	+	+	+	+
Granica detekcije	-	-	+	-
Granica kvantifikacije	-	+	-	-
Linearnost	-	+	-	+
Područje	-	+	-	+

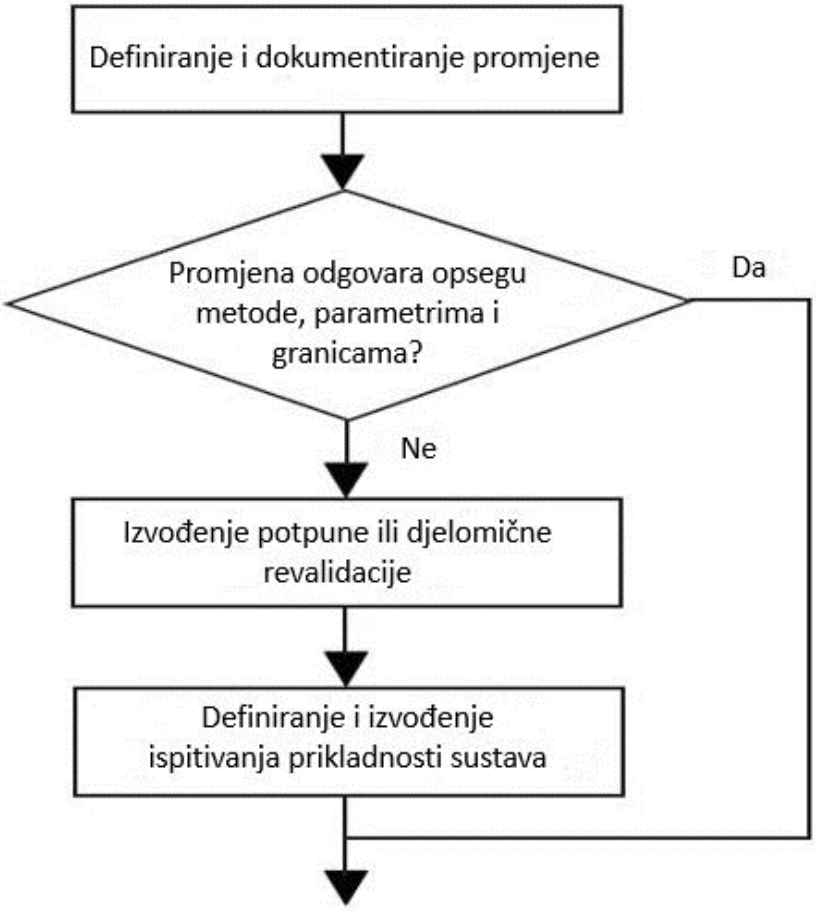
(-) parametar se normalno ne procjenjuje (+) parametar se normalno procjenjuje

Testovi identifikacije imaju za cilj potvrditi prisutnost analita u uzorku. Obično se postižu uspoređivanjem svojstva uzorka (npr. spektar, kromatografsko ponašanje, kemijska reaktivnost, itd.) s referentnim standardom. Analiza onečišćenja može biti kvantitativni test ili limit test za nečistoću u uzorku. Oba su ispitivanja namijenjena za točno određivanje čistoće uzorka. Testovi određivanja sadržaja su namijenjeni za mjerenje prezentiranog analita u danom uzorku [12]. Tijekom validacije koriste se uzorci i standardne supstancije koje su slične uzorcima koji će se rutinski analizirati u laboratoriju [7]. Provjera valjanosti metode provodi se jednom ili u relativno rijetkim intervalima tijekom radnog vijeka metode [13].

Svo utrošeno vrijeme i uloženi novac u procesu validacije zapravo su investicija koja će se višestruko isplatiti tijekom dugoročnoga korištenja metode pružajući sigurnost analitičarima i vjerodostojnost njihovim rezultatima [14].

Vrlo vjerojatno će se neki parametri metode morati promijeniti ili prilagoditi tijekom životnog vijeka metode, ako kriteriji metode ne budu unutar prihvatljivih kriterija. Stoga se radi revalidacija koja je potrebna kad god se promijeni metoda, a novi parametar bude izvan radnog raspona. Na primjer, ako je određeni radni raspon temperature kolone između 30 i 40°C, metoda mora biti revalidirana ako iz bilo kojeg razloga novi parametar

iznosi 41°C. Svaki put kada postoji promjena koja može zahtijevati djelomičnu ili potpunu revalidaciju, promjena treba biti praćena dokumentiranom promjenom upravljačkog sustava. Promjena treba biti definirana, autorizirana za izvršenje i dokumentirana, kao što je prikazano na slici 2. [15]. Moguće promjene mogu uključivati nove uzorke s novim spojevima ili novim matricama, nove analitičare s različitim vještinama, nove instrumente s različitim karakteristikama, nova mjesta s različitim okolišnim uvjetima, nove kemikalije i/ili referentne standarde i modifikaciju analitičkih parametara [16].



Slika 2. Dijagram toka revalidacije

2.2.1. PARAMETRI VALIDACIJE

U ranim 80-im godinama pokazalo se da su definicije parametara validacije metode različite između postojećih organizacija. 1990. godine osnovana je ICH kao jedinstveni projekt okupljanja regulatornih tijela Europe, Japana i Sjedinjenih Američkih Država s ciljem postizanja veće usklađenosti parametara, zahtjeva i također, metodologije za validaciju analitičkih metoda [5]. Laboratorij odlučuje koje parametre izvedbene metode će karakterizirati kako bi se validirala metoda. Karakterizacija izvedbe metode je skup proces i neizbježno je ograničena vremenom i troškovima [17]. Nije potrebno za svaku uporabu metode ispitati sve radne značajke, već samo one koje su bitne za tu metodu [18].

Da bi metoda bila prikladna za namjeravanu svrhu, mora zadovoljavati određene parametre validacije [19].

Parametri validacije analitičke metode (značajke metode) su:

- selektivnost/specifičnost (eng. *Selectivity*/*Specificity*);
- linearnost (eng. *Linearity*);
- radno područje (eng. *Working range*);
- preciznost (eng. *Precision*);
    - ponovljivost (eng. *Repeatability*);
    - međupreciznost (eng. *Intermediate Precision*);
    - obnovljivost (eng. *Reproducibility*);
- istinitost (eng. *Trueness*);
- granica detekcije (eng. *Limit of detection, LOD*);
- granica kvantifikacije (eng. *Limit of quantification, LOQ*);
- točnost (eng. *Accuracy*);
- postojanost (eng. *Robustness*) [1].

2.2.1.1. SELEKTIVNOST/SPECIFIČNOST

Specifičnost/selektivnost definira se kao svojstvo metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti svih ostalih komponenata u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja [20]. Pojmovi selektivnost i specifičnost često se koriste kao istoznačnice.

Specifična metoda je ona metoda kojom se može odrediti samo jedan analit u prisutnosti ostalih komponenti, a selektivna metoda je ona metoda kojom se može odrediti veći broj kemijskih komponenti koje se mogu ili ne moraju razlikovati od drugih komponenti. Selektivnost i specifičnost su mjere pouzdanosti mjerenja u prisutnosti smetnji. Prema Eurachemu, specifičnost i selektivnost veoma su blisko povezane jedna s drugom na takav način da specifičnost znači 100% selektivnosti. Drugim riječima, metoda može biti specifična, ako je 100% selektivna [3]. IUPAC potiče upotrebu pojma selektivnosti umjesto specifičnosti [19]. Aspekt selektivnosti koji treba uzeti u obzir je da analit može postojati u uzorku u više oblika (slobodni, kompleksirani, anorganski, organometalni ili mogućnost prisutnosti u različitim oksidacijskim stanjima, npr. kromov ion u Cr^{3+} ili Cr^{6+} stanju) [15].

Selektivnost/specifičnost koriste se kod testova identifikacije, testova čistoće i kod ispitivanja sadržaja analita u uzorku. Testovi identifikacije osiguravaju identitet analita u uzorku, testovi čistoće služe za određivanje nečistoća analita, a ispitivanje sadržaja omogućuje točnu izjavu o sadržaju određenog analita u uzorku [21].

Dokazuje se usporedbom odziva metode na referentni materijal i analit u uzorku [7].

Kod kromatografskih metoda najčešće se koriste tri pristupa za mjerenje selektivnosti, a to su:

1. usporedba dobivenih kromatograma slijepe probe i slijepe probe s analitom;

2. usporedba kromatografskog odgovora otopine bez mogućih interferenata i otopine s mogućim interferencijama;

3. analiza certificiranih referentnih materijala [5].

Selektivnost je najizazovnije ostvariti, no ona je ključno svojstvo metode. Ukoliko nije zadovoljena, zahtijeva se ponovna optimizacija kromatografskih parametara (sastav mobilne otopine, vrsta kolone itd.) odnosno razvoj metode [29].

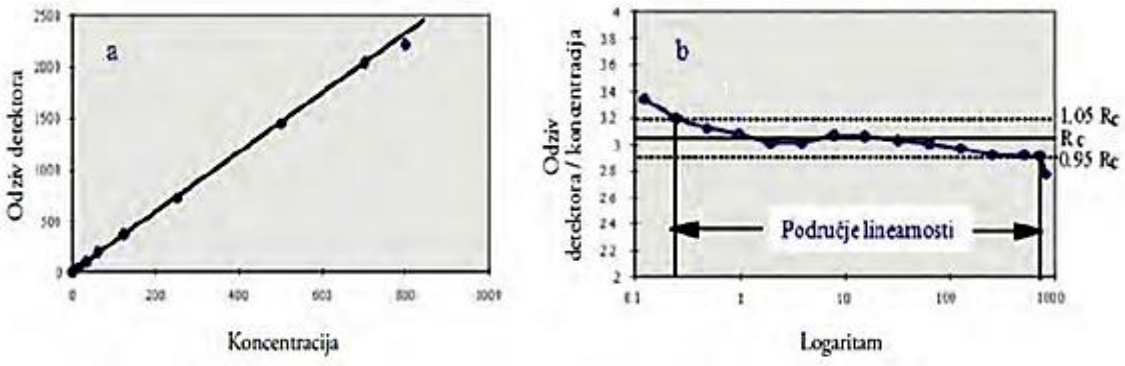
2.2.1.2. LINEARNOST

ICH definira linearnost metode kao njezinu sposobnost da unutar radnog područja daje ispitne rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku [22]. Može se ispitati primjenom standardnih otopina ili slijepim probama [23]. Test linearnosti potvrđuje da su sve otopine uzorka u koncentracijskom području u kojemu je odgovor detektora linearno proporcionalan koncentraciji. Obično se provodi na pet koncentracijskih razina u željenome radnom području metode (za određivanje sadržaja 80% - 120% ciljne koncentracije, za određivanje onečišćenja LOQ – 150% od granice specifikacije). Ponekad se zna dogoditi da metoda možda ne pokazuje željenu razinu linearnosti, a razlozi tome mogu biti u samoj pripremi uzorka – pipetiranju, otapanju, vaganju, uporabi kvalitetnoga volumetrijskog posuđa izvan temperature umjeravanja [11].

Linearnost se procjenjuje matematički i grafički. Matematički se procjenjuje preko linearne regresije pri čemu se izrazi jednadžba pravca ($y = ax + b$) i izračuna koeficijent korelacije (k). Nagib pravca (a) parametar je koji izravno ukazuje na osjetljivost metode, a odsječak pravca (b) može ukazivati na sustavnu pogrešku. Za koeficijent korelacije uobičajeno se postavlja kriterij $k \geq 0{,}99$, no za vrlo niske koncentracije prihvaća se kriterij $k \geq 0{,}98$ [7]. Neki parametri se mogu odrediti iz istoga validacijskog eksperimenta. Na primjer, iz regresijskog pravca mogu se odrediti granice detekcije i kvantifikacije [11].

Grafički prikazi ovisnosti signala o koncentraciji analita važni su zbog mogućnosti vizualnog nadzora. Najčešće se upotrebljavaju dva načina grafičkog prikaza:

- grafički prikaz odstupanja od regresijskog pravca prema koncentraciji ili logaritmu koncentracije – za linearna područja odstupanja jednoliko raspoređena između pozitivnih i negativnih vrijednosti (slika 3a);
- grafički prikaz relativnih signala (omjer signala i odgovarajuće koncentracije) na osi y i odgovarajućih koncentracija na osi x log skale. Dobivena linija treba biti vodoravna u cijelome linearnom području, a područje linearnosti prestaje biti vodoravno pri koncentracijama gdje linija relativnog odziva siječe paralelne linije koje odgovaraju 95 postotnoj ili 105 postotnoj koncentraciji (slika 3b) [7].

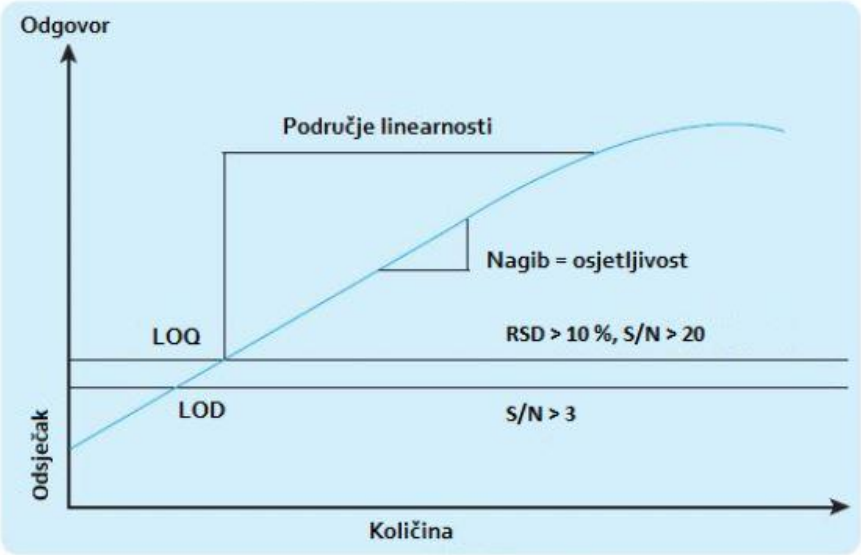


Slika 3. Grafički prikazi linearnosti

Kao dokaz linearnosti navode se jednadžba regresijskog pravca i koeficijent korelacije te se prilaže grafički prikaz.

2.2.1.3. RADNO PODRUČJE

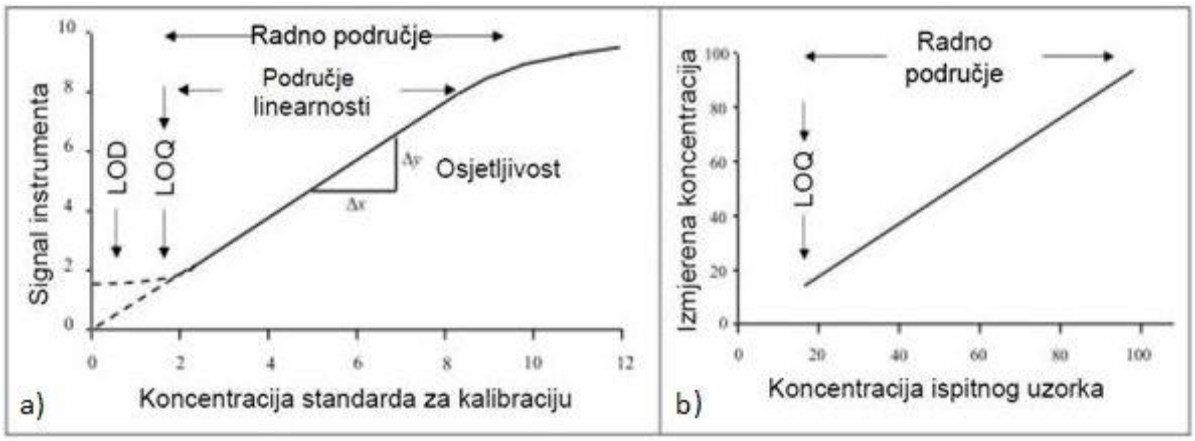
Radno područje se definira kao raspon između gornje i donje koncentracijske granice analita (granice su uključene) u uzorku koje se mogu kvantificirati uz odgovarajuću preciznost, istinitost i linearnost [7]. Tijekom validacije potrebno je potvrditi da se metoda može koristiti unutar tog intervala. Kako bi laboratorij procijenio radno područje treba uzeti u obzir i linearnost i predloženi postupak kalibracije navedene u metodi [6]. Za određivanje područja nije potrebno provoditi zasebne eksperimente, nego se zaključci izvode iz studije linearnosti [7]. Na slici 4. prikazan je odnos područja i linearnosti [22].



Slika 4 . Grafički prikaz definicija linearnosti i područja

Područje se normalno izražava u istim jedinicama, kao i rezultati ispitivanja dobivenih analitičkom metodom [22].

Postoje dva tipa područja – radno područje instrumenta i radno područje metode. Radno područje metode, s obzirom na opseg metode, odnosi se na koncentracije u laboratorijskom uzorku. Radno područje instrumenta definirano je prema koncentraciji u prerađenom testnom uzroku koji se predaje uređaju na mjerenje. Radno područje instrumenta prikazano je na slici 5a, gdje je grafički prikazana ovisnost koncentracija kalibracijskih standarda o signalu instrumenta. Radno područje metode prikazano na je slici 5b gdje je grafički prikazana ovisnost poznatih koncentracija uzoraka o izmjerenim koncentracijama [6].



Slika 5. a) krivulja odziva dobivena instrumentalnom metodom. Određeni su sljedeći parametri: radno područje, područje linearnosti, osjetljivost, LOD i LOQ; b) krivulja dobivena mjerenjem ispitnog uzorka

ICH zahtjeva da minimalni specificirani raspon za analize bude između 80% i 120% ispitne koncentracije, a za određivanje nečistoće zahtjeva da se raspon proširi od limita kvantifikacije ili od 50% specifikacije od svake nečistoće, što god je veće, pa do 120% specifikacije [15].

2.2.1.4. PRECIZNOST

Preciznost se definira kao izraz slaganja između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima [7].
Ovisno o uvjetima u kojima se preciznost određuje razlikuju se:

- *preciznost pod uvjetima ponovljivosti ili ponovljivost* – pri čemu uvjeti uključuju jedan laboratorij, istu aparaturu, istog analitičara i kratko razdoblje;
- *međupreciznost* – preciznost koja se ostvaruje unutar istog laboratorija u duljem razdoblju uz očekivane promjene nekih uvjeta (različiti analitičari, različiti instrumenti, različite kolone, reagensi iz različitih boca i različitih dobavljača);
- *preciznost pod uvjetima obnovljivosti ili obnovljivost* – uvjeti uključuju različite laboratorije i ovaj se parametar određuje u svrhu normiranja metode [7].

Ponovljivost treba procijeniti pomoću najmanje devet određivanja koja pokrivaju navedeni raspon za postupak (na primjer, tri koncentracije/tri ponavljanja svake koncentracije) ili pomoću najmanje šest određivanja na 100% ispitne koncentracije [24].

Međupreciznost se određuje usporedbom rezultata metode unutar jednog laboratorija tijekom nekoliko dana. Cilj međupreciznosti je potvrditi da će isti laboratorij pružati iste rezultate nakon što je faza razvoja metode gotova.

Obnovljivost analitičke metode određuje se analizom alikvota iz homogenih smjesa u različitim laboratorijima s različitim analitičarima [22].

U tablici 3. prikazane se preporučene razine preciznosti.

Tablica 3. Preporučene razine preciznosti [19]

Komponenta izmjerena u uzorku	Preciznost
≥ 10,0%	2%
1,0 do 10,0%	5%
0,1 do 1,0%	10%
< 0,1%	20%

Preciznost se obično izražava kao standardna devijacija (eng. *standard deviation*, SD), relativna standardna devijacija (eng. *relative stadnard deviation*, RSD) ili kao koeficijent varijacije te kao raspon pouzdanosti srednje vrijednosti [25].

Standardna se devijacija može izračunati prema sljedećoj jednadžbi (1)

$$S = \sigma = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}(x_i - \bar{x})^2} \quad (1)$$

gdje je:

$S = \sigma$ = standardna devijacija;

N = broj mjerenja;

x_i = i-ti uzorak;

$\bar{x}$ = srednja vrijednost uzoraka.

Standardna devijacija ima istu mjernu jedinicu kao i svojstvo koje se mjeri. Kvadrat standardne devijacije naziva se varijanca (s^2).

Postotna relativna standardna devijacija je pouzdaniji izraz preciznosti i računa se prema jednadžbi (2).

% relativna standardna devijacija (RSD) = $S \cdot 100 / x$ (2).

Preciznost se treba odrediti korištenjem homogenih, autentičnih uzoraka. Međutim, ako nije moguće dobiti homogeni uzorak može se odrediti uporabom umjetno pripremljenih uzoraka ili otopine uzorka [21].
Najčešće se radi po tri ponavljanja na nekoliko koncentracijskih razina koji se, naravno, poklapaju s područjem linearnosti. Kriteriji prihvatljivosti ovise o vrsti analize, matrici

uzorka i koncentraciji analita koji se određuje [7]. U tablici 4. nalaze se kriteriji prihvatljivosti za ponovljivost, ovisno o koncentraciji analita u uzorku prema AOAC. U tablici 5. nalaze se kriteriji prihvatljivosti za obnovljivost, ovisno o koncentraciji analita u uzorku [26].

Tablica 4. Kriteriji prihvatljivosti za ponovljivost metode ovisno o koncentraciji analita

Analit (%)	**Omjer analita**	**RSD (%)**
100	1	1,3
10	10^{-1}	1,8
1	10^{-2}	2,7
0,1	10^{-3}	3,7
0,01	10^{-4}	5,3
0,001	10^{-5}	7,3
0,0001	10^{-6}	11
0,00001	10^{-7}	15
0,000001	10^{-8}	21
0,0000001	10^{-9}	30

Tablica 5. Kriteriji prihvatljivosti za obnovljivost metode ovisno o koncentraciji analita

Analit (%)	**Omjer analita**	**RSD (%)**
100	1	2
10	10^{-1}	3
1	10^{-2}	4
0,1	10^{-3}	6
0,01	10^{-4}	8
0,001	10^{-5}	11
0,0001	10^{-6}	16
0,00001	10^{-7}	22
0,000001	10^{-8}	32
0,0000001	10^{-9}	45

2.2.1.5. ISTINITOST

Istinitost metode definira se kao stupanj podudaranja između stvarne, tj. prihvaćene referentne vrijednosti, i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta [7]. Određuje se nakon određivanja linearnosti, preciznosti i selektivnosti, najmanje tri puta za najmanje tri koncentracijske razine koje se nalaze unutar radnog područja metode, uključujući koncentraciju na granici kvantifikacije [7].

Istinitost metode moguće je procijeniti na nekoliko načina:

- usporedbom rezultata ispitivane metode s rezultatima dobivenim uhodanom referentnom metodom;
- cijepanjem matrice ili uzorka poznatom koncentracijom referentnog materijala;
- analizom uzorka poznate koncentracije, npr. certificiranoga referentnog materijala i usporedbom izmjerenih rezultata i certificiranih vrijednosti [7].

Rezultati se mogu prikazati grafički kao odnos teorijske (očekivane) vrijednosti prema izmjerenoj koncentraciji, ali obvezatno kao srednje iskorištenje. Iskorištenje metode ovisi o matrici uzorka, koncentraciji analita i postupku uzorkovanja [7].
U tablici 6. nalaze se kriteriji prihvatljivosti za iskorištenje analitičke metode, ovisno o koncentraciji analita prema AOAC [26].

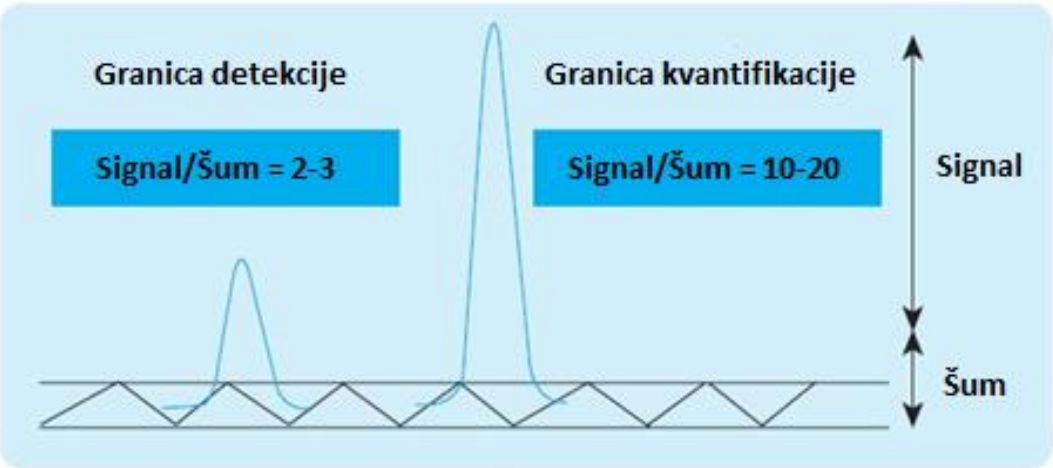
Tablica 6. Kriteriji prihvatljivosti za iskorištenje analitičke metode, ovisno o koncentraciji analita [26]

Analit (%)	**Omjer analita**	**Jedinica**	**Srednje iskorištenje (%)**
100	1	100%	98-102
≥ 10	10^{-1}	10%	98-102
≥ 1	10^{-2}	1%	97-103
≥ 0,1	10^{-3}	0,1%	95-105
0,01	10^{-4}	100 ppm (mg/kg)	90-107
0,001	10^{-5}	10 ppm (mg/kg)	80-110
0,0001	10^{-6}	1 ppm (mg/kg)	80-110
0,00001	10^{-7}	100 ppb (µg/kg)	80-110
0,000001	10^{-8}	10 ppb (µg/kg)	60-115
0,0000001	10^{-9}	1 ppb (µg/kg)	40-120

Istinitost se kvantitativno navodi u smislu "sustavne pogreške" (eng. *bias*), a manja sustavna pogreška ukazuje na veću istinitost. Sustavna pogreška se obično određuje uspoređujući odgovor metode s referentnim materijalom poznate vrijednosti [13].

2.2.1.6. GRANICA DETEKCIJE I GRANICA KVANTIFIKACIJE

Nema analitičkog pojma ili parametra za koji postoji veći izbor terminologije i formulacija, nego za granicu detekcije i granicu kvantifikacije [3]. Granica detekcije definirana je kao najmanja koncentracija nekog analita u uzorku koja se može detektirati (dokazati), ali ne i nužno kvantificirati [5]. Ona se može procijeniti na više načina ovisno o tome je li metoda instrumentalna ili neinstrumentalna. Prvi način procjene je vizualna evaluacija. Vizualna evaluacija se može koristiti kod neinstrumentalnih metoda i kod instrumentalnih metoda. Granica detekcije određena je analizom uzoraka poznate koncentracije analita i utvrđivanjem minimalne koncentracije pri kojoj se analiti mogu pouzdano otkriti. Drugi način procjene je preko omjera signala i šuma. Određivanje omjera signala i šuma provodi se uspoređivanjem izmjerenih signala uzoraka s poznatim niskim koncentracijama analita sa slijepim probama. Omjer signal/šum za granicu detekcije je: 2:1 ili 3:1 [21]. Na slici 6. prikazane su grafičke evaluacije LOD i LOQ kroz omjere signala i šuma [22].



Slika 6. Omjeri signal/šum granice detekcije i granice kvantifikacije

Treći način procjene je na bazi standardne devijacije signala i nagiba kalibracijskog pravca. LOD se može izračunati prema jednadžbi (3):

$$LOD = \frac{3{,}3\ \sigma}{S} \qquad (3),$$

gdje je:

S - nagib kalibracijskog pravca [21].

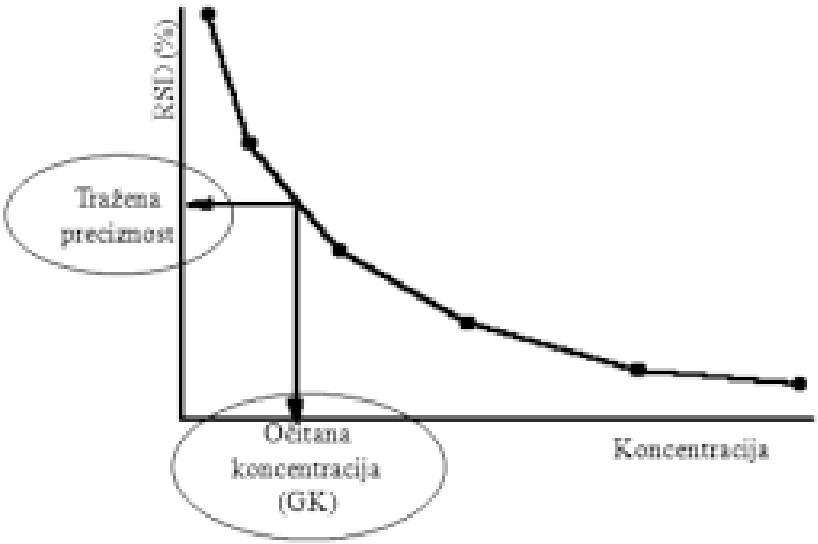
Granica kvantifikacije definirana je kao najniža koncentracija ili količina nekog analita u uzorku koja se može odrediti s prihvatljivom razinom preciznosti i točnosti [5].

Važan je parametar kvantitativnih testova za niske koncentracije analita u uzorcima te se također određuje kod metoda za određivanje produkata razgradnje i/ili određivanja nečistoća [21]. Općenito se određuje analizom uzoraka poznate koncentracije analita i utvrđivanjem minimalne koncentracije na kojoj se analit može kvantificirati sa zadovoljavajućom točnošću i preciznošću [22]. Zadovoljavajuća je preciznost LOQ-a ako odziv detektora u šest priprema analita ima relativnu standardnu devijaciju ispod 20%, a točnost je zadovoljavajuća ako iskorištenje bude unutar 75% - 125% [11].

LOQ uvijek ima veću vrijednost nego LOD [3]. Kao i granica detekcije, granica kvantifikacije se može procijeniti pomoću vizualne evaluacije, na temelju omjera signal/šum te na bazi standardne devijacije signala i nagiba kalibracijskog pravca. Tipični omjer signala i šuma za granicu kvantifikacije je 10:1. Jednadžba (4) prema kojoj se LOQ računa je:

$$LOQ = \frac{10\ \sigma}{S} \qquad (4).$$

Ako se zahtijeva da metoda ima zadanu preciznost na granici kvantifikacije, pripremi se više uzoraka koncentracije u području oko moguće granice kvantifikacije. Svaki uzorak se izmjeri 5-6 puta te se izračuna RSD za svaku koncentraciju. Slika 7. prikazuje grafički odnos RSD-a i koncentracija te se iz grafa odredi koncentracija na granici kvantifikacije s točno određenom preciznošću [7].



Slika 7. Određivanje granice kvantifikacije s određenom preciznošću

2.2.1.7. TOČNOST

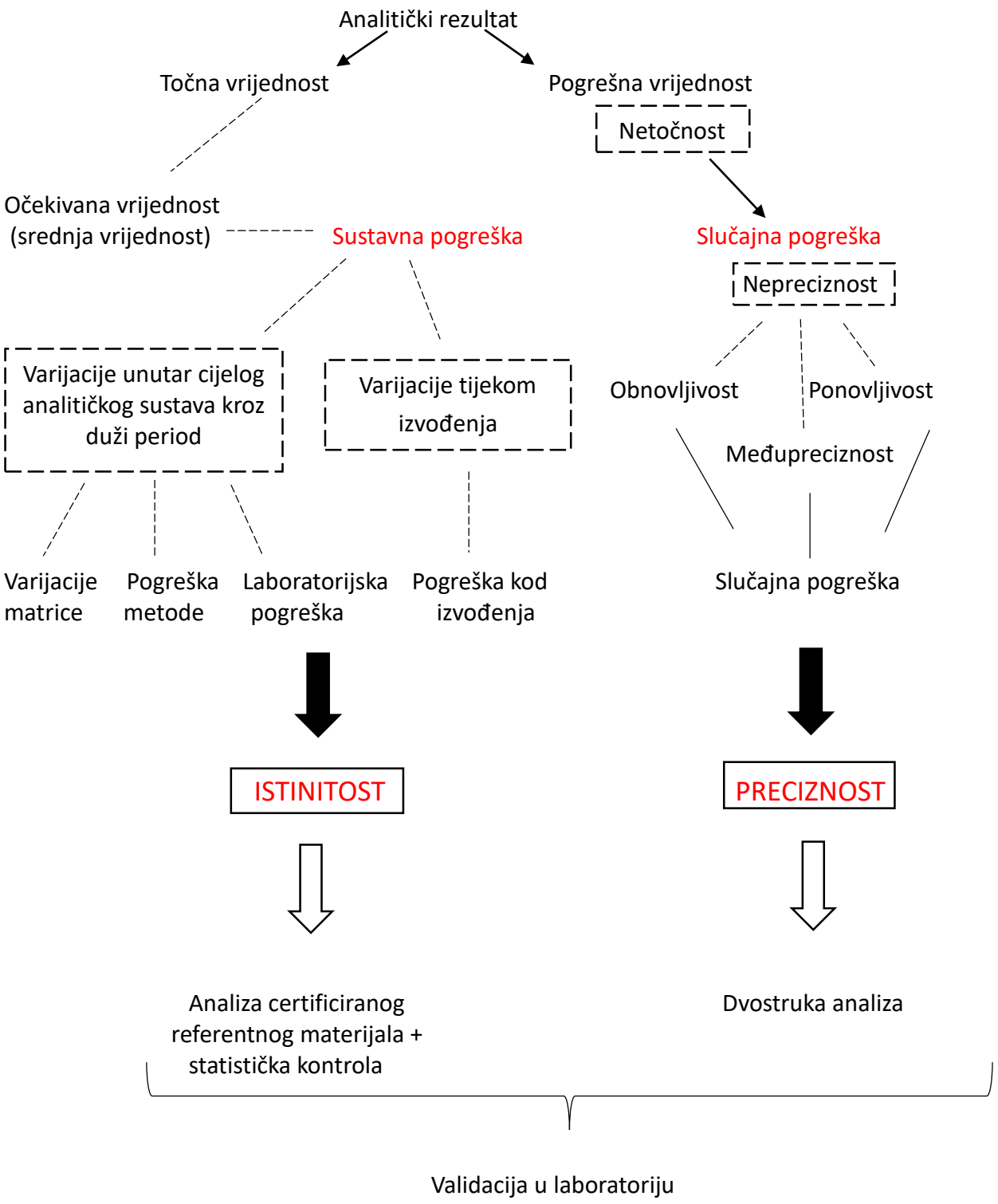
Točnost se definira kao stupanj podudarnosti između rezultata dobivenog ispitivanjem i prihvaćene referentne vrijednosti [27].

Prema HRN ISO 5725-4:2004, točnost se sastoji od dvije komponente – istinitosti i preciznosti. Istinitost se odnosi na stupanj podudaranja između aritmetičke sredine velikog broja rezultata ispitivanja i točne ili prihvaćene referentne vrijednosti, dok se preciznost odnosi na stupanj podudaranja između rezultata ispitivanja [28].

Smjernice za validaciju analitičkih postupaka izdane od strane ICH preporučuju provjeru točnosti obavljajući najmanje devet određivanja na najmanje tri koncentracije (niska, srednja i visoka) koje su unutar radnog područja (tri koncentracije · tri ponavljanja po koncentraciji = devet određivanja). Predloženo je nekoliko pristupa za evaluaciju točnosti metode. Trenutno glavne strategije korištene za procjenu točnosti su:

1. mjerenje analita iz određenog referentnog materijala i usporedba rezultata sa certificiranom vrijednošću;
2. mjerenje analita u slijepim nacijepljenim uzorcima matrice s poznatim analitičkim koncentracijama i određivanje postotaka iskorištenja (eng. *recovery*);
3. uspoređivanje rezultata iz metode pod validacijom sa onima iz referentne metode;
4. određivanje analitičke koncentracije u uzorku tehnikom dodavanja standarda [5].

Pogreška analitičkog rezultata odnosi se na (ne)točnost analitičke metode i sastoji se od sustavne pogreške i slučajne pogreške (Slika 8.) [4]. Također, što je sustavna pogreška veća, to je manja točnost mjerenja.



Slika 8. Sastav pogreške analitičkog rezultata, vezano uz točnost analitičke metode

Točnost se izražava kao postotak iskorištenja [21]. Iskorištenje se definira kao postotak stvarne koncentracije neke tvari izdvojene tijekom nekog analitičkog postupka [27]. Često se primjenjuje kao zaseban parametar validacije analitičke metode [3].

Računa se prema sljedećoj jednadžbi (5):

$$\% \, Rec = \frac{(C_F - C_U)}{C_A} \cdot 100 \qquad (5),$$

gdje je:

C_F - izmjerena koncentracija nacijepljenog uzorka;

C_U - izmjerena koncentracija uzorka prije nacijepljivanja;

C_A - dodana koncentracija u uzorak [23].

Idealno iskorištenje je 100% [23]. U tablici 4. navedeni su kriteriji prihvatljivosti za iskorištenje analitičke metode ovisno o koncentraciji analita.

2.2.1.8. ROBUSTNOST

Robusnost se definira kao mjera otpornosti analitičkog postupka na male, namjerne promjene radnih uvjeta metode. Ispitivanje robusnosti provodi se kako bi se odredilo kako male promjene radnih uvjeta i provedbe metode utječu na rezultat analize i vrlo su važan dio razvoja metode jer pomažu otkriti optimalne uvjete izvedbe metode te upućuju na to što treba nadzirati. Tijekom eksperimenta mijenjaju se radni uvjeti unutar stvarnih granica i prati kvantitativna promjena rezultata. Na primjer, kod tekućinske kromatografije ispituju se utjecaji sastava i pH mobilne faze, protoka, temperature te različite šarže ili dobavljači kolona. Stabilnost otopine također je tipičan parametar ispitivanja robusnosti metode. Ako promjena nekog radnog uvjeta ne utječe bitno na rezultat, kaže se da je on u području robusnosti metode, no uvjete za koje je utvrđeno da utječu na rezultat treba držati pod nadzorom i to jasno naznačiti u opisu metode [7]. Testovi robusnosti uobičajeno se primjenjuju za istraživanje učinka na preciznost ili točnost [15]. Na temelju podataka o robusnosti postavljaju se parametri za ispitivanje prikladnosti sustava“ [7].

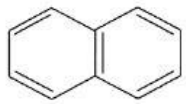
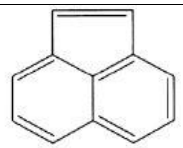
2.3. POLICIKLIČKI AROMATSKI UGLJIKOVODICI (PAH-OVI)

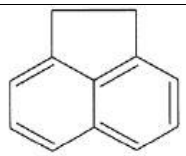
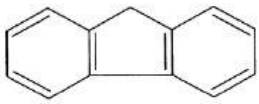
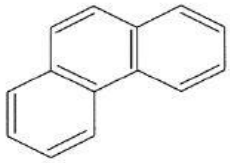
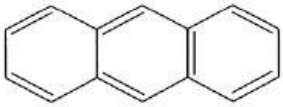
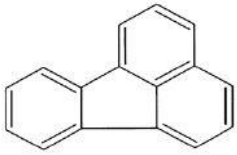
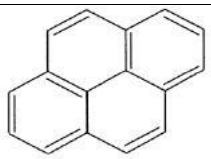
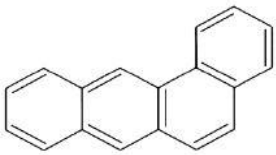
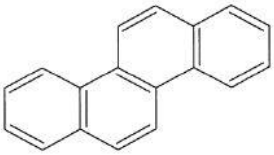
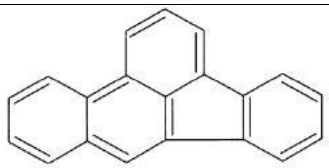
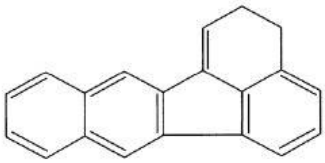
PAH-ovi su sveprisutni okolišni kontaminanti [30]. Nastaju pri nepotpunu izgaranju fosilnih goriva i drugih organskih materijala te tako dospijevaju u tlo, zrak, vodu, hranu i sedimente [31]. Oni predstavljaju veliku skupinu organskih spojeva koji sadrže dva ili više spojenih aromatskih prstena koji se sastoje samo od atoma ugljika i vodika [32]. Njihovo istraživanje i proučavanje započelo je prije uvođenja sistematske nomenklature tako da mnogi PAH-ovi nemaju sistematizirana imena. Imena koja su dobili prema svojim karakteristikama - imenu spoja iz kojeg su izolirani (npr. iz katrana kamenog ugljena naftalen i piren), boji (fluoranten i krizen) ili obliku molekule (koronen), zadržali su do danas [34]. IUPAC je postavio pravila za imenovanje, numeriranje i orijentaciju PAH-ova. PAH-ovi koji nemaju prihvaćeno uobičajeno ime imenuju se dodavanjem prefiksa drugih elemenata sa sastavnog prstena na naziv sastavnog prstena. Slova i/ili brojevi označavaju na kojoj se poziciji nalazi prsten ili supstituent. Atomi uobičajeni za dva ili više prstena označeni su dodavanjem slova "a", "b", "c" itd. [35]. PAH-ovi se dijele na lake i teške ovisno o broju aromatskih prstena koje sadrže u strukturi. Spojevi s 5 ili više aromatskih prstena poznati su kao „teški“ PAH-ovi, a oni sa manje od 5 aromatskih prstenova su poznati kao „laki“ PAH-ovi [36].

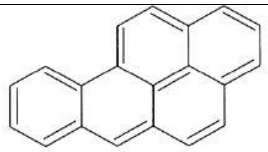
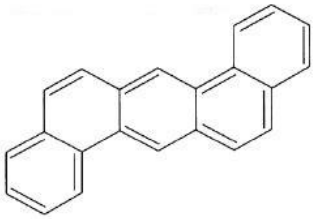
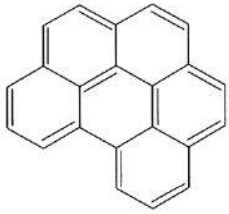
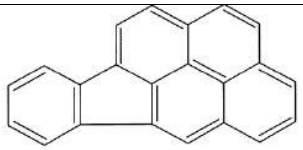
U prirodi je prepoznato više od 100 PAH-ova, a 16 ih je klasificirano kao "primarne onečišćujuće tvari" prema Američkoj agenciji za zaštitu okoliša (EPA) [37]. 16 ključnih PAH-ova su: antracen, benz(a)antracen, acenaften, acenaftilen, benzo(a)piren, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(g,h,i)perilen, krizen, dibenz(a,h)antracen, fluoranten, fluoren, naftalen, fenantren indeno(1,2,3-cd)piren, piren [38].

U tablici 7. prikazane su strukture 16 PAH-ova koji su prema EPA i WHO prioritetni zagađivači [39].

Tablica 7. Strukture 16 ključnih PAH-ova

Naziv spoja	Struktura
Naftalen	
Acenaftilen	

Acenaften	
Fluoren	
Fenantren	
Antracen	
Fluoranten	
Piren	
Benz(a)antracen	
Krizen	
Benzo(b)fluoranten	
Benzo(k)fluoranten	

Benzo(a)piren	
Dibenz(a,h)antracen	
Benzo(g,h,i)perilen	
Indeno(1,2,3-cd)piren	

PAH-ovi niske molekulske mase koji imaju 2-3 aromatska prstena (naftalen, acenaftilen, acenften, fluoren) uglavnom su prisutni u plinskoj fazi, dok su teži PAH-ovi (piren, benz(a)antracen, benzo-fluoranten) uobičajeno povezani s atmosferskim česticama (PM) [40].

2.3.1 PRIRODNI I ANTROPOGENI IZVORI PAH-OVA

U okolišu se nalazi mnogo prirodnih i antropogenih izvora PAH-ova [41]. PAH-ovi nastali iz prirodnih i antropogenih izvora općenito se pojavljuju u složenim smjesama koje mogu sadržavati stotine spojeva različitih kompozicija koji se razlikuju po procesu nastanka [42]. Relativna količina pojedinačnih PAH-ova koji se otpuštaju razlikuje se od jednog izvora do drugog [38]. Glavni prirodni izvori PAH-ova su šumski požari, vulkanske erupcije, spaljivanje korova i sirove nafte [43]. Najvažniji izvori PAH-ova povezani su upravo s ljudskom aktivnošću [33]. Izvori nastali ljudskom aktivnošću mogu se podijeliti u dvije kategorije: sagorijevanje materijala za izvor energije (npr. ugljen, nafta, plin, drvo) i sagorijevanje za minimalizaciju otpada (npr. spaljivanje otpada). Prva kategorija uključuje

stacionarne izvore kao industrija (većinom proizvodnja koksa i ugljena, procesiranje nafte, proizvodnja aluminija itd.), stambeno grijanje (peći, kamini i štednjaci, plamenici na petrolej i plin), stvaranje topline i energije (elektrane na ugljen, drvo, naftu i treset), mobilne izvore (automobili, kamioni, vlakovi, avioni) i pomorski promet (benzinski i dizelski motori). Druga kategorija obuhvaća spaljivanje gradskog i industrijskog otpada [39].
Spaljivanje biljnih ostataka u poljoprivredi još je jedan izvor PAH-ova u atmosferi. Poljoprivredni izvori uključuju paljenje slame, spaljivanje trava radi obnove i paljenje grmlja. Sve te aktivnosti uključuju spaljivanje organskih materijala pod suboptimalnim uvjetima izgaranja. Zbog toga se mogu očekivati značajne količine PAH-ova [44].

Postoje i neki manji biogeni izvori (iz biljaka, algi/fitoplanktona i mikroorganizama). Male količine se formiraju i dijagenezom (polaganom transformacijom organskih materijala u sedimente jezera) [45]. S obzirom na podrijetlo razlikuju se petrogeni, biogeni i pirogeni PAH-ovi. Pirogeni PAH-ovi su uglavnom otkriveni u procesima nepotpunih izgaranja organskih spojeva, poput fosilnih goriva (loživo ulje, ugljen, trava, drva, emisije vozila, otpadne gume, itd.). Nastaju tijekom pirolize na visokoj temperaturi (između 350° - 1200°) pod niskim kisikom ili bez kisika. Pronađeni su u većoj koncentraciji u urbanim područjima i na lokacijama koje su blizu glavnim izvorima PAH-ova [47]. PAH-ovi petrogenog podrijetla povezani su s naftom, uključujući sirovu naftu i loživo ulje te prolijevanja nafte i naftnih derivata [46]. Biogeni PAH-ovi mogu nastati zbog biosinteze mikroorganizama, fitoplanktona, algi, visoko razvijenih biljaka ili termitnih aktivnosti [40].

Jednom kada se otpuste u atmosferu, PAH-ovi se nalaze u dva različita stanja, plinovitom i krutom [47]. Vezanjem za čestice prašine i čađe ulaze u atmosferu. Mogu se prenositi na velike udaljenosti zbog njihove postojanosti. Čestice koje sadrže PAH-ove vraćaju se na površinu zemlje kišom, maglom ili snijegom i talože se u tlu ili dolaze na površinu vode [48]. U atmosferi prolaze fotokemijske i kemijske oksidacijske reakcije s dušikovim oksidima (NO_x), atmosferskim kisikom (O_2), sumporovim oksidima (SO_x) i hidroksilnim radikalima (OH^-) stvarajući mnogo toksičnije spojeve [49].

Koncentracija PAH-ova u zraku može biti u rasponu od tragova do znatnih razina [44]. Veće koncentracije PAH-ova zastupljene su u urbanim sredinama jer se većina izvora nalazi blizu gradova ili u samim gradovima [47]. Poluživot PAH-ova u zraku je između nekoliko sati i nekoliko dana [50]. PAH-ovi se zbog atmosferskog taloženja ili urbanog otjecanja nalaze u većini površinskih tala [51]. Mogu postati pokretljivi kada se nataložе na površinu zemlje.

Kako je većina PAH-ova u tlu vezana za čestice, najvažniji faktori koji utječu na pokretljivost čestica s PAH-ovima u podzemlju su veličina čestica i veličina izlaza otvora u tlu. Sklonost PAH-ova vezanju za čestice ovisi o svojstvima PAH-ova i tla [47]. Tla u blizini industrijskih izvora često sadrže visoke koncentracije PAH-ova [51]. Procijenjeni poluživot u tlu varira od nekoliko mjeseci do nekoliko godina [41]. Sedimenti su glavni rezervoari za PAH spojeve, primarno zbog slabe topivosti i snažnog afiniteta za organski ugljik u česticama [38]. Kretanje PAH-ova u prirodi ovisi o svojstvima, kao što su brzina razgradnje u vodi i koliko lako isparavaju u zrak [39].

2.3.2. IZLOŽENOST PAH-OVIMA

Ljudi su izloženi PAH-ovima kroz zrak i vodu, ali najviše kroz hranu [52]. Hrana može biti kontaminirana PAH-ovima iz okoliša, odnosno PAH-ovima koji su prisutni u tlu (migracija iz tla), zraku (depozicija/taloženje) i vodi (depozicija i migracija) [32]. Postupci obrade hrane, kao što su dimljenje i sušenje, kao i pečenje/kuhanje/roštiljanje hrane obično predstavljaju glavne izvore kontaminacije PAH-ovima. Točni mehanizmi formiranja PAH-ova nisu poznati, ali se zna da PAH-ovi nastaju pirolizom otopljenih masnoća iz hrane [53]. Kontaminacija hrane PAH-ovima iz okoliša ovisi o određenim fizikalno-kemijskim svojstvima PAH-ova kao što su: kemijska reaktivnost, biotička i abiotička razgradljivost, relativna topljivost u vodi i organskim otapalima te hlapljivost [32]. Jednom kada se PAH-ovi unesu u tijelo oni se metaboliziraju u nekim organima (jetra, bubrezi, pluća), izlučuju se u žući, urinu ili majčinom mlijeku i talože se u određenoj razini u masnom tkivu. Glavni putevi izlaganja su: inhalacija, ingestija i preko kože. Lipofilnost PAH-ova omogućuje im da odmah prolaze kroz staničnu membranu. Kasniji metabolizam čini ih bolje topljivim u vodi i lako se izlučuju iz tijela. Međutim PAH-ovi se mogu pretvoriti u toksičnije ili karcinogene metabolite [54]. Efekti na ljudsko zdravlje ovise poglavito o dužini trajanja i razini izloženosti, koncentraciji PAH-a kojoj je pojedinac izložen i naravno o prirodnoj toksičnosti PAH-ova te da li je izlaganje kroz kožu ili ingestijom [39]. Razina štetnih tvari u okolišu uspoređuje se s tzv. graničnim ili maksimalno dopuštenim koncentracijama kako bi se ocijenila opasnost od mogućih negativnih utjecaja na zdravlje ljudi. Za tvari koje imaju kancerogeno djelovanje ne postoje granične vrijednosti, nego treba težiti tomu da njihove koncentracije u zraku, tlu i vodi budu što niže [31]. Prema Pravilniku o najvećim dopuštenim

količinama određenih kontaminanata u hrani (NN br. 146/2012) u tablici 8. prikazane su najveće dopuštene količine kontaminanta benzo(a)pirena u hrani te najveće dopuštene količine sume benzo(a)pirena, benzo(b)fluorantena, benz(a)antracena i krizena [55].

Budući da su PAH-ovi prisutni svugdje oko nas i ne možemo ih potpuno izbjeći potrebno je poduzeti određene mjere kako bi ih reducirali.

Tijekom pripreme i proizvodnje hrane potrebno je poduzimati određene mjere:

- koristiti meso i ribu s manje masnoće;

- kod pripreme hrane na masnoći, koristiti što manje masnoće;

- izbjegavati pripremu hrane na otvorenom plamenu;

- prije konzumiranja svježeg voće i povrća potrebno ga je dobro oprati i po mogućnosti oguliti;

- prilikom pečenja i prženja koristiti nižete temperature, ali kroz duže vrijeme;

- prilikom konzumiranja izbjegavati dijelove hrane koji su „zagoreni“;

- prilikom dimljenja mesa izbjegavati direktno izlaganje dimu [56].

Tablica 8. Najveće dopuštene količine PAH-ova u hrani [55]

HRANA		Najveće dopuštene količine (µg/kg)	
6.1	Benzo(a)piren, benzo(b)fluoranten, benz(a)antracen i krizen	Benzo(a)piren	Suma benzo(a)pirena, benzo(b)fluorantena, benz(a)antracena i krizena
6.1.1	Masti i ulja (osim kakao maslaca i kokosovog ulja) namijenjena za neposrednu prehranu ljudi ili kao sastojak u hrani	2,0	10,0
6.1.2	Kakao zrna i njihovi proizvodi	5,0 µg/kg masti od 1.4.2013.	35,0 µg/kg masti od 1.4.2013. do 31.3.2015. 30,0 µg/kg masti od 1.4.2015.
6.1.3	Kokosovo ulje namijenjeno za neposrednu prehranu ljudi ili kao sastojak u hrani	2,0	20,0
6.1.4	Dimljeno meso i dimljeni mesni proizvodi	5,0 do 31.8.2014. 2,0 od 1.9.2014.	30,0 od 1.9.2012. do 31.8.2014. 12,0 od 1.9.2014.
6.1.5	Mišićno meso dimljene ribe, dimljeni proizvodi ribarstva	5,0 do 31.8.2014. 2,0 od 1.9.2014.	30,0 od 1.9.2012. do 31.8.2014. 12,0 od 1.9.2014.
6.1.6	Dimljene papaline, dvoljušturni mekušci (svježi, rashlađeni ili smrznuti) i konzervirane papaline	5,0	30,0
6.1.7	Dvoljušturni mekušci dimljeni	6,0	35,0
6.1.8	Hrana za dojenčad i malu djecu i prerađena hrana na bazi žitarica	1,0	1,0
6.1.9	Početna i prijelazna hrana, uključujući početnu mliječnu hranu za dojenčad i prijelazna mliječna hrana za dojenčad	1,0	1,0
6.1.10	Dijetalna hrana za posebne medicinske potrebe namijenjena posebno za dojenčad	1,0	1,0

2.3.3. SVOJSTVA PAH-OVA

PAH-ovi su organski spojevi koji su većinom bezbojne, bijele ili blijedo žute krutine [47]. Najstabilniji su oblik ugljikovodika jer imaju nizak omjer vodika/ugljika i obično se pojavljuju u složenim smjesama, a ne kao pojedinačni spojevi [44]. PAH-ovi su sami po sebi kemijski inertni [57]. Većina PAH-ova (70-90%) se apsorbira na čestice pri sobnoj temperaturi [44]. Općenito su lipofilni što znači da se slabije otapaju u vodi ali se dobro otapaju u uljima i mastima. Tendencija se povećava s većim brojem prstena tj. što ima više prstena to se bolje otapa u mastima i bolje se nakuplja u masnom tkivu u organizmu [48]. Što je veći broj benzenskih prstena to je manja topljivost u vodi [43]. Kako se topljivost smanjuje s povećanjem molekulske mase, PAH-ovi se neće akumulirati u biljkama koje imaju visoki sadržaj vode. Zbog toga će migracija PAH-ova iz tla u korijen biljke biti ograničena. No zbog vrlo niske hlapljivosti PAH-ovi imaju veliku tendenciju adsorpcije u organsku tvar pa je njihova koncentracija veća na površini biljke nego unutar biljke [32]. Teški PAH-ovi su stabilniji i toksičniji od laganih, a laki PAH-ovi su hlapljiviji, topljiviji u vodi i manje lipofilni nego teški PAH-ovi [58]. Imaju molekulske mase u rasponu od 128 Daltona do 278 Daltona [59]. Njihova fizikalno-kemijska svojstva, tlak isparavanja i topljivost variraju prema njihovoj molekularnoj težini i imaju karakterističan apsorpcijski spektar UV zračenja, a neki PAH-ovi mogu biti i fluorescentni [54]. Svojstva PAH-ova određena su konjugiranim π-elektronima aromatskih prstenova koji im daju kemijsku stabilnost. Zbog visokoenergetske π-vezne orbitale i relativno niskoenergetske π*-antivezne orbitale ovi spojevi mogu apsorbirati UV ili vidljivo zračenje pri čemu dolazi do prijelaza elektrona i nastajanja karakterističnih fluorescencijskih i apsorpcijskih spektara. Ovo svojstvo rabi se za kvalitativno i kvantitativno određivanje PAH-ova pa se prilikom analize uzoraka tekućinskom kromatografijom upotrebljavaju UV ili fluorescencijski detektori [33]. Svaka prstenasta struktura ima jedinstven UV spektar, prema tome svaki izomer ima drugačiji UV spektar apsorbancije [47]. Laboratorijska ispitivanja su pokazala da PAH-ovi imaju fototoksične osobine. Pronađeno je da su B(a)P, benzo(a)antracen (B(a)A) i antracen (Ant) uz metabolite B(a)P-a fototoksični za zelene alge *Selenastrum capricoruntum* kod svjetlosti valne duljina ispod 550 nm [60].
Zbog niskog tlaka pare, neki PAH-ovi se nalaze pri sobnoj temperaturi u zraku u plinovitom obliku, a neki su vezani za čestice [44]. Varijabilnost u tlaku para različitih spojeva PAH-a uzrok je tome da se pojedinačni PAH-ovi distribuiraju u različitim koncentracijama u plinovitom i drugim stanjima. PAH-ovi s nižim tlakom pare nastoje se vezati za čestice, dok

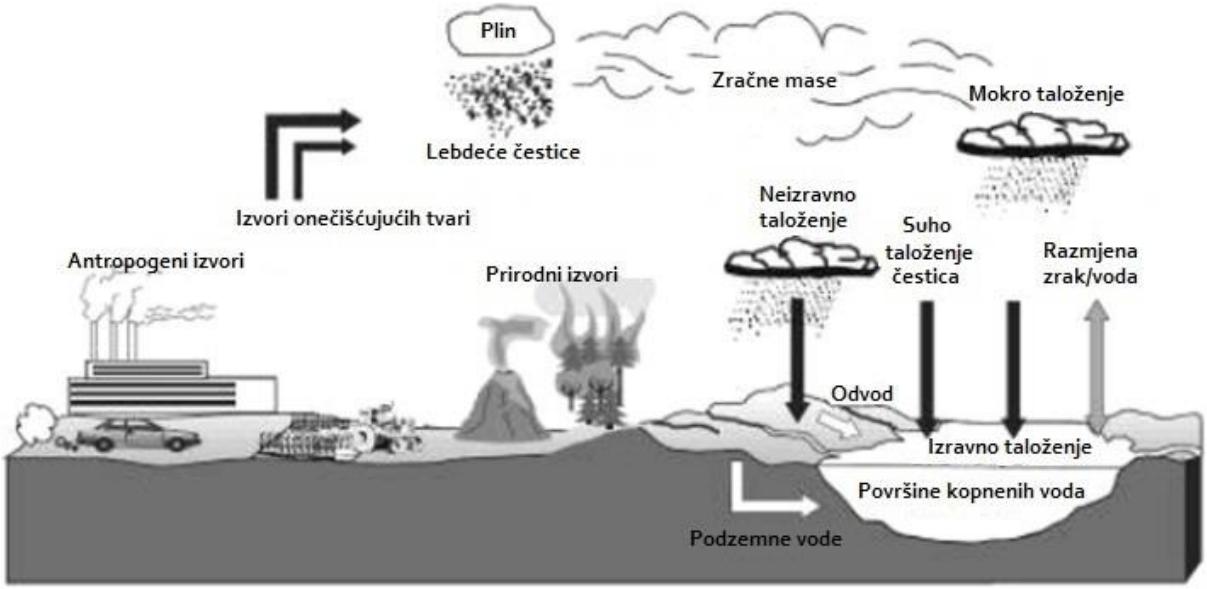
PAH-ovi s višim tlakom pare nastoje biti u plinovitom stanju [47]. Lagani PAH-ovi s 2-3 benzenska prstena se većinom pronalaze u plinovitom stanju dok se oni teški pronalaze vezani za čestice u zraku [44].
Najčešće se koriste kao međuprodukti u farmaceutskoj industriji, proizvodnji poljoprivrednih i fotografskih proizvoda, proizvodnji termostabilne plastike i materijala za podmazivanje i ostalim kemijskim industrijama. Također mogu biti u asfaltu korištenom za konstrukciju cesta kao i u katranu. Određeni PAH-ovi se koriste u elektronici, topljivoj plastici i tekućim kristalima [39].

2.3.4. UKLANJANJE PAH-OVA IZ OKOLIŠA

U okolišu se razgrađuju djelovanjem sunčevog svjetla i mikroorganizama [61]. Mikrobiološka razgradnja osnovni je put uklanjanja PAH-ova iz okoliša. Pri tome dolazi do enzimske oksidacije PAH-ova. Abiotičkom se razgradnjom mogu ukloniti PAH-ovi s dva ili više aromatska prstenova. Iz tla se ukloni oko 2% do 20% PAH-ova s dva ili tri aromatska prstena. PAH-ovi s četiri ili više aromatskih prstena jače su vezani na organsku tvar i čestice i teže se biološki razgrađuju [33]. Razgradnja PAH-ova u prirodi uključuje fotooksidaciju, kemijsku oksidaciju, ispiranje iz tla i bioakumulaciju. Svaki od tih procesa djeluje na različite načine na pojedinačne PAH-ove zbog toga što svaki PAH ima jedinstvenu strukturu i jedinstvena fizikalna, kemijska i biološka svojstva [47].
Također se mogu ukloniti i procesima mokrog ili suhog taloženja, ovisno o njihovim fizikalnim i kemijskim svojstvima (topljivosti u vodi, tlaku para i Henryevoj konstanti) i meteorološkim uvjetima (količini i intenzitetu oborina, temperaturi) [33]. Uklanjanje PAH-ova iz atmosfere suhim i vlažnim procesom taloženja uvjetovano je i njihovom raspodjelom na plinoviti oblik i čestice. Adsorbirani PAH-ovi se puno lakše uklanjanju iz atmosfere nego PAH-ovi u plinovitom stanju [47]. Na slici 9. prikazano je uklanjanje PAH-ova iz atmosfere suhim i vlažnim taloženjem [47].

Mnoge različite tehnologije sanacije kao biosanacija, apsorpcija i katalitički procesi se primjenjuju ili za uklanjanje ili za kemijsku pretvorbu PAH-ova u manje toksične spojeve. Katalitička hidrogenacija PAH-ova izvanredna je strategija za uklanjanje ovih spojeva iz

tekućih medija pretvarajući PAH-ove u kompletne ili djelomično hidrogenirane dvojnike koji predstavljaju manju opasnost po okoliš [62].



Slika 9. Uklanjanje PAH-ova iz okoliša suhim i mokrim taloženjem

2.4. BENZO(A)PIREN

B(a)P je peteročlani PAH kao što je prikazano u tablici 6. Pripada skupini teških PAH-ova. Blijedo je žuta kristalna krutina sa slabim aromatskim mirisom, relativno je netopljiv u vodi te ima nisku isparljivost [63]. Uglavnom nastaje zbog nepotpunog sagorijevanja ili pirolize organskih spojeva [64]. Tijekom dimljenja, razvija se dim u kojemu se nalazi B(a)P koji se adsorbira na površinu proizvoda. Procjenjuje se da se tijekom industrijskih procesa, oslobađa oko 22% B(a)P-a, dok oko 11% benzena nastaje grijanjem stambenih prostora, oko 8% spaljivanjem ostataka kultura na poljoprivrednim površinama te 4% kroz ispušne plinove automobila [65]. Hewett i Cook su 1933. godine izolirali B(a)P iz katrana kamenog ugljena te ga sintetizirali neovisno jedan o drugome. B(a)P je zatim dvadesetak godina kasnije, točnije 1952. godine, identificiran u lebdećim česticama na području Velike Britanije [60]. U 1960-im godinama razine B(a)P-a su ponekad bile veće od 100 ng/m^3 u mnogim

europskim gradovima, ali se tijekom zadnjih 35 godina koncentracija u zraku u urbanim sredinama značajno snizila [66]. U čistom seoskom području koncentracije B(a)P-a kreću se od 0,01 do 0,05 ng/m^3. U gradskom području kreću se oko 10 ng/m^3, dok u jako onečišćenom industrijskom području koncentracije dosežu 40 ng/m^3 [31].

B(a)P je najpoznatiji PAH i jedini je PAH koji je identificiran od strane IARC-a kao „poznati ljudski karcinogen" [64]. Najviše je proučavan od svih PAH-ova i rabi se kao indikator prisutnosti PAH-ova u zraku i hrani. On nije nužno i najzastupljeniji spoj, ali se uvijek pojavljuje kada su prisutni PAH-ovi [33]. Stoga su za B(a)P u EU definirane različite granične vrijednosti u različitim matricama, npr. zrak (2004/107/EC), pitka voda (98/83/EC) i prehrambeni proizvodi (835/2011) [67].
Prema Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN br. 146/2012) (tablica 6.), maksimalno dopuštene količine B(a)P-a u dimljenom mesu i dimljenim mesnim proizvodima iznose 2,0 µg/kg od 1. rujna 2014. godine.

Za procjenu zdravstvenih učinaka različitih onečišćujućih tvari, EPA je razvila faktor ekvivalente toksičnosti (TEF).
TEF za svaki PAH se određuje kao relativna toksičnost prema referentnom B(a)P-u, čiji je TEF jednak 1 [53].

1987. godine FAO/WHO odbor za prehrambene aditive odredio je da količina B(a)P u hrani ne smije prelaziti 10 ppb [68].

Prva službena metoda za analizu B(a)P-a u hrani, bazirana na apsorpciji ultraljubičastog zračenja ekstrakta hrane bila je tankoslojna kromatografija, objavljena u 1970-im. Od tada je razvijen međunarodni standard za B(a)P u masti i uljima. Metoda je bazirana na mjerenju B(a)P-a tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti sa fluorescentnom detekcijom (HPLC-FLD) [52].

2.5. DIMLJENJE

Dimljenje se smatra jednim od najstarijih načina konzerviranja hrane koji se zasniva na izlaganju mesa i mesnih proizvoda dimu koji je nastao sagorijevanjem drveta [69]. Još u pretpovijesti lovci su primijetili da je meso koje je bilo dimljeno trajalo duže i imalo bolju aromu i okus [70]. Dimljenjem se površinski stvara karakteristična lijepa i poželjna zlatno-

smeđa boja mesa i mesnih proizvoda [70]. Osim što se dimljenjem obogaćuje visokoproteinska hrana aromatičnim komponentama, ono također ima i bakteriostatsko i antioksidativno djelovanje [71]. Dim se sastoji od čvrste i plinovite frakcije. Oko 90% ukupnog volumena dima nalazi se u čvrstoj frakciji, a preostalih 10% volumena odnosi se na plinovitu fazu. Čvrsta frakcija je odgovorna za stvaranje vidljivog oblaka dima i sadrži brojne nepoželjne sastojke svojstvene dimu, dok plinovita faza sadrži poželjne sastojke, odnosno tvari koje daju mesu poželjnu aromu i boju [70]. Najvažniji sastojci dima koji imaju najveći utjecaj na proizvode od mesa su organske kiseline, fenoli i karbonilni spojevi [70]. Najpoznatiji i najopasniji sastojak dima je 3,4-benzopiren ili B(a)P, koji je mutagen i karcinogen [70]. Alifatske karboksilne kiseline i karbonili sudjeluju u stvaranju karakteristične poželjne boje dimljenog mesa i nastaju pri temperaturama od 160 do 250 ºC, a organske kiseline nastaju pri temperaturama između 250 i 300 ºC. Na temperaturi između 300 i 550 ºC nastaju fenoli i fenolni spojevi koji su integralni dio okusa i arome dima [70].

Dva tipa sušenja ili dimljenja su neposredno (direktno) i posredno (indirektno). Neposredno (direktno) dimljenje je proces dimljenja gdje se dim razvija u komori u kojoj se obrađuje hrana, dok je posredno (indirektno) dimljenje proces gdje se upotrebljavaju uređaji za proizvodnju dima te se dim razvija u komori odvojenoj od prostora gdje se hrana dimi. Dim se može pročistiti na različite načine, kao na primjer korištenjem kondenzatora ili vodenih filtera prije uvođenja u komoru za sušenje (sušnicu) [71].

Proizvodi koji se podvrgavaju toplinskom procesu dimljenja i sušenja izloženi su utjecaju i mogućnosti kontaminacije PAH spojevima tijekom termičke obrade [69]. Mehanizam formiranja PAH-ova nije u potpunosti razjašnjen ali se smatra da su dva osnovna puta nastajanja procesi pirolize i pirosinteze. Pri visokim temperaturama organski spojevi se djelomično razgrađuju (piroliza) na manje nestabilne fragmente, uglavnom radikale, koji dalje međusobno reagiraju stvarajući stabilne spojeve PAH-ova (pirosinteza) [72].

Stvaranje PAH-ova tijekom dimljenja i procesa direktnog sušenja ovisi o više čimbenika, uključujući:

a) gorivo (drvo i ostali biljni materijali, dizel gorivo, plinovi, tekući/kruti otpad i ostala goriva);

b) dimljenje ili metodu sušenja (izravno ili neizravno);

c) proces stvaranja dima u odnosu na temperaturu pirolize i na zrak u slučaju generatora dima (trenje, tinjanje, termostatirane ploče) ili je u vezi s drugim metodama, kao što su direktno dimljenje ili ponovno stvaranje dima pomoću raspršenog kondenzata dima (tekući dim);

d) udaljenost između hrane i izvora topline;

e) položaj hrane u odnosu na izvor topline;

f) količinu masti u hrani i što se događa s njom u tijeku proizvodnje;

g) trajanje dimljenja i direktnog sušenja;

h) temperaturu za vrijeme dimljenja i direktnog sušenja;

i) čistoću i održavanje opreme;

j) konstrukciju komore za dimljenje i opreme korištene za mješavinu zraka i dima (koja utječe na gustoću dima u komori za dimljenje) [71].

Jedna od najčešće primjenjivanih metoda proizvodnje dima u današnjoj mesnoj industriji je metoda sporog izgaranja drveta (piroliza ili tinjanje). Ona podrazumijeva kontrolirano izgaranje određene količine piljevine ili drvnog otpada pri čemu je najvažnija regulacija dotoka zraka u prostor za izgaranje, kako bi se osiguralo sporo izgaranje, odnosno tinjanje piljevine. Vrlo važan parametar je temperatura izgaranja piljevine i produkcije dima, koja ima značajan učinak na kvalitetu dima [70].
Kisik treba biti izjednačen, jer premalo ili previše kisika dovodi do proizvodnje PAH-ova. Adekvatan kisik je potreban kako bi se osigurala parcijalna/nedovršena potrošnja goriva [71]. Prevelike koncentracije kisika mogu povećati temperaturu i dovesti do povećane formacije PAH-ova, dok niske koncentracije kisika mogu dovesti do veće formacije PAH-ova u dimu, a također uzrokuju i proizvodnju ugljičnog monoksida koji može biti opasan po život [71]. Što je veća temperatura obrade hrane to je udio nastalih PAH-ova veći. Također i pri nižim temperaturama (100-150 °C) može nastati veliki udio PAH-ova, ali u tom slučaju je potreban duži vremenski period i tada nastaju uglavnom alkilirani PAH-ovi [72]. Optimalna temperatura sagorijevanja drveta je između 350 i 500 ºC, a niže i više temperature uzrokuju značajno povećanje koncentracije neželjenih tvari u dimu, koje u dimljenom mesu ostavljaju fragmente opasne po ljudsko zdravlje [70]. Stvaranjem dima na temperaturama između 350 i 550 ºC reducira se količina PAH-ova na manje od 1 µg po kilogramu dimljenog mesa, što se smatra neškodljivim [70]. Omjer površine i mase proizvoda značajno utječe na razinu PAH-ova u dimljenim mesnim proizvodima, s obzirom da se oni adsorbiraju na površinu mesa, ne prodirući u značajnoj mjeri u unutrašnjost dimljenoga mesnoga proizvoda [73]. Stoga je koncentracija PAH-ova značajno veća u površinskom sloju [70].

Neke od strategija kojima se udio PAH spojeva u dimljenim mesnim proizvodima može značajno smanjiti uključuju uporabu kondenzacijskih rashladnih uređaja, filtraciju čestica, skraćivanje trajanja procesa i/ili niže temperature pri kojima se procesi odvijaju [73].

Vrijeme dimljenja trebalo bi biti što je kraće moguće kako bi se minimaliziralo izlaganje površine hrane dimu u kojem se nalazi PAH [71]. Prilikom pripreme hrane potrebno je imati na umu da je osim postizanja optimalnih senzorskih svojstava hrane potrebno pažljivo odabirati način i uvjete pripreme hrane. To omogućuje smanjivanje udjela potencijalno štetnih tvari, a ujedno i rizika od njihovog štetnog djelovanja na zdravlje [72].

2.6. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI

Kromatografija je analitička tehnika odjeljivanja komponenata smjese na temelju različite raspodjele komponenata između dviju faza, pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne) [74].

HPLC je analitička tehnika za odvajanje, identificiranje i kvantificiranje komponenata u smjesi [75]. Razvoj HPLC-a započeo je još u 1960-im i 1970-im godinama [76].

Kod HPLC-a tekući se uzorak injektira u tekuću pokretnu fazu koja nosi uzorak kroz kromatografsku kolonu te se komponentne uzorka međusobno odjeljuju na temelju njihove mogućnosti raspodjele između pokretne i nepokretne faze. Vrijeme zadržavanja komponenti određeno je na osnovi njihove interakcije s pokretnom i nepokretnom fazom [74]. Vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme) je vrijeme u kojemu se specifični analit eluira (izlazi iz kromatografske kolone) [75].

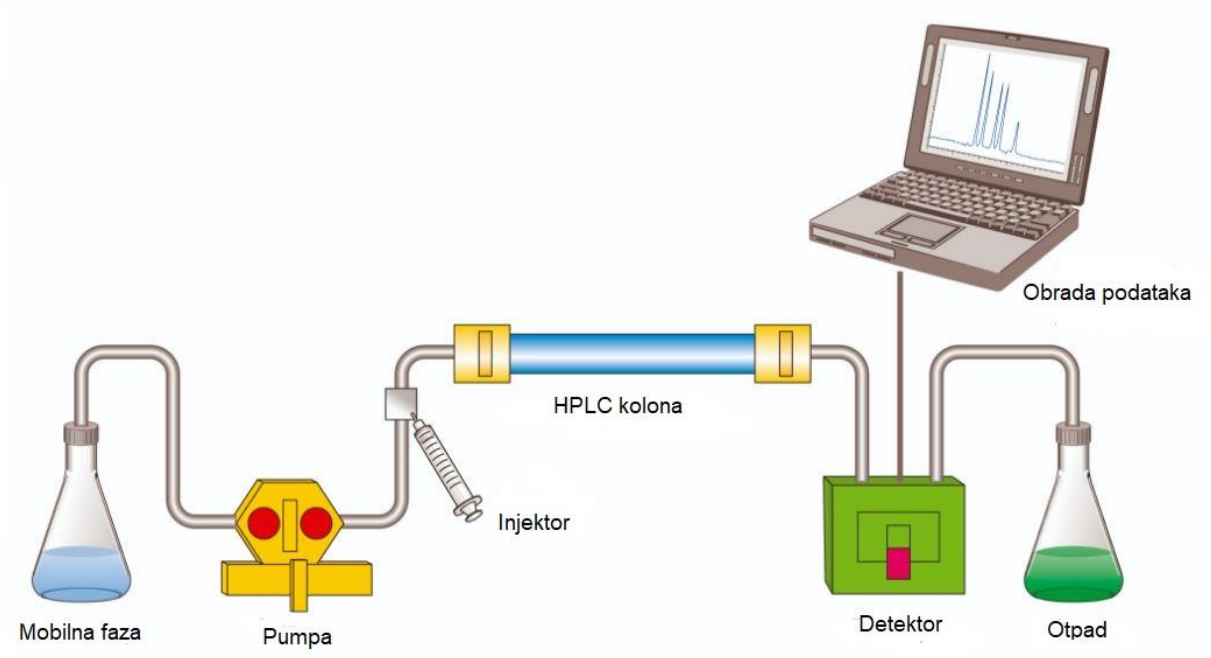
Kako bi se postigle dovoljne brzine protoka u kolonama punjeni punilima s promjerom od 10 μm ili manje potrebni su tlakovi od nekoliko milijuna Pa [77].

Potreba bržeg i djelotvornijeg odjeljivanja primjenom visokih tlakova zahtijeva primjenu složene instrumentacije koja se sastoji od četiriju osnovnih dijelova: sustava za opskrbu pokretnom fazom, dijela za injektiranje uzorka, kolone i detektora [74]. Na slici 10. prikazani su dijelovi HPLC-a [76]. Sustav za opskrbu pokretnom fazom sadržava crpku koja omogućuje postizanje visokoga tlaka i sustav koji omogućuje miješanje otapala. Otapala koja se uporabljuju moraju biti vrlo visoke čistoće i mjehurići plina moraju biti uklonjeni iz njih. Sustav za injektiranje omogućuje precizno injektiranje točno određenog volumena tekućeg uzorka, a volumeni uzoraka kreću se od 0,5 μL do 5,0 mL [74].

Detektori koji se u tekućinskoj kromatografiji najčešće upotrebljavaju temelje se na apsorpciji vidljivog ili ultraljubičastog zračenja [77].

Posljednjih nekoliko desetljeća razvijene su brojne kromatografske tehnike za analizu PAH-ova u okolišu. Plinska i tekućinska kromatografija pokazale su zadovoljavajuću osjetljivost i zadovoljavajuće razlučivanje pri određivanju tragova PAH-ova u kompleksnim matricama pa se zbog toga najčešće i rabe pri rutinskim analizama [33].

Analitičke metode identificiranja PAH-ova uključuju HPLC sa fluorescentnim ili ultraljubičastim detektorom [78].



Slika 10. Shematski prikaz HLPC sustava

2.7. CILJEVI RADA

Ciljevi diplomskoga rada su:

1. provesti validaciju HPLC metode za određivanje B(a)P-a u tradicionalnim proizvodima na području Slavonije;
2. pokazati da je metoda prikladna za određivanje B(a)P-a u uzorcima;
3. odrediti koncentraciju B(a)P-a u uzorcima.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIKALIJE

Korištene kemikalije su:

1. voda demineralizirana, ≤ 0,1 µS/cm^3, svježa, profiltrirana na membrani 0,2 µm
2. acetonitril (HPLC čistoće)
3. 10% izopropanol – za ispiranje igle
4. standardna otopina B(a)P-a (osnovni, *stock* standard), 10 µg/mL.

Sve kemikalije i *stock* standard čuvaju se u hladnjaku.

3.2. OPREMA I PRIBOR

- Aparat: Tekućinski kromatograf s FLD detektorom, 1290 Infinity System Agilent Technologies
- Kolona: Agilent LiChrospher PAH 5 µm
- PTFE kivete od 50 mL
- PTFE kivete od 15 mL
- *Quechers EMR-Lipid $MgSO_4$ Polish Pouch*
- centrifuga
- vortex
- ultrazvučna kupelj Elmasonic P
- d-SPE EMR-Lipid kivete s određenom gramažom soli već pripremljenom za tu vrstu analize
- pipete odgovarajućeg volumena
- staklene kapalice
- *Polish Tube*-NaCl/$MgSO_4$ (kivete sa određenom smjesom soli za pročišćavanje ekstrakta)

3.3. METODA

Metoda primijenjena u radu je modificirana, normirana metoda HRN CEN/TS 16621:2014. Metoda opisuje određivanje B(a)P-a u masnoj hrani.

Princip metode je da se B(a)P ekstrahira dva puta s vodom i acetonitrilom iz uzorka masne hrane, nakon čega se alikvot prebaci u vijalice i analizira HPLC-om.

3.4. UVJETI METODE

Mobilna faza sastojala se od smjese vode i acetonitrila. Temperatura kolone bila je 20 °C, volumen injektiranja 20 µL, ukupni protok mobilne faze 1 mL/min, a maksimalni tlak 330 bar. Vrijeme trajanja analize bilo je 25 min, a vrijeme nakon analize 2 min.

3.5. UZORCI

Prikupljeno je ukupno petnaest uzoraka masne hrane: devet uzoraka domaćih proizvoda (kobasice, šunka i kulen) i šest industrijskih proizvoda (kulen, kulen kvrgavi, slavonska salama, kulenova seka, seljačka šunka i kobasica).

3.6. PRIPREMA KALIBRACIJSKIH OTOPINA I UZORAKA PREMA METODI

3.6.1. PRIPREMA KALIBRACIJSKIH OTOPINA

<u>MEĐUSTANDARDNA OTOPINA B(a)P, 0,1 µg/mL</u>

U odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetirano je 0,1 mL standardne otopine (*stock*). Tikvica je potom nadopunjena acetonitrilom do oznake. Dobivena otopina bila je koncentracije 0,1 µg/mL.

OTOPINE RADNIH STANDARDA

U odmjerne tikvice od 5 mL otpipetirano je 0,05 mL, 0,075 mL, 0,1 mL, 0,125 mL i 0,15 mL međustandardne otopine koncentracije 0,1 µg/mL i nadopunjeno acetonitrilom do oznake. Dobiveni su radni standardi koncentracija 0,0010, 0,0015, 0,0020, 0,0025, 0,0030 µg/mL koji se koriste za izradu kalibracijskog pravca.

3.6.2. PRIPREMA UZORAKA

Princip pripreme uzoraka je da se uzorci usitne i ekstrahiraju dva puta s vodom i acetonitrilom.

Oko 1 g uzorka odvagano je u PTFE kivetu, uzorak se usitnio te se dodalo 5 mL vode i 5 mL acetonitrila. Uzorak se potom miješao na vortex-u 1 minutu, te dodatno homogenizirao u UZV kupelji 30 minuta. Uzorak se ponovno stavio na vortex 1 minutu i potom se dodalo pakovanje „*Quechers EMR-Lipid $MgSO_4$ Polish Pouch*“ i vortexiralo dodatno još 1 minutu. Zatim se uzorak centrifugirao na 4000 okretaja 5 minuta i kapalicom se prebacio gornji acetonitrilni sloj u novu kivetu od 15 mL. Potom se ponovila ekstrakcija uzorka sa dodatnih 5 mL vode i 5 mL acetonitrila, uzorak se vortexirao, centrifugirao i ponovno odvojio gornji acetonitrilni sloj koji se pridružio acetonitrilnom sloju od prošle ekstrakcije. Otprilike 13 mL acetonitrila prebacilo se u d-SPE EMR-Lipid kivetu s određenom gramažom soli već pripremljenom za ovakvu vrstu analize. Kiveta se isprala s 0,5 mL acetonitrila te snažno miješala 1 minutu. Kiveta s acetonitrilom i soli centrifugirala se na 4000 okretaja 5 minuta i volumen se zatim prebacio u treću kivetu s oznakom kako bi se ustanovilo koliko je razrjeđenje (oko 11 mL). Ekstrakt se pročistio pripremljenom smjesom soli „*Polish Tube*-NaCl/$MgSO_4$“. Zatim se alikvot prebacio u vijalicu i slijedila je analiza na HPLC uređaju.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. KONCENTRACIJA BENZO(A)PIRENA U UZORCIMA

Koncentracija B(a)P-a u domaćim i industrijskim proizvodima izračunata je prema sljedećoj jednadžbi (6) za svaki uzorak, a rezultati su prikazani u tablici 9:

$$\gamma \text{ (uzorka)} = \gamma \text{ (srednja vrijednost)} \cdot \frac{V \text{ (očitan sa kivete)}}{m \text{ (uzorka)}} \tag{6}$$

gdje je: γ (uzorka) = masena koncentracija B(a)P-a u uzorku;

γ (srednja vrijednost) = srednja vrijednost masenih koncentracija B(a)P-a u uzorku;

V = volumen ekstrakta;

m = masa uzorka.

Izračun svake koncentracije B(a)P-a nalazi se u prilogu.

Od devet analiziranih domaćih proizvoda dva su pokazala povišene koncentracije B(a)P-a. Za Kobasicu 5 izračunata koncentracija B(a)P-a je 2,188 µg/kg, a za Kulen 2,246 µg/kg. Ostali domaći proizvodi imaju koncentracije B(a)P-a unutar maksimalno dopuštene granice 2,0 µg/kg. Najveća koncentracija B(a)P-a izračunata je za jedan industrijski proizvod, Kulen kvrgavi, a iznosila je 2,849 µg/kg, dok je najmanja koncentracija izračunata za Kobasicu čija je koncentracija ispod granice kvantifikacije.

Tablica 9. Izračunate koncentracije B(a)P-a u uzorcima.

	PROIZVOD	B(a)P (µg/kg)
DOMAĆI	Kobasica 1	0,135
	Kobasica 2	0,112
	Kobasica 3	0,099
	Kobasica 4	0,942
	Kobasica 5	2,188
	Kobasica 6	0,769
	Kobasica 7	0,715
	Kulen	2,246
	Šunka	0,027
INDUSTRIJSKI	Kulen	0,108
	Kulen kvrgavi	2,849
	Slavonska salama	0,151
	Kulenova seka	0,051
	Seljačka šunka	0,119
	Kobasica	< LOQ

4.2. VALIDACIJA ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE BENZO(A)PIRENA HPLC METODOM

Određivani su sljedeći parametri validacije: linearnost, područje linearnosti, preciznost (ponovljivost mjerenja, ponovljivost pripreme uzorka), granica detekcije, granica kvantifikacije, selektivnost i točnost.

4.2.1. LINEARNOST

Linearnost je sposobnost metode da unutar radnog područja daje ispitne rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku.

Određena je trostrukim mjerenjem svake koncentracije u rasponu od 0,001 do 0,003 µg/mL. Kriterij prihvatljivosti za linearnost je $r \geq 0{,}995$.

U tablici 10. prikazani su rezultati određivanja linearnosti, a na slici 11. je grafički prikaz rezultata.

Pomoćne tablice (tablica 11.) korištene su za izračun koeficijenata kalibracijskog pravca.

Tablica 10. Odnos različitih koncentracija B(a)P-a i njegovih površina

Koncentracija B(a)P (µg/mL)	**Površina pika (LU·S)**
0,0010	1200,8251
0,0015	1832,9985
0,0020	2322,1237
0,0025	2919,2336
0,0030	3591,4110

Tablica 11. Pomoćne tablice za izračun koeficijenata kalibracijskog pravca

Br.	x_i	x_i^2	y_i	y_i^2	$x_i - y_i$
1.	0,0010	0,00000100	1200,82511	1441980,9	-1200,8241
2.	0,0015	0,00000225	1832,99849	3359883,5	-1832,9970
3.	0,0020	0,00000400	2322,12370	5392258,5	-2322,1217
4.	0,0025	0,00000625	2919,23356	8521924,6	-2919,2311
5.	0,0030	0,00000900	3591,41097	12898232,8	-3591,4080
SUM	**0,0100**	**0,00002250**	**11866,5918**	**31614280,2**	**-11866,5818**
AVE	**0,0020**	**0,00000450**	**2373,3184**	**6322856,0**	**-2373,3164**

Br.	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$
1.	-0,0010	-1172,4933	0,000001	1374740,5385	1,172493
2.	-0,0005	-540,3199	0,00000025	291945,5943	0,27016
3.	0,0000	-51,1947	0	2620,8973	0
4.	0,0005	545,9152	0,00000025	298023,4056	0,27295
5.	0,0010	1218,0926	0,000001	1483749,5822	1,21809
SUM	**0,0000**	**0,0000**	**0,0000025**	**3451080,0179**	**2,933692**
AVE	**0,0000**	**0,0000**	**0,0000005**	**690216,0036**	**0,5867384**

Legenda:

x_i – koncentracija standardne otopine (µg/mL)

y_i – površina pika kromatograma

$\bar{x}$ – srednja vrijednost koncentracija standardnih otopina

$\bar{y}$ – srednja vrijednost površina pika kromatograma

SUM - zbroj svih članova u stupcu

AVE – srednja vrijednost svih članova u stupcu

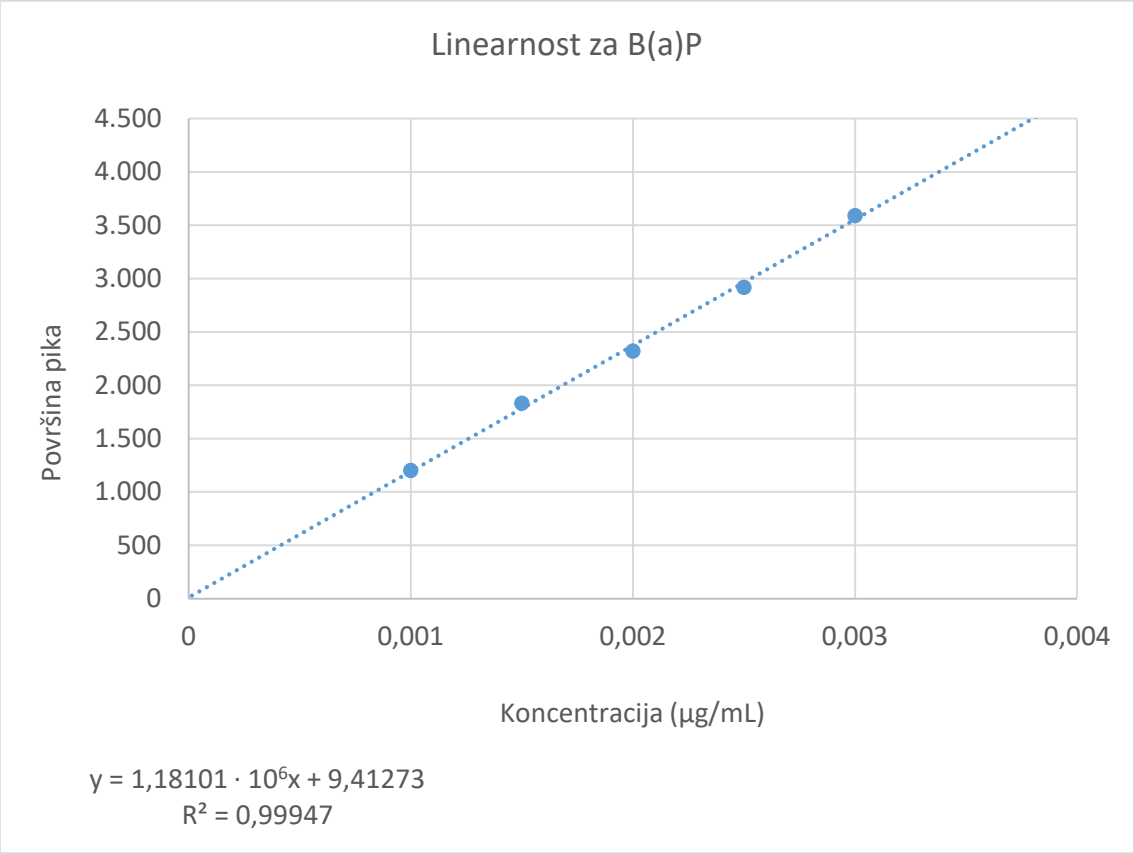
Na temelju dolje prikazanih jednadžbi određeni su koeficijenti kalibracijskog pravca, nagib pravca (*a*), odsječak na osi y (*b*) te koeficijent korelacije (*r*):

jednadžba pravca: $$y = ax + b \quad (7)$$

nagib pravca: $$a = \frac{\sum_{i=1}^{n}(xi - \bar{x})(yi - \bar{y})}{\sum_{i=1}^{n}(xi - \bar{x})^2} \quad (8)$$

odsječak na osi y: $b = \bar{y} - a\bar{x}$ (9)

koeficijent korelacije: $$r = \frac{\sum_{i=1}^{n}(xi - \bar{x})(yi - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(xi - \bar{x})^2}\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(yi - \bar{y})^2}}$$ (10).



Slika 11. Linearnost B(a)P-a u koncentracijskim područjima 0,001 – 0,003 µg/mL

Prema podatcima iz tablice 10. i s jednadžbama (7) - (10) izračunati su sljedeći koeficijenti:

koeficijent korelacije: r = 0,99947

nagib pravca: $1{,}18101 \cdot 10^6$

odsječak na osi y: 9,41273

jednadžba pravca: $y = 1{,}18101 \cdot 10^6 x + 9{,}41273$.

Zaključak: Grafički prikaz i regresijska analiza ukazuju na linearan odnos površina pikova kromatograma i koncentracija te je **zadovoljen** kriterij prihvatljivosti ($r \geq 0{,}995$) jer je koeficijent korelacije $r = 0{,}99947$.

4.2.2. PODRUČJE LINEARNOSTI

Područje linearnosti je raspon između gornje i donje koncentracijske granice analita u uzorku koje se mogu kvantificirati uz odgovarajuću preciznost, istinitost i linearnost.

Područje linearnosti kalibracijskog pravca određeno je pomoću podataka prikazanih na slici 12., izračunatih vrijednosti prikazanih u Tablici 12 i jednadžbe (11). Kriterij prihvatljivosti je da područje linearnosti mora biti u području koncentracija 0,001 - 0,003 µg/mL.

Tablica 12. Prikaz rezultata logaritama zadanih koncentracija i omjera površina pikova kromatograma i koncentracija

γ (µg/mL)	**A**	**-log γ**	**Područje linearnosti**	**A/γ**
0,0010	1200,8251	3	+	1200825,11
0,0015	1832,9985	2,824	+	1221998,99
0,0020	2322,1237	2,699	+	1161061,85
0,0025	2919,2336	2,602	+	1167693,42
0,0030	3591,4110	2,523	+	1197136,99

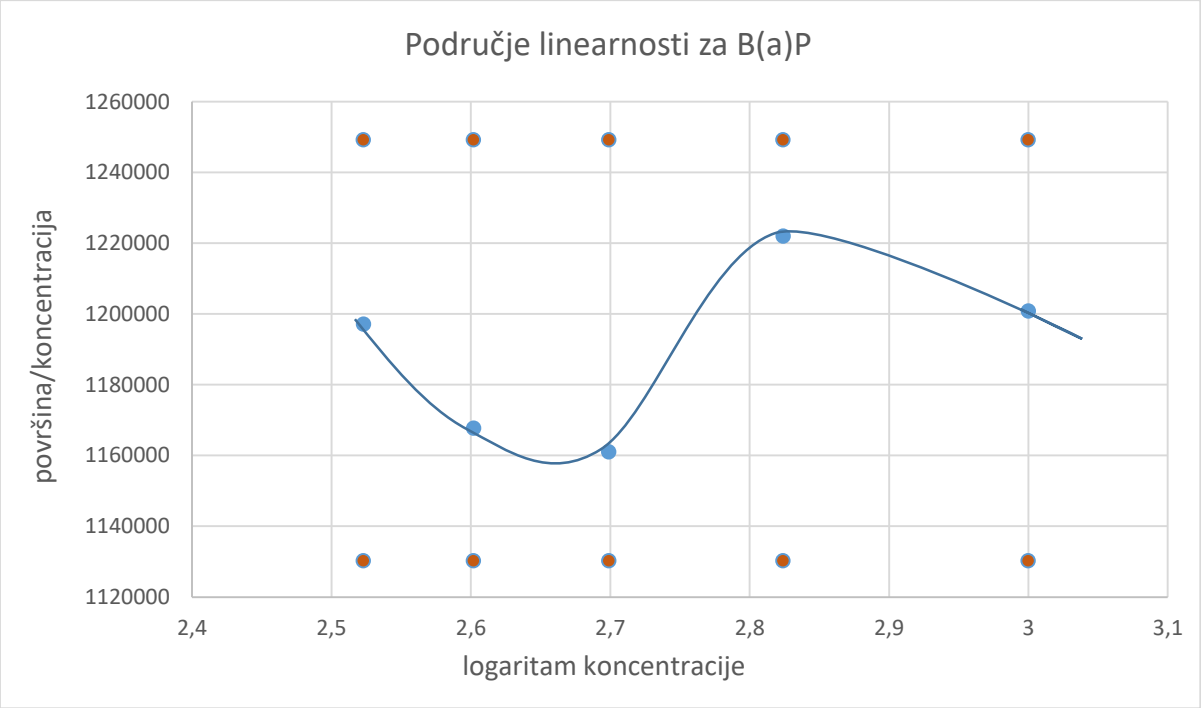
$$R_c = \frac{\sum \frac{A}{c}}{5} = 1189743{,}273 \qquad (11)$$

R_c = srednja vrijednost omjera površina/koncentracija

$\frac{A}{c}$ = omjer površine i koncentracije

Donja granica za područje linearnosti: $R_c \cdot 0{,}95 = 1189743{,}273 \cdot 0{,}95 = 1130256{,}109$

Gornja granica za područje linearnosti: $R_c \cdot 1{,}05 = 1189743{,}273 \cdot 1{,}05 = 1249230{,}437$



Slika 12. Grafički prikaz područja linearnosti B(a)P-a

Zaključak: Područje linearnosti **zadovoljava** koncentracije 0,001 - 0,003 µg/mL.

4.2.3. PRECIZNOST

Preciznost se definira kao izraz slaganja između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Preciznost je izražena kao ponovljivost mjerenja i ponovljivost pripreme uzorka. Kriterij prihvatljivosti za preciznost je RSD ≤ 20%.

PONOVLJIVOST MJERENJA

Za provjeru ponovljivosti mjerenja priređen je jedan uzorak domaćeg Kulena (*m* = 1,13168 g). Uzorak je mjeren 10 puta. Rezultati su prikazani u tablici 13. kao srednje vrijednosti očitanih retencijskih vremena, površina pikova i koncentracija, te SD i RSD (%).

Tablica 13. Ponovljivost mjerenja za uzorak domaći Kulen

Br.mjerenja	**Rt (min)**	**Područje pika (LU·S)**	**Koncentracija (µg/mL)**
1.	15,895	20,3878	0,0000092929
2.	15,894	19,3875	0,00000844597
3.	15,872	21,8957	0,0000105697
4.	18,875	21,7529	0,0000104488
5.	18,872	21,4235	0,0000101699
6.	18,873	21,5545	0,0000102809
7.	18,871	21,3410	0,0000101
8.	18,871	20,6751	0,00000953616
9.	18,872	20,7798	0,00000962483
10.	18,869	22,9088	0,000014275
Srednja vrijednost	17,976	21,2107	0,0000102744
SD	1,442	0,9604	0,00000154335
RSD (%)	**8,0**	**4,5**	**15,0**

Zaključak: Ponovljivost retencijskog vremena (Rt) za određivanje B(a)P-a u domaćem Kulenu HPLC metodom iznosi **8,0%**. Ponovljivost mjerenja površina pika iznosi **4,5%**, a ponovljivost određivanja koncentracije B(a)P-a **15,0%**. Sve relativne standardne devijacije **zadovoljavaju** kriterij prihvatljivosti (RSD ≤ 20 %).

PONOVLJIVOST PRIPREME UZORKA

Za provjeru ponovljivosti pripreme uzorka priređena su tri uzorka domaćeg Kulena iz tablice 8., Kulen 1 (*m* = 1,13168 g), Kulen 2 (*m* = 1,13211 g) i Kulen 3 (*m* = 1,13120 g). Uzorci su mjereni dva puta. Rezultati su prikazani u tablici 14. kao srednje vrijednosti površina pikova i koncentracija te SD i RSD (%).

Tablica 14. Ponovljivost pripreme uzorka domaćeg Kulena

Uzorak	**Površina pika (LU·S)**	**Koncentracija (µg/mL)**
Kulen 1	20,3878	0,00000963773
	19,3875	0,00000864188
Kulen 2	20,3768	0,00000928364
	21,8675	0,0000105459
Kulen 3	20,4222	0,00000932204
	20,3558	0,00000926588
Srednja vrijednost	20,4663	0,0000094
SD	0,7944	0,0000006
RSD (%)	**3,8**	**6,6**

Zaključak: Ponovljivost pripreme uzorka domaćeg Kulena iznosi **3,8%** što **zadovoljava** kriterij prihvatljivosti (RSD ≤ 20%).

4.2.4. GRANICA DETEKCIJE (LOD)

LOD je najmanja koncentracija analita u uzorku koja se može detektirati (dokazati), ali ne i nužno kvantificirati. Izračunava se pomoću jednadžbe (12):

$$\text{LOD} = \frac{3{,}3\ \sigma}{S} \qquad (12).$$

Podatci korišteni za izračun granice detekcije su:

$S = 1{,}18101 \cdot 10^6$

$\sigma = 46{,}58788.$

Uvrštavanjem podataka u gore navedenu jednadžbu dobije se sljedeći rezultat:

LOD = 0,13 µg/kg.

GRANICA KVANTIFIKACIJE (LOQ)

LOQ je najniža koncentracija ili količina analita u uzorku koja se može odrediti s prihvatljivom razinom preciznosti i točnosti. Izračunava se pomoću jednadžbe (13):

$$\text{LOQ} = \frac{10\ \sigma}{S} \qquad (13).$$

Uvrštavanjem gore navedenih podataka u jednadžbu (13) dobije se sljedeći rezultat:

LOQ = 0,39 µg/kg.

4.2.5. SELEKTIVNOST

Specifičnost/selektivnost svojstvo je metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja. Selektivna metoda je ona metoda kojom se može odrediti veći broj kemijskih komponenti koje se mogu ili ne moraju razlikovati od drugih komponenti, a specifična metoda je ona metoda kojom se može odrediti samo jedan analit u prisutnosti ostalih komponenti. U tablici 15. prikazana su retencijska vremena uzorka domaćeg Kulena mjerenog 10 puta.

Tablica 15. Retencijska vremena uzorka domaćeg Kulena

Br.mjerenja	**Rt (min)**
1.	15,895
2.	15,894
3.	15,872
4.	18,875
5.	18,872
6.	18,873
7.	18,871
8.	18,871
9.	18,872
10.	18,869
$\overline{\boldsymbol{Rt}}$	**17,976**
SD	1,442
RSD (%)	8,0

Zaključak: Metoda je selektivna.

4.2.6. TOČNOST

Točnost se definira kao stupanj podudarnosti između rezultata dobivenih ispitivanjem i prihvaćene referentne vrijednosti. Iskorištenje se definira kao postotak stvarne koncentracije tvari izdvojene tijekom analitičkog postupka.

Točnost se određivala na domaćem Kulenu i industrijskom Kvrgavom kulenu. Ta su se dva uzorka nacijepala sa 1 mL standardne otopine koncentracije 0,002 µg/mL. Izračuni

nacjepljivanja uzoraka nalaze se u prilogu. Kriterij prihvatljivosti za točnost su iskorištenja veća od 80%, a manja od 120%.

<u>Točnost za domaći Kulen:</u>

$$REC = (c(\text{nacjepljeno}) / c(\text{uzorka} + \frac{\text{koncentracija standardne otopine}}{\text{masa uzorka}})) \cdot 100$$

$$REC = (c(\text{nacjepljeno}) / c(\text{uzorka} + \frac{0{,}002\mu g/mL}{1{,}01015g})) \cdot 100$$

$$= (0{,}003578861\mu g/g / 0{,}002246253\ \mu g/g + \frac{0{,}002\mu g/mL}{1{,}01015g}) \cdot 100$$

$$= \mathbf{84{,}7\%}$$

<u>Točnost za Kvrgavi kulen:</u>

$$REC = (c(\text{nacjepljeno}) / c(\text{uzorka} + \frac{\text{koncentracija standardne otopine}}{\text{masa uzorka}})) \cdot 100$$

$$REC = (c(\text{nacjepljeno}) / c(\text{uzorka} + \frac{0{,}002\mu g/mL}{1{,}02844g})) \cdot 100$$

$$= (0{,}004597358\mu g/g) / (0{,}002848571\ \mu g/g + \frac{0{,}002\mu g/mL}{1{,}02844g})) \cdot 100$$

$$= \mathbf{95{,}9\%}$$

Zaključak: Iskorištenja od 84,6% i 95,9% **zadovoljavaju** kriterij prihvatljivosti (100 ± 20%).

4.3. SAŽETAK REZULTATA VALIDACIJE

U tablici 16. prikazani su određivani parametri, odgovarajući kriteriji prihvatljivosti i dobiveni rezultati validacije HPLC metode za određivanje B(a)P-a u tradicionalnim proizvodima na području Slavonije. Svi određivani parametri zadovoljavaju postavljene kriterije prihvatljivosti iz čega proizlazi zaključak da HPLC metoda odgovara namijenjenoj svrsi, tj. može se primjenjivati za određivanje B(a)P-a u masnoj hrani.

Tablica 16. Sažetak rezultata parametara validacije HPLC metode za određivanje B(a)P-a u tradicionalnim proizvodima

Parametar validacije	**Kriterij prihvatljivosti**	**Rezultat**	**Zadovoljava kriterij (DA/NE)**
Selektivnost	k' > 2	Rt = 17,976 min	DA
Linearnost	r ≥ 0,995	r = 0,99947	DA
Područje linearnosti	Informacija	Odgovarajuće za y 0,001 – 0,003 µg/mL	DA
Preciznost			
Ponovljivost mjerenja	RSD ≤ 20%	RSD(Rt) = 8,0% RSD(y) = 4,5%	DA
Ponovljivost pripreme uzorka	RSD ≤ 20%	RSD = 3,8%	DA
Točnost (*recovery*)	100 ± 20%	84,6% 95,9%	DA
Granica detekcije (LOD)	≤ 0,30 µg/kg	0,13 µg/kg	DA
Granica kvantifikacije (LOQ)	≤ 0,90 µg/kg	0,39 µg/kg	DA

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedena je validacije analitičke metode za određivanje B(a)P-a u tradicionalnim proizvodima. Određivanje B(a)P-a u masnoj hrani važno je za određivanje kvalitete hrane. B(a)P se koristi kao indikator prisutnosti PAH-ova u hrani i vodi, iako on često nije i najzastupljeniji spoj. Na istim uzorcima određena je i koncentracija B(a)P-a. Neki uzorci su pokazali povišene koncentracije, tj. koncentracija B(a)P-a bila je iznad maksimalno dopuštene količine 2,0 µg/kg. Postupci obrade hrane, kao što su sušenje i dimljenje, kao i pečenje/kuhanje/roštiljanje hrane obično predstavljaju glavne izvore kontaminacije PAH-ovima. PAH-ovi su sveprisutni kontaminanti zbog široke rasprostranjenosti i ne mogu se potpuno izbjeći. Tijekom validacije određivani su sljedeći parametri validacije: selektivnost, točnost, linearnost, preciznost, granica detekcije, granica kvantifikacije i područje linearnosti. Svi parametri validacije su u skladu s kriterijima određenim zakonom. Stoga je HPLC metoda za određivanje B(a)P-a u tradicionalnim proizvodima prikladna za namijenjenu svrhu. Validacije ove analitičke metode omogućuje njezinu daljnju pouzdanu primjenu za određivanje B(a)P-a u masnoj hrani.

6. LITERATURA

[1] P. van Zoonen, R. Hoogerbrugge, S. M. Gort, H. J. van de Wiel, H. A. van 't Klooster, Some practical exapmles of method validation in the analytical laboratory, Trends in Analytical Chemistry 18 (1999) 584-593.

[2] Z. Knežević, Osiguranje kvalitete u analitičkom laboratoriju, Hrana i zdravlje 3 (2007) 1-5.

[3] I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele, Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, Trends in Analytical Chemistry 23 (2004) 535-552.

[4] I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele, Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results, Trends in Analytical Chemistry 23 (2004) 480-490.

[5] P. Araujo, Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation, Journal of Chromatography B 877 (2009) 2224–2234.

[6] B. Magnusson, U. Örnemark, The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Eurachem, 2014.

[7] K. Lazarić, Validacija analitičkih metoda – osnovna načela, Svijet po mjeri: časopis za mjeriteljstvo, normizaciju, akreditaciju i ocjenjivanje sukladnosti 1 (2012) 61-64.

[8] A. G. González, M. A. Herrador, A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profile, Trends in Analytical Chemistry 26 (2007) 227-238.

[9] R. Wood, How to validate analytical methods, Trends in Analytical Chemistry 18 (1999) 624-632.

[10] G. A. Shabir, Step-by-Step Analytical Methods Validation and Protocol in the Quality System Compliance Industry, J. Valid. Technol. 10 (2005) 210-218.

[11] K. Lazarić, Validacija analitičkih metoda – praktični aspekt, Svijet po mjeri: časopis za mjeriteljstvo, normizaciju, akreditaciju i ocjenjivanje sukladnosti 2 (2013) 37-42.

[12] https://www.intechopen.com/books/wide-spectra-of-quality-control/analytical method-validation (20. lipnja 2018.)

[13] M. Thompson, S. L. R. Ellison, R. Wood, Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis, Pure Appl. Chem. 74 (2002) 835-855.

[14] http://kemolab.hr/validacije/ (20. lipnja 2018.)

[15] K. Kalra, Method Development and Validation of Analytical Procedures, Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas, Dev Bhoomi Institute of Pharmacy and Research, India, 2011.
[16] M. Rambla-Alegre, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question, Journal of Chromatography A 1232 (2012) 101–109.
[17] The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Eurachem, 1998.
[18] V. Galjšević, Validacija i mjerna nesigurnost, Biochemia Medica 20 (2010) 57–63.
[19] Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products, 2004.
[20] S. Tolić, G. Bach, S. Šikić, A. Krivohlavek, 13. Stručni sastanak laboratorija ovlaštenih za ispitivanje voda, 2014.
[21] ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 1995.
[22] L. Huber, Validation of Analytical Methods, Agilent Technologies, Germany 5990-5140EN (2010) 2-65.
[23] J. Peris-Vicente, J. Esteve-Rimero, S. Carda-Broch, Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An overview, Analytical Separation Science, 2015..
[24] Guidance for Industry - Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, ICH, 1996.
[25] K. Lazarić, V. Galjšević, Validacija analitičkih metoda, Hrvatsko mjeriteljsko društvo, Zagreb, 2012.
[26] Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, AOAC official methods of analysis, 2016.
[27] https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_01_2_16.html (25.lipnja 2018.)
[28] Norma HRN ISO 5725-4:2004
[29] http://www.svijet-kvalitete.com/index.php/ispitivanje/2387-validacija-analitickih-metoda-prakticni-aspekt (22. lipnja 2018.)
[30] J. B. Beach, L. Ellis, J. T. Keever, E. Pellizzari, Determination of Benzo[a]pyrene and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) at Trace Levels in Human Tissues, Journal of Analytical Toxicology 24 (2000) 670-677.
[31] A. Šišović, Policiklički aromatski ugljikovodici u zraku u nas, Arh Hig Rada Toksikol 51 (2000) 89–101.

[32] Z. Knežević, Kontaminacija hrane organskim štetnim tvarima, Hrana i zdravlje 3 (2007) 1-7.

[33] I. Jakovljević, S. Žužul, Policiklički aromatski ugljikovodici u zraku, Arh Hig Rada Toksikol 62 (2011) 357-370.

[34] Godišnji izvještaj o radu sanitarne inspekcije u području sigurnosti hrane, Ministarstvo zdravstva, 2016.

[35] https://openaccess.leidenuniv.nl/bitstream/handle/1887/569/01.pdf?sequence=2 (3.srpnja 2018.)

[36] P. Plaza-Bolaños, A. Garrido Frenich, J. L. Martínez Vidal, Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends, Journal of Chromatography A 1217 (2010) 6303-6326.

[37] S. Eslamizad, H. Yazdanpanah, K. Javidnia, R. Sadeghi, M. Bayat, S. Shahabipour, N. Khalighian, F. Kobarfard, Validation of an Analytical Method for Determination of Benzo[a]pyrene Bread using QuEChERS Method by GC-MS, Iranian Journal of Pharmaceutical Research 15 (2016) 465-474.

[38] S. Stellman, T. L. Guidotti, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Petroleum Industry, 76905_ch81 (2007) 1236-1246.

[39] J. C. Igwe, P. O. Ukaogo, Environmental Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Journal of Natural Sciences Research 5 (2015) 117-131.

[40] V. Samburova, B. Zielinska, A. Khlystov, Do 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Represent PAH Air Toxicity?, Toxics 5 (2017) 1-16.

[41] J. C. Larsen, Polyaromatic Hydrocarbons (PAH). Evaluation of health hazards and estimation of a quality criterion in soil, The Danish Environmental Protection Agency, Denmark, 2013.

[42] S. A. V. Tfouni, C. S. Serrate, F. M. Leme, M. C. R. Camargo, C. R. A. Teles, K. M.V. A. B. Cipolli, R. P. Z. Furlani, Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee brew: Influence of roasting and brewing procedures in two Coffea cultivars, LWT - Food Science and Technology 50 (2013) 526-530.

[43] https://www.intechopen.com/books/biodegradation-and-bioremediation-of-polluted-systems-new-advances-and-technologies/biodegradation-of-aromatic-compounds (19. lipnja 2018.)

[44] K. Ravindra, R. Sokhi, R. Van Grieken, Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation, Atmospheric Environment 42 (2008) 2895–2921.

[45] E. Morillo, A. S. Romero, L. Madrid, J. Villaverde, C. Maqueda, Characterization and Sources of PAHs and Potentially Toxic Metals in Urban Environments of Sevilla (Southern Spain), Water Air Soil Pollut 187 (2008) 41–51.

[46] A. Baran, M. Tarnawski, K. Urbański, A. Klimkowicz-Pawlas, I. Spałek, Concentration, sources and risk assessment of PAHs in bottom Sediments, Environ Sci Pollut Res 24 (2017) 23180–23195.

[47] H. I. Abdel-Shafy, M. S. M. Mansour, A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation, Egyptian Journal of Petroleum 25 (2016) 107-123.

[48] Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Harmful to the Environment! Toxic! Inevitable?, German Federal Environment Agency, Germany, 2012.

[49] L. Singh, J. G. Varshney, T. Agarwal, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons' Formationand Occurrence in Processed Food, Food Chemistry (2015) 1-56.

[50] Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – Occurrence in foods, dietary exposure and health effects, Scientific Committe on Food, SCF/CS/CNTM/PAH/29, 2002.

[51] Polycyclic aromatic hydrocarbons (Benzo[a]pyrene) – Toxicological Overview, Toxicology Department, England, 2008.

[52] E. Anklam, J. Kleiner, R. Simon, T. Wenzl, Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union, Trends in Analytical Chemistry 25 (2006) 716-725.

[53] B. Šarkanj, D. Kipčić, Đ. Vasić-Rački, F. Delaš, K. Galić, M. Katalenić, N. Dimitrov, T. Klapec, Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek, 2010.

[54] B. Muñoz, A. Albores, DNA Damage Caused by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Mechanisms and Markers, Selected Topics in DNA Repair, 2011.

[55] Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN br. 146/2012)

[56] A. Gross-Bošković, Oprezno s jelima sa roštilja, MESO 9 (2007) 82-83.

[57] D. H. Phillips, Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet, Mutation Research 443 (1999) 139-147.

[58] F. Abas, A. Farhadian, S. Jinap, Z. I. Sakar, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat, Food Control 21 (2010) 606–610.

[59] B. Kumar, V. K. Verma, R. Gaur, S. Kumar, C. S. Sharma, A.B. Akolkar, Validation of HPLC method for determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in waste water and sediments, Advances in Applied Science Research 5 (2014) 201-209.

[60] A. Alebić-Juretić, T. Cvitaš, L. Klasinc, Toksikologija policikličkih aromatskih ugljikovodika i mutagenost atmosfere, Arh Hig rada toksikol 40 (1989) 319-333.

[61] T. Klapec, B. Šarkanj, Opasnosti vezane uz hranu – Kemijske opasnosti, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010.

[62] A. F. S. Zanato, D. A. Lima, V. C. Silva, M. J. Jacinto, Bimetallic magnetic PtPd-nanoparticles as efficient catalyst for PAH removal from liquid media, Appl Nanosci 7 (2017) 781–791.

[63] L. Burgoon, C. Cai, G. Ching-Hung Hsu, G. Cooper, J. Cowden, L. D'Amico, J. Fritz, M. Gehlhaus, C. Gibbons, K. Hogan, A. Kraft, K. Newhouse, A. Persad, L. Phillips, M. Pratt, K. Salazar, J. Schaum, J. Stanek, S. Vulimiri, C. Brinkerhoff, E. McConnell, S. Glaberman, Toxicological Review of Benzo[a]pyrene, EPA, 2017.

[64] M. Carradus, K. G. McAdam, J. D. H. van Heemst, C. H. A. Goss, C. Wright, A validated method to measure benzo[a]pyrene concentrations in tobacco by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection, Anal. Methods 7 (2015) 1590-1599.

[65] M. Habuda-Stanić, I. Martinis, T. Niseteo, L. Pollak, Znanstveno mišljenje – Znanstveno mišljenje o označavanju prirodne mineralne vode navodom „pogodna za pripremu hrane za dojenčad“, HAH, 2014.

[66] J. Alexander, D. Benford, A. Cockburn, J. P. Cravedi, E. Dogliotti, A. Di Domenico, M. L. Fernández-Cruz, J. Fink-Gremmels,P. Fürst, C. Galli, P. Grandjean, J. Gzyl, G. Heinemeyer, N. Johansson, A. Mutti, J. Schlatter, R. van Leeuwen, C. Van Peteghem, P. Veger, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain, The EFSA Journal 724 (2008) 1-114.

[67] M. Pschenitza, R. Hackenberg, R. Niessner, D. Knopp, Analysis of Benzo[a]pyrene in Vegetable Oils Using Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction (MISPE) Coupled with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Sensors 14 (2014) 9720-9737.

[68] S. Y. Chung, R. R. Yettella, J. S. Kim, K. Kwon, M. C. Kim, D. B. Min, Effects of grilling and roasting on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in beef and pork, Food Chemistry 129 (2011) 1420–1426.

[69] S. Rekanović, I. Šišić, E. Hodžić, Sadržaj PAH spojeva kod izmijenjenog načina dimljenja pilećih prsa, MESO 17 (2015) 541-544.

[70] M. Krvavica, J. Đugum, A. Kegalj, M. Vrdoljak, Dimljenje – postupci i učinci na mesne proizvode, MESO 15 (2013) 202-209.
[71] Kodeks postupanja za smanjenje kontaminacije hrane s policikličkim aromatskim ugljikovodicima (PAH) nastalih dimljenjem i neposrednim procesom sušenja, Zagreb, 2014.
[72] Z. Knežević, N. Bilandžić, M. Serdar, M. Sedak, M. Đokić, I. Varenina, B. Solomun, Nastajanje mutagena u hrani tijekom toplinske obrade, MESO 12 (2010) 237-243.
[73] J. Pleadin, D. Kovačević, Kemijske opasnosti u mesu i mesnim proizvodima u prehrambenom lancu od farme do potrošača, MESO 18 (2016) 436-444.
[74] Nj. Radić, L. Kukoč Modun, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb, 2016.
[75] V. Bansal, R. Malviya, O. P. Pal, P. K. Sharma, High performance liquid chromatography: a short review, Journal of Global Pharma Technology 2 (2010) 22-26.
[76] K. Töppner, D. Hansen, E. Herbig, HPLC Analysis – The Role of Ultrapure Water, Germany
[77] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
[78] E. Ledesma, M. Rendueles, M. Díaz, Contamination of meat products during smoking by polycyclic aromatic hydrocarbons: Processes and Prevention, Food Control, 2015.

7. PRILOZI

7.1. IZRAČUNI KONCENTRACIJA

Masena koncentracija B(a)P-a u domaćim i industrijskim tradicionalnim proizvodima

Domaći proizvodi:

Kobasica 1

m (uzorka) = 1,00218 g

γ_1 (izmjerena) = 1,54928 · 10^{-5} µg/mL

γ_2 (izmjerena) = 1,50204 ·10^{-5} µg/mL

γ (srednja vrijednost) = 1,52566 · 10^{-5} µg/mL

V (očitan s kivete) = 8,9 mL

$$\gamma \text{ (uzorka)} = \gamma \text{ (srednja vrijednost)} \cdot \frac{V \text{ (očitan sa kivete)}}{m \text{ (uzorka)}} = 1{,}525266 \cdot 10^{-5}\,\frac{\mu g}{mL} \cdot \frac{8{,}9 \text{ mL}}{1{,}00218 \text{ g}}$$

$$= 0{,}0001354883753\,\frac{\mu g}{g} = 0{,}1354883753\,\frac{\mu g}{kg}$$

Kobasica 2

m (uzorka) = 1,01664 g

γ_1 (izmjerena) = 1,36268 · 10^{-5} µg/mL

γ_2 (izmjerena) = 1,24596 · 10^{-5} µg/mL

γ (srednja vrijednost) = 1,30432 · 10^{-5} µg/mL

V (očitan s kivete) = 8,7 mL

$$\gamma \text{ (uzorka)} = \gamma \text{ (srednja vrijednost)} \cdot \frac{V \text{ (očitan sa kivete)}}{m \text{ (uzorka)}} = 1{,}30432 \cdot 10^{-5}\,\frac{\mu g}{mL} \cdot \frac{8{,}7 \text{ mL}}{1{,}01664 \text{ g}}$$

$$= 0{,}000111619\,\frac{\mu g}{g} = 0{,}111618508\,\frac{\mu g}{kg}$$

Kobasica 3

m (uzorka) = 1,01832 g

γ_1 (izmjerena) = 1,16107 · 10^{-5} µg/mL

γ_2 (izmjerena) = 1,00441· 10^{-5} µg/mL

γ (srednja vrijednost) = 1,08274 · 10^{-5} µg/mL

V (očitan s kivete) = 9,3 mL

γ (uzorka) = γ (srednja vrijednost) · $\frac{V\ (\text{očitan sa kivete})}{m\ (\text{uzorka})} = 1{,}08274 \cdot 10^{-5}\,\frac{\mu g}{mL} \cdot \frac{9{,}3\ \text{mL}}{1{,}01832\ \text{g}}$

$= 9{,}88833 \cdot 10^{-5}\,\frac{\mu g}{g} = 0{,}098883278\,\frac{\mu g}{kg}$

Kobasica 4

m (uzorka) = 1,01812 g

γ_1 (izmjerena) = 0,000108766 µg/mL

γ_2 (izmjerena) = 0,000111755 µg/mL

γ (srednja vrijednost) = 0,000110261 µg/mL

V (očitan s kivete) = 8,7 mL

γ *(uzorka)* = γ (srednja vrijednost) · $\frac{V\ (\text{očitan sa kivete})}{m\ (\text{uzorka})} = 0{,}000110261\frac{\mu g}{mL} \cdot \frac{8{,}7\ \text{mL}}{1{,}01812\ \text{g}} =$

$0{,}000942194\,\frac{\mu g}{g} = 0{,}942193798\,\frac{\mu g}{kg}$

Kobasica 5

m (uzorka) = 1,05517 g

γ_1 (izmjerena) = 0,000260598 µg/mL

γ_2 (izmjerena) = 0,000264015 µg/mL

γ (srednja vrijednost) = 0,000262307 µg/mL

V (očitan s kivete) = 8,8 ml

γ (uzorka) = γ (srednja vrijednost) $\cdot \frac{V\ (\text{očitan sa kivete})}{m\ (\text{uzorka})} = 0{,}000262307 \frac{\mu g}{ml} \cdot \frac{8{,}8\ \text{mL}}{1{,}05517\ \text{g}} =$

$0{,}002187607 \frac{\mu g}{g} = 2{,}187606926 \frac{\mu g}{kg}$

Kobasica 6

m (uzorka) = 1,0506 g

γ_1 (izmjerena) = $8{,}90282 \cdot 10^{-5}$ µg/mL

γ_2 (izmjerena) = $9{,}04256 \cdot 10^{-5}$ µg/mL

γ (srednja vrijednost) = $8{,}97269 \cdot 10^{-5}$ µg/mL

V (očitan s kivete) = 9 mL

γ (uzorka) = γ (srednja vrijednost) $\cdot \frac{V\ (\text{očitan sa kivete})}{m\ (\text{uzorka})} = 8{,}97269 \cdot 10^{-5} \frac{\mu g}{mL} \cdot \frac{9\ \text{mL}}{1{,}0506\ \text{g}} =$

$0{,}000768648 \frac{\mu g}{g} = 0{,}768648487 \frac{\mu g}{kg}$

Kobasica 7

m (uzorka) = 1,03107 g

γ_1 (izmjerena) = $8{,}64755 \cdot 10^{-5}$ µg/mL

γ_2 (izmjerena) = $8{,}68992 \cdot 10^{-5}$ µg/mL

γ (srednja vrijednost) = $8{,}66874 \cdot 10^{-5}$ µg/mL

V (očitan s kivete) = 8,5 mL

γ (uzorka) = γ (srednja vrijednost) $\cdot \frac{V\ (\text{očitan sa kivete})}{m\ (\text{uzorka})} = 8{,}66874 \cdot 10^{-5} \frac{\mu g}{ml} \cdot \frac{8{,}5\ \text{mL}}{1{,}03107\ \text{g}} =$

$0{,}000714639 \frac{\mu g}{g} = 0{,}714638652 \frac{\mu g}{kg}$

Kulen

m (uzorka) = 1,01151 g

γ_1 (izmjerena) = 0,000284528 μg/mL

γ_2 (izmjerena) = 0,00023186 μg/mL

γ (srednja vrijednost) = 0,000258194 μg/mL

V (očitan s kivete) = 8,8 mL

γ (uzorka) = γ (srednja vrijednost) $\cdot \frac{V\ (\text{očitan sa kivete})}{m\ (\text{uzorka})}$ = 0,000258194 $\frac{\mu g}{mL} \cdot \frac{8{,}8\ \text{mL}}{1{,}01151\ \text{g}}$ =

0,002246253 $\frac{\mu g}{g}$ = 2,24625283 $\frac{\mu g}{kg}$

SPIKE - kulen (NACIJEPLJENO S 1 mL KONCENTRACIJE 0,002 μg/mL)

m (uzorka) = 1,01015 g

γ_1 (izmjerena) = 0,000322105 μg/mL

γ_2 (izmjerena) = 0,000379873 μg/mL

γ (srednja vrijednost) = 0,000350989 μg/mL

V (očitan s kivete) = 10,3 mL

γ (uzorka) = γ (srednja vrijednost) $\cdot \frac{V\ (\text{očitan sa kivete})}{m\ (\text{uzorka})}$ = 0,000350989 $\frac{\mu g}{mL} \cdot \frac{10{,}3\ \text{mL}}{1{,}01015\ \text{g}}$ =

0,003578861 $\frac{\mu g}{g}$ = 3,578861258 $\frac{\mu g}{kg}$

Šunka

m (uzorka) = 1,02554 g

γ_1 (izmjerena) = $3{,}3394 \cdot 10^{-6}$ μg/mL

γ_2 (izmjerena) = $2{,}85996 \cdot 10^{-6}$ μg/mL

γ (srednja vrijednost) = $3{,}09968 \cdot 10^{-6}$ μg/mL

V (očitan s kivete) = 9 mL

γ (uzorka) = γ (srednja vrijednost) $\cdot \frac{V\ (\text{očitan sa kivete})}{m\ (\text{uzorka})} = 3{,}09968 \cdot 10^{-6}\ \frac{\mu g}{mL} \cdot \frac{9\ \text{mL}}{1{,}02554\ \text{g}}$

$= 2{,}72024 \cdot 10^{-5}\ \frac{\mu g}{g} = 0{,}02702371\ \frac{\mu g}{kg}$

Industrijski proizvodi:

Kulen

m (uzorka) = 1,02037 g

γ_1 (izmjerena) = $1{,}37959 \cdot 10^{-5}$ µg/mL

γ_2 (izmjerena) = $1{,}47719 \cdot 10^{-5}$ µg/mL

γ (srednja vrijednost) = $1{,}42839 \cdot 10^{-5}$ µg/mL

V (očitan s kivete) = 7,7 mL

γ (uzorka) = γ (srednja vrijednost) $\cdot \frac{V\ (\text{očitan sa kivete})}{m\ (\text{uzorka})} = 1{,}42839 \cdot 10^{-5}\ \frac{\mu g}{mL} \cdot \frac{7{,}7\ \text{mL}}{1{,}02037\ \text{g}} =$

$0{,}00010779\ \frac{\mu g}{g} = 0{,}107790341\ \frac{\mu g}{kg}$

Kulen kvrgavi

m (uzorka) = 1,02313 g

γ_1 (izmjerena) = 0,000341676 µg/mL

γ_2 (izmjerena) = 0,000344079 µg/mL

γ (srednja vrijednost) = 0,000342878 µg/mL

V (očitan s kivete) = 8,5 mL

γ (uzorka) = γ (srednja vrijednost) $\cdot \frac{V\ (\text{očitan sa kivete})}{m\ (\text{uzorka})} = 0{,}000342878 \frac{\mu g}{mL} \cdot \frac{8{,}5\ \text{mL}}{1{,}02313\ \text{g}} =$

$0{,}002848571\ \frac{\mu g}{g} = 2{,}848571296\ \frac{\mu g}{kg}$

Kulen kvrgavi - NACIJEPLJENO S 1 mL KONCENTRACIJE 0,002 μg/mL

m (uzorka) = 1,02844 g

γ_1 (izmjerena) = 0,000506323 μg/mL

γ_2 (izmjerena) = 0,00044885 μg/mL

γ (srednja vrijednost) = 0,000477587 μg/mL

V (očitan sa kivete) = 9,9 mL

$$\gamma \text{ (uzorka)} = \gamma \text{ (srednja vrijednost)} \cdot \frac{V \text{ (očitan sa kivete)}}{m \text{ (uzorka)}} = 0{,}000477587\,\frac{\mu g}{mL} \cdot \frac{9{,}9 \text{ mL}}{1{,}02844 \text{ g}} =$$

$$0{,}004597358\,\frac{\mu g}{g} = 4{,}597357503\,\frac{\mu g}{kg}$$

Slavonska salama

m (uzorka) = 1,0481g

γ_1 (izmjerena) = $1{,}94898 \cdot 10^{-5}$ μg/mL

γ_2 (izmjerena) = $1{,}87652 \cdot 10^{-5}$ μg/mL

γ (srednja vrijednost) = 0,000019123 μg/mL

V (očitan s kivete) = 8,3 mL

$$\gamma \text{ (uzorka)} = \gamma \text{ (srednja vrijednost)} \cdot \frac{V \text{ (očitan sa kivete)}}{m \text{ (uzorka)}} = 0{,}000019123\,\frac{\mu g}{mL} \cdot \frac{8{,}3 \text{ mL}}{1{,}0481 \text{ g}} =$$

$$0{,}000151437\,\frac{\mu g}{g} = 0{,}15143679\,\frac{\mu g}{kg}$$

Kulenova seka

m (uzorka) = 1,01055 g

γ_1 (izmjerena) = $6{,}27873 \cdot 10^{-6}$ μg/mL

γ_2 (izmjerena) = $5{,}12798 \cdot 10^{-6}$ μg/mL

γ (srednja vrijednost) = $5{,}70336 \cdot 10^{-6}$ μg/mL

V (očitan sa kivete) = 9 mL

γ (uzorka) = γ (srednja vrijednost) $\cdot \frac{V\ (\text{očitan sa kivete})}{m\ (\text{uzorka})} = 5{,}70336 \cdot 10^{-6} \frac{\mu g}{mL} \cdot \frac{9\ \text{mL}}{1{,}01055\ \text{g}}$

$= 5{,}07943 \cdot 10^{-5} \frac{\mu g}{g} = 0{,}050794315 \frac{\mu g}{kg}$

Seljačka šunka

m (uzorka) = 1,04979 g

γ_1 (izmjerena) = $1{,}34117 \cdot 10^{-5}$ µg/mL

γ_2 (izmjerena) = $1{,}43424 \cdot 10^{-5}$ µg/mL

γ (srednja vrijednost) = $1{,}38771 \cdot 10^{-5}$ µg/mL

V (očitan s kivete) = 9 mL

γ (uzorka) = γ (srednja vrijednost) $\cdot \frac{V\ (\text{očitan sa kivete})}{m\ (\text{uzorka})} = 1{,}38771 \cdot 10^{-5} \frac{\mu g}{mL} \cdot \frac{9\ \text{mL}}{1{,}04979\ \text{g}} =$

$0{,}00011897 \frac{\mu g}{g} = 0{,}118969937 \frac{\mu g}{kg}$

Kobasica

m (uzorka) = 1,01621 g

γ_1 (izmjerena) = 0 µg/mL

γ_2 (izmjerena) = 0 µg/mL

γ (srednja vrijednost) = 0 µg/mL

V (očitan sa kivete) = 9,3 mL

γ (uzorka) = γ (srednja vrijednost) $\cdot \frac{\text{V (očitan sa kivete)}}{\text{m (uzorka)}} = 0 \frac{\mu g}{mL} \cdot \frac{9{,}3\ \text{mL}}{1{,}01621\ \text{g}} = 0 \frac{\mu g}{g} = 0$

$\frac{\mu g}{kg}$