

شناسایی و آنالیز همزمان هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در نمونه‌های نان بربری با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنج جرمی

وحیده مرادی^۱، سید مهدی سیدین اردبیلی^{۲*}، عطاءاله شکوری^۳، سید ابراهیم حسینی^۴

۱- دکترای صنایع غذایی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی-دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۲- دانشیار دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۳- استادیار مرکز تحقیقات سلامت غذا دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۴- دانشیار دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۴/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۹/۱۱)

چکیده

در این پژوهش یک روش معتبر و مؤثر برای آنالیز همزمان ۲۴ نوع هیدروکربن آروماتیک چند حلقه‌ای در نمونه‌های نان بربری سنتی تنوری و فرپز (نیمه صنعتی) با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز طیف سنج جرمی راه‌اندازی گردید. آماده‌سازی نمونه بر اساس روش QuEChERS^۱ انجام شد و روش تدوین شده پس از اعتبار سنجی برای آنالیز نمونه‌های نان به کار گرفته شد. برای بررسی اثر ماتریکس، شیب منحنی کالیبراسیون ترسیم شده با استانداردهای PAH در حلال خالص استونیتریل^۲ و شیب منحنی کالیبراسیون اسپایک شده^۳ در نمونه‌ی بلانک مقایسه شد. در بین ۲۴ ترکیب آنالیز شده، ۲۲ ترکیب (۹۱٪) دارای اثر ماتریکس افزایشی و ۲ ترکیب (۸٪) دارای اثر ماتریکس کاهش‌ی بودند. در نتیجه به منظور غلبه بر اثر ماتریکس از منحنی کالیبراسیون اسپایک شده استفاده شد. شیب منحنی کالیبراسیون برای هر آنالیت در دامنه‌ی غلظت ۵۰۰-۱۰ ng/g به صورت خطی، با ضریب همبستگی (R²) ۰/۹۹۹-۰/۹۹۰ بود. حد تشخیص (LOD) و حد تعیین مقدار (LOQ)، به ترتیب ۰/۱۴-۱/۴۹ ng/g و ۰/۴۶-۴/۹۱ ng/g محاسبه گردید. میانگین درصد بازیافت در سه سطح اسپایک (۲۰۰، ۵۰، ۲۵) در سه روز متوالی (۳ تکرار در هر روز) با دامنه ۸۶-۱۱۱ درصد و انحراف استاندارد نسبی ۱۱/۵۷-۲/۸۵ (RSD<20%) بود. نتایج آنالیز نمونه‌های نان با روش معتبر شده نشان داد که در ۹ نمونه (۴۵٪) نان بربری تنوری سنتی، ترکیب نفتالن با میانگین ۴۶/۳۴±۱/۸۹ ng/g ردیابی شد و در نان‌های بربری فرپز هیچ ترکیبی ردیابی نشد. تمامی مقادیر مثبت شناسایی شده از حدود قانونی اتحادیه اروپا برای غذاهای فرایند شده بر پایه غلات (1.0 ng/g) بیشتر بود. نتایج نهایی نشان داد که تماس با حرارت مستقیم شعله گاز در نان بربری می‌تواند سبب ایجاد ترکیبات آروماتیک شود.

کلید واژگان: کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری جرمی (GC-MS)، ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای، نان بربری

*مسئول مکاتبات: mahdi_seyedain@yahoo.com

1. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe
2. Solvent-based calibration curve
3. Spiked calibration curve

۱- مقدمه

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs)، گروه بزرگی از ترکیبات آلی هستند که از ۲ یا چند حلقه‌ی آروماتیک تشکیل می‌شوند که حداقل دو اتم کربن دو حلقه مجاور مشترک می‌باشند. اسکلت اصلی PAH ها از اتم‌های کربن و هیدروژن شکل می‌گیرد ولی در برخی از آن‌ها هترو اتم‌هایی نظیر نیتروژن و سولفور هم یافت می‌شود. آن دسته ترکیباتی که دارای ۲ تا ۳ حلقه بنزنی هستند به عنوان PAH های سبک (L-PAHs)^۱ و ۴ حلقه بنزن و بیش از آن، به عنوان PAH های سنگین (H-PAHs)^۲ شناخته می‌شوند [۱]. ترکیبات PAH بزرگترین گروه ترکیبات شیمیایی را تشکیل می‌دهند که خصوصیات سرطان‌زایی، جهش‌زایی و آسیب‌زایی بعضی از آنها شناخته شده است. PAH های سنگین (H-PAH) مانند بنزوآپیرن، ایندنو (1,2,3-cd) پیرن، دی بنزو (h,a) آتراسن، بنزو (g,h,i) پیرین سمی و پایدارتر از نوع سبک (L-PAH) می‌باشند [۲]. این ترکیبات از حلالیت کمی در آب برخوردارند و خاصیت چربی دوستی زیادی دارند. بیشتر این ترکیبات فشار بخار پایینی دارند و جذب ذرات می‌شوند. تمام ترکیبات دارای کربن و هیدروژن می‌توانند به عنوان پیش‌ساز PAH در دمای بالا (۵۰۰-۷۰۰°C) عمل کنند. این ترکیبات طی پیرولیز با شکسته شدن به بخش‌های ناپایدار کوچک‌تر (غالباً رادیکال‌های آزاد) و سپس ترکیب شدن با یکدیگر در مجاورت گرما (پیروستز)، PAH های نسبتاً پایدار را تولید می‌کنند. تشکیل PAH ها در دماهای پایین‌تر (۱۵۰°C-۱۰۰) نیز اتفاق می‌افتد ولی به دوره زمانی و مقدار بیشتری ترکیبات آلیکیل‌دار نیاز دارد [۳]. به طور کلی در مواد غذایی، PAHs از کربوهیدرات‌ها در دماهای بالا و در عدم حضور اکسیژن و یا کاهش فشار آن تشکیل می‌شوند. همچنین مشخص شده است که PAHs می‌توانند از اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب نیز به وجود آیند [۴].

بر اساس تحقیقات و بررسی‌های به عمل آمده عمده‌ترین بخش مصرف گندم مربوط به تولید نان است که هر ساله بیش از ۹۰ درصد مقدار عرضه گندم به مصرف تهیه نان می‌رسد که عمده‌ترین گروه غذایی در تامین انرژی و پروتئین دریافتی در رژیم غذایی افراد کشور محسوب می‌شود. نان با توجه به ویژگی‌های منطقه‌ای، فرهنگی، اجتماعی و اقتصادی از منابع اصلی الگوی غذایی روزانه مردم کشور ما می‌باشد و بخش عمده‌ای از نیازهای تغذیه‌ای روزانه‌ی بدن از آن تامین می‌شود. به ویژه این امر در مورد اقشار کم درآمد جامعه که غذای اصلی آن‌ها نان می‌باشد حائز اهمیت است [۵]. متوسط روزانه‌ی تولید نان بر اساس آمار مرکز پژوهش‌های غلات، حدود ۵۰۰ کیلوگرم می‌باشد که با مصرف حدود ۴۰۰ کیلوگرم آرد بدست می‌آید. تحقیقات مرکز پژوهش‌های غلات نشان می‌دهد که مردم ایران ۴۲/۵٪ نان سنگک، ۳۰٪ نان تافتون، ۱۷/۵٪ نان بربری و ۴٪ نان لواش را به عنوان نان اصلی مصرف می‌کنند [۶].

در دهه‌های گذشته آنالیز PAH ها با توجه به امکانات موجود، محدودیت زمانی و نوع پایش با روش‌های دستگاهی مختلفی انجام گرفته است. روش‌های کروماتوگرافی چون HPLC و GC با آشکارسازهای مختلف نظیر FLD, FID, UVD و اخیراً روش‌های حساس‌تر و کارآمدتر GC/MS و LC/MS در آنالیز PAH ها در ماتریکس‌های مختلف به کار برده می‌شود [۷].

امروزه استفاده از آشکارسازهای طیف سنج جرمی یک مزیت مهم به‌شمار می‌آید، زیرا با این نوع آشکارسازها شناسایی (تعیین ماهیت) ترکیبات مورد آنالیز و تعیین مقدار آن‌ها به‌طور همزمان کاملاً امکان‌پذیر است. با طیف جرمی حاصل از آنالیز می‌توان اطلاعات با ارزشی درباره وزن مولکولی، ساختار عنصری، گروه‌های عاملی و در برخی موارد، هندسه و ایزومر فضایی مولکول‌ها به‌دست آورد [۸]. استفاده از گازکروماتوگرافی به همراه طیف سنج جرمی به علت برخورداری از امکانات مورد نیاز و توانمندی و کارایی بالای این روش در آنالیز همزمان PAH ها، روش دستگاهی انتخابی مطالعه حاضر می‌باشد.

1. Low- poly aromatic hydrocarbon
2. High-poly aromatic hydrocarbone

(99.90%)، فلورانتن (FLA, 98.7%)، پیرن (PYR, 98%)، آنتراسن (ANT, 99.40%)، آسفتن (ACP, 99.9%)، پرین (PER, 99.9%)، آسفتیلن (ACL, 99.9%) و استاندارد داخلی تری فنیل فسفات از شرکت زیگما آلدریج^۲ خریداری گردیدند. حلال‌های مورد استفاده شامل اتیل استات و استونیتریل، همگی با درجه آنالیزی (HPLC-grade) از شرکت مرک^۳ و سولفات منیزیم بدون آب، استات سدیم و PSA^۴ از شرکت زیگما آلدریج تهیه شدند. آب دیونیزه از سیستم خاص سازی آب (Milli-Q water) به دست آمد.

۲-۲- آماده‌سازی استانداردهای کاری PAH ها

محلول‌های استوک ۹ استاندارد PAH از توزین ۱۰ میلی‌گرم از هر کدام از استانداردها به طور جداگانه در ۱۰ میلی‌لیتر اتیل استات تهیه شد و از آنها غلظت 1000.0 µg/mL در اتیل استات آماده شد. محلول مخلوطی از ۲۴ ترکیب استاندارد PAH با غلظت 5.0 µg/mL با حل کردن غلظت مناسبی از ۱۵ مخلوط استاندارد و ۹ استاندارد منفرد در استونیتریل تهیه گردید. همه استانداردهای اولیه و کاری از استاندارد مخلوط ۲۴ ترکیب PAH آماده شدند. محلول استوک تری فنیل فسفات (TPP) در اتیل استات به عنوان استاندارد داخلی در غلظت 20 µl/ml به مقدار 50 µl به نمونه‌های نان مورد آزمون اسپایک گردید. تمامی محلول‌های استاندارد در شیشه‌های تیره رنگ (برای جلوگیری از در معرض نور قرار گرفتن) و در دمای 20°C نگهداری شدند.

۲-۳- آماده‌سازی نمونه‌های آزمون

استخراج بر اساس روش QuEChERS معرفی شده در سال ۲۰۰۳ توسط Anastassiades و همکاران، بر پایه استخراج توسط استونیتریل و آبگیری با سولفات منیزیم در حضور یک نمک و پس از آن یک مرحله پاک‌سازی^۵ توسط یک آمین نوع اول دوم به نام PSA انجام شد [۹]. روش به کارگرفته شده با تغییرات اعمال شده بدین ترتیب بود که ۵ گرم نمونه‌ی نان با

آماده‌سازی نمونه گلوگاه اصلی در مراحل آنالیز در محصولات غذایی است. بسیاری از روش‌های آنالیزی وقت‌گیر و سخت بوده و مصرف حلال بالایی دارند و بنابراین پرهزینه هستند. از آنجایی که ممکن است تعداد نمونه‌های مورد آنالیز زیاد باشند، بنابراین روشی سریع مورد نیاز می‌باشد. در حالت ایده‌آل یک روش آنالیز باید سریع و آسان بوده، به مواد شیمیایی کمی احتیاج داشته باشد، اختصاصیت داشته، نیاز به روش‌های پاک‌سازی اضافی نداشته باشد و نیز طیف وسیعی از آنالیت‌ها را در بر گیرد [۹].

هدف از این پژوهش در مرحله‌ی نخست راه‌اندازی یک روش معتبر ارزان و ساده برای آنالیز همزمان ۲۴ نوع هیدروکربن آروماتیک چند حلقه‌ای در نمونه‌های نان بربری سنتی و نیمه صنعتی با استفاده از روش پیشرفته‌ی کروماتوگرافی گازی مجهز به طیف سنج جرمی و سپس استفاده از این روش معتبر برای آنالیز نمونه‌های واقعی نان بربری است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی و استانداردهای PAH

۱۵ استاندارد مخلوط PAH شامل بنزو (C) فلورن (B[a]F, 97%)، بنزو (a) آنتراسن (B[a]A, 99%)، کرایزن (CHR, 99%)، ۵-متیل کرایزن (5-MChr, 99%)، سیکلوپنتا (c,d) پیرن (C[cd]P, 99%)، بنزو (b) فلورانتن (B[b]F, 99%)، بنزو (k) فلورانتن (B[k]F, 99%)، بنزو پیرن (B[a]P, 99%)، دی بنزو (ah) آنتراسن (D[ah]A, 99%)، ایندنو (1,2,3-cd) پیرن (I[cd]P, 99%)، بنزو (ghi) پرین (B[ghi]P, 99%)، دی بنزو (al) پیرن (D[al]P, 99%)، دی بنزو (ae) پیرن (D[ae]P, 99%)، دی بنزو (ai) پیرن (D[ai]P, 99%) و دی بنزو (ah) پیرن (D[ah]P, 99%) از شرکت رستک^۱ و ۹ عدد استاندارد جداگانه مشتمل بر فنانترن (PHE, 99.20%)، نفتالن (NPH, 99.40%)، فلورن (FLR,

2. Sigma Aldrich, United states
3. Merk, Germany
4. primary secondary amin
5. Clean-up

1. Restek United States

استفاده از نوع ستون موئینه DB-5MS capillary (column(30m×0.25mm I.D., (0.25µm film) شرکت Agilent و گاز حامل هلیوم (خلوص 99.999%) با سرعت جریان ثابت 1.6 mL/min با برنامه دمایی آن مطابق زیر به کار رفت: دمای اولیه ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه، با سرعت ۲۰°C/min به دمای ۱۴۰ درجه سلسیوس رسید و به مدت ۱ دقیقه توقف و سپس با سرعت ۵°C/min به دمای ۳۱۵ درجه سلسیوس رسید. دمای اینجکتور ۳۰۰ درجه سلسیوس و با جریان ثابت در مد splitless بود. دمای خط انتقال^۱ و منبع یونی^۲ به ترتیب ۲۸۰ و ۲۳۰ درجه سلسیوس بودند. از دامنه جرمی ۵۰-۵۰۰ m/z برای جستجوی زمان بازداری^۳ و یون‌های تشخیصی^۴ آنالیت‌ها استفاده گردید. از روی زمان بازداری و طیف جرمی یون‌های انتخابی برای شناسایی پیک‌های به دست آمده استفاده شد که حداقل سه یون برای تشخیص و تعیین آنالیت‌ها استفاده شدند. فراوان‌ترین یون با بالاترین نسبت سیگنال به نویز به عنوان یون کمیت یاب^۵ و بقیه به عنوان یون‌های تاییدی^۶ انتخاب شدند.

۲-۵- اعتبارسنجی روش

از آنجایی که اطمینان از کارایی روش به منظور تضمین اعتبار نتایج آزمون، یک عامل اساسی در آزمایشگاه می‌باشد [۱۰]، بنابراین در این پژوهش، بر اساس قوانین اتحادیه اروپا اعتبارسنجی انجام شد [۱۰-۱۲]. در این راستا پارامترهای معتبرسازی چون بررسی اثر ماتریکس، محدوده خطی بودن، مطالعات دقت، صحت، حدود تشخیص (LOD)، حدود تعیین مقدار (LOQ)، انجام گردید. برای محاسبه درصد اثر ماتریکس (ME) روش‌های متفاوتی وجود دارد. در این تحقیق از روش مقایسه شیب منحنی کالیبراسیون اسپایک (A) با شیب منحنی کالیبراسیون ترسیم شده با استانداردهای PAH در حلال خالص استونیتریل (B) که

دقت توزین شد و به یک فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس بر روی نمونه، ۵۰µL استاندارد داخلی TPP با غلظت ng/mL ۲۰۰ افزوده شد. سپس ۱۴ mL استونیتریل به نمونه افزوده شد و به مدت ۳ دقیقه برای خروج ترکیبات PAH ورتکس گردید. روی نمونه ۲ گرم سولفات منیزیم و ۱/۵ گرم استات سدیم اضافه و مجدداً ۳ دقیقه ورتکس شد. در این مرحله فالکون حاوی نمونه به مدت ۵ دقیقه با دور ۹۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سپس ۷ mL از محلول صاف شده رویی برداشته شد و به لوله آزمایش منتقل گردید و توسط دستگاه اواپراتور با گاز نیتروژن تا خشک شدن کامل تبخیر شد. سپس به این لوله که در انتهای آن نمونه تغلیظ شده بود، ۵۰۰µL استونیتریل اضافه شد و بعد ابتدا به مدت ۳ دقیقه ورتکس، سپس ۱۰ دقیقه Sonicate و مجدداً ۳ دقیقه ورتکس شد. در این مرحله تمام ۵۰۰µL نمونه موجود در لوله به یک میکروتیوپ یک میلی‌لیتری حاوی مقدار ۶۰mg سولفات منیزیم و ۲۰mg PSA منتقل و بعد به مدت ۱ دقیقه ورتکس گردید. سپس این مجموعه به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. در آخرین مرحله، محلول رویی با دقت برداشته شد و در نهایت ۲ µL به دستگاه تزریق شد. استفاده از روش استخراج QuEChERS نسبت به روش‌های استخراج دیگر به کار رفته در نان که از حلال‌های خطرناک مانند هگزان و روش زمان‌بر سوکسله استفاده شده است [۱]، علاوه بر اینکه از حلال کمتر و ایمن‌تر در استخراج استفاده می‌شود، مدت زمان کمتری صرف استخراج می‌گردد و به وسایل پیشرفته خاص نیاز ندارد و دارای بازیافت بهتری نسبت به روش سوکسله می‌باشد [۱]. از مزایای دیگر روش حاضر، کم هزینه بودن آن، سرعت و سادگی روش می‌باشد که به راحتی می‌توان در مواد غذایی به کار گرفته شود.

۲-۴- آنالیز دستگاهی

تمامی نمونه‌ها با دستگاه GC مدل Agilent code 7890 مجهز به شناساگر اسپکترومتری جرمی مدل Agilent code 7693 با اینجکتور split/spiltless و اتوسمپلر با کد 5975 (Agilent technologies, USA) انجام شد. ستون مورد

1. transfer line
2. ion source
3. retention time
4. Diagnostic ions
5. Quantitative ion
6. Confirmative ion

میانگین درصد بازیافت^۱ و میزان انحراف معیار نسبی^۲ جهت مطالعه دقت، صحت و تکرارپذیری درون آزمایشگاهی در نرم افزار Excel محاسبه گردید.

۶-۲- ردیابی ترکیبات PAH در نمونه‌های

نان بربری

۴۰ نمونه نان بربری تهیه شده بر اساس استاندارد ملی ایران [۱۵] از نانویی‌های سطح تهران جمع آوری گردید. نان‌ها در تنوره‌های سنتی و فرهای گردان (نیمه صنعتی) با دما ۱۷۰-۲۵۰ درجه سلسیوس با سوخت گاز طبیعی پخته شدند. نمونه‌های نان تهیه شده پس از کدگذاری، خشک شدند و پیش از آنالیز به خوبی آسیاب گردیدند و به آرد کاملاً یکنواخت تبدیل شدند و تا زمان آنالیز در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای انجام آزمون ۵ g نمونه کاملاً یکنواخت شده توزین و آنالیز گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین شرایط دستگاه گاز کروماتوگرافی

اسپکترومتری جرمی

به منظور بهینه‌سازی دستگاه کروماتوگرافی - طیف سنج جرمی، عملیات Tuning قبل از شروع کار انجام شد. برای دستیابی به پارامترهای دستگاه شامل برنامه‌ی دمایی آون، شرایط اسپکترومتری جرمی و ستون مناسب آنالیز، تزریق‌های متعدد انجام شد تا شرایط بهینه به دست آید. پس از تعیین زمان بازداری و یون‌های شاخص هر استاندارد که ۳ یون با توجه به بزرگی جرم، شدت حضور و تکرارپذیری، به عنوان یون شاخص در نظر گرفته شد (جدول ۱)، برنامه SIM جهت آنالیز همزمان ترکیبات PAH نوشته شد.

روش دقیقی می‌باشد، استفاده گردید و سپس با در نظر گرفتن شیب منحنی دو خط فوق و با استفاده از فرمول زیر درصد اثر ماتریکس محاسبه شد [۱۴].

$$ME(\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) 100$$

برای غلبه بر اثر ماتریکس، از روش کالیبراسیون اسپایک با دامنه غلظت ۱۰-۵۰۰ ng/g (۶ نقطه) با سه تکرار جهت رسم منحنی کالیبراسیون و تعیین محدوده خطی بودن استفاده شد. به این منظور به ۵ گرم نمونه نان بلانک، مخلوط ۲۴ ترکیب PAH در سطوح ۱۰ ng/g، ۲۵ ng/g، ۵۰ ng/g، ۱۰۰ ng/g، ۲۰۰ ng/g و ۵۰۰ ng/g و نیز استاندارد داخلی TPP با غلظت ثابت ۲۰۰ ng/g اسپایک و کاملاً مخلوط گردید و طبق روش استخراجی، بر روی نمونه‌ها استخراج و پاک‌سازی صورت گرفت. بعد از آنالیز توسط دستگاه کروماتوگرافی گاز-طیف سنج جرمی، نسبت سطح زیر منحنی هر ترکیب به سطح زیر منحنی استاندارد داخلی، برای هر تکرار محاسبه و میانگین آن گرفته شد و سپس معادله خط، ضریب تعیین مقدار (R^2)، رسم منحنی کالیبراسیون توسط نرم افزار Excel محاسبه گردید. در نمونه‌های اسپایک شده در سطوح پایین با احتساب نسبت سیگنال به نویز ۳/۱ جهت LOD و نسبت سیگنال به نویز ۱۰/۱ جهت LOQ حدود شناسایی و حدود تعیین مقدار هر ترکیب تعیین شد. جهت مطالعه دقت، صحت و تکرارپذیری روش، به نمونه‌های بلانک نان آسیاب شده، غلظت‌ها در سه سطح ۲۵ ng/g، ۵۰ ng/g و ۲۰۰ ng/g از مخلوط PAHها و برای هر سطح ۹ نمونه (جمعاً ۲۷ نمونه) در سه روز متوالی اسپایک شدند. به تمام نمونه‌ها استاندارد داخلی TPP با غلظت ثابت ۲۰۰ ng/g افزوده گردید. نمونه‌ها مطابق روش آماده‌سازی نمونه استخراج شدند و

1. Recovery
2. %RSD or %CV

Table 1 Names, Molecular weights, Quantification and Confirmation ions and Retention Times of studied PAHs

NO.	Compound	abbreviation	Molecular Weight (g/mol)	Quantification Ion (m/z)	Confirmation Ions (m/z)	Retention Time (min)
1	Naphthalene	NPH	128	128	128,127,129	5.19
2	Acenaphthylene	ACL	152	152	152,151,76	8.18
3	Acenaphthene	ACP	154	153	153,154,76	8.63
4	Fluorene	FLR	166	166	166,165,82	10.16
5	Phenanthrene	PHE	178	178	178,179,76	12.91
6	Anthracene	ANT	178	178	178,179,76	13.09
7	Fluoranthene	FLA	202	202	202,200,201	17.40
8	Pyrene	PYR	202	202	202,200,201	18.27
9	Benzo(c)fluorene	B(c)F	216	216	216,215,217	20.17
10	Cyclopenta(c,d)pyrene	CP(c,d)P	226	226	226,227,225	23.49
11	Benz(a)anthracene	B(a)A	228	228	228,226,229	23.66
12	chrysene	CHR	228	228	228,41,113	23.79
13	5-Methylchrysene	5-M-CHR	242	242	242,241,239	25.82
14	Benzo(b)fluoranthene	B(b)F	252	252	252,250,253	28.25
15	Benzo(k)fluoranthene	B(k)F	252	252	252,250,253	28.35
16	Benzo(a)pyrene	B(a)P	252	252	252,250,253	29.76
17	Perylene	PER	252	252	252,250,253	29.96
18	Indeno (1,2,3-cd)pyrene	I(1,2,3-cd)P	276	276	276,277,138	33.45
19	Dibenzo(a,h)anthracene	DB(a,h)A	278	278	278,279,138	33.67
20	Benzo(g,h,i)perylene	B(g,h,i)PER	276	276	276,277,138	34.25
21	Dibenzo(a,l)pyrene	DB(a,l)P	302	302	302,303,300	37.84
22	Dibenzo(a,e)pyrene	DB(a,e)P	302	302	302,303,300	38.84
23	Dibenzo(a,i)pyrene	DB(a,i)P	302	302	302,303,300	39.19
24	Dibenzo(a,h)pyrene	DB(a,h)P	302	302	302,303,150	39.37

ترکیب بیشتر از ۰/۹۹۰ به دست آمد که همگی مطابق با معیار اتحادیه اروپا و ICH^۳ بود [۱۶]. تحقیقات اسلامی زاد و همکاران (۱۷ و ۱۸) در نان، ضریب همبستگی ۰/۹۹۷ بدست آمد. بنابراین بر اساس نتایج به دست آمده فرآیند استخراج و آنالیز دارای کارایی لازم در شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات PAH می‌باشد.

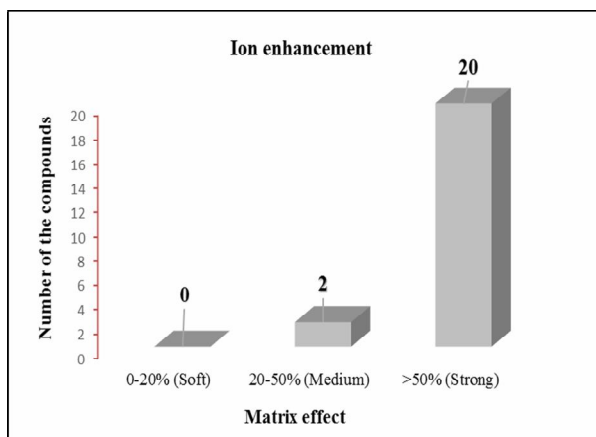


Fig 1 Ion enhancement matrix effect in analysis of studied PAHs in bread by GC-MS

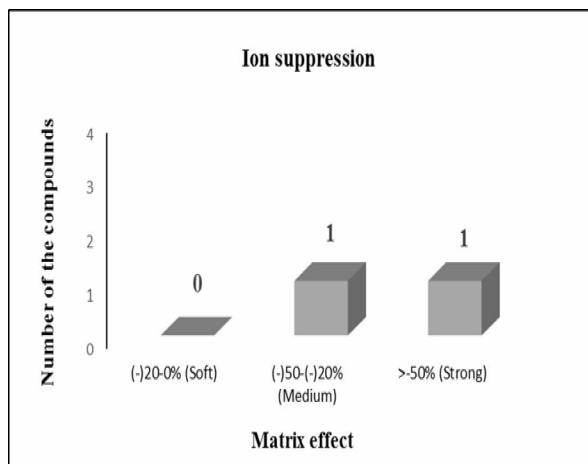


Fig 2 Ion suppression matrix effect in analysis of studied PAHs in bread by GC-MS

۲-۳- بررسی اثر ماتریکس

اثر ماتریکس، از رقابت بین آنالیت و مولکول‌های همراه آن ناشی می‌شود. این رقابت یا سبب کاهش یونیزاسیون آنالیت می‌شود که به آن فرونشانی یونی^۱ گویند و یا باعث تقویت یونیزاسیون آنالیت می‌گردد که به آن تقویت یا افزایش یونی^۲ گفته می‌شود [۱۳]. نان به دلیل داشتن انواع مولکول‌های آلی می‌تواند تغییرات چشمگیری در پاسخ‌های کروماتوگرام ترکیبات PAH مورد مطالعه ایجاد نماید. بنابراین باید اثر ماتریکس نان به دقت بررسی و در آنالیز نمونه‌ها لحاظ گردد. روش کالیبراسیون اسپایک برای غلبه بر اثر ماتریکس به کار رفت. بدین منظور استانداردهای کالیبراسیون با افزودن محلول استاندارد به نمونه‌های بلانک نان و مطابق روش آماده‌سازی نمونه آماده شدند. منحنی کالیبراسیون با ۶ غلظت (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ ng/g) با سه تکرار رسم شد. نتایج نشان داد که اثر ماتریکس نان بر ترکیبات PAH مورد مطالعه به دو صورت کلی فرونشانی یونی و تقویت یونی نمایان گردید. از بین ۲۴ ترکیب، ۲۲ ترکیب (۹۱٪) دارای اثر ماتریکس افزایشی و ۲ ترکیب (۸٪) دارای اثر ماتریکس کاهشی بودند در صورتی‌که در تحقیقات Al-Rashdan و همکاران، در هیچ کدام از ترکیبات PAH در انواع نان‌های آزمون شده اثر ماتریکسی مشاهده نشد [۱]. شکل ۱ و ۲ اثر ماتریکس افزایشی و کاهشی در ترکیبات PAH در نان را به ترتیب نشان می‌دهد.

۳-۳- رسم منحنی کالیبراسیون و بررسی خطی بودن روش

نتایج جدول ۲ نشان داد که منحنی‌های کالیبراسیون برای تمام ۲۴ ترکیب در محدوده ۱۰-۵۰۰ ng/g خطی بود. ضریب تعیین مقدار (R^2)، با احتساب سه رقم اعشار، برای تمام ۲۴

3. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

1. Ion suppression
2. Ion enhancement

Table 2 Regression equations and coefficients of determination (R^2), LOQs, LODs (ng/g) obtained for studied PAH in bread samples

Compound	Regression Equation (n=18)	Coefficients of Determination (R^2)	LOD ^a	LOQ ^b
NPH	$y = 0.0003x + 0.009$	0.99	1.49	4.91
ACL	$y = 0.002x + 0.038$	0.998	0.65	2.50
ACP	$y = 0.025x + 0.134$	0.991	0.65	2.15
FLR	$y = 0.005x + 0.052$	0.997	0.75	2.48
PHE	$y = 0.005x + 0.077$	0.998	0.61	2.01
ANT	$y = 0.003x + 0.011$	0.998	0.56	1.85
FLA	$y = 0.006x - 0.006$	0.999	0.14	0.46
PYR	$y = 0.007x - 0.037$	0.996	0.87	2.88
BcF	$y = 0.006x - 0.002$	0.999	0.18	0.60
CPcdP	$y = 0.005x - 0.002$	0.996	0.82	2.71
BaA	$y = 0.005x + 0.012$	0.999	0.24	0.80
CHR	$y = 0.013x - 0.068$	0.998	0.20	0.67
5-M-CHR	$y = 0.005x + 7E-05$	0.999	0.24	0.80
BbF	$y = 0.008x + 0.015$	0.999	0.35	1.15
BkF	$y = 0.003x + 0.008$	0.999	0.39	1.28
BaP	$y = 0.017x - 0.106$	0.994	0.79	2.59
PER	$y = 0.006x + 0.012$	0.999	0.39	1.29
Indeno cd P	$y = 0.006x + 0.021$	0.998	0.56	1.85
DBahA	$y = 0.005x + 0.004$	0.999	0.36	1.19
BghiPER	$y = 0.009x + 0.072$	0.998	0.58	1.90
DBalP	$y = 0.014x - 0.057$	0.997	0.59	1.96
DBaeP	$y = 0.004x + 0.011$	0.999	0.30	1.52
DBaiP	$y = 0.003x + 0.020$	0.996	0.84	2.76
DBahP	$y = 0.002x + 0.027$	0.998	0.57	1.88

^aLOD, limit of detection for a S/N = 3.^bLOQ, limit of quantification for a S/N = 10.

ترکیب بنزوآیرن در نان، مقدار ۰/۳ ng/g برای LOD و ۰/۵ng/g برای LOQ تعیین شد.

۳-۵- تعیین درصد بازیافت و تکرارپذیری روش

پس از تزریق سه غلظت متفاوت از نمونه‌های اسپایک شده، میانگین درصد کلی بازیافت بین محدوده ۱۱۱/۹۳ - ۸۶/۸۸ قرار داشت. همان‌طور که شکل ۳ نشان می‌دهد، در محدوده بازیافتی ۸۰٪ - ۷۰٪ هیچ ترکیبی وجود نداشت، در حالی که میانگین بازیافت ۸/۳٪ ترکیبات بین محدوده ۹۰٪ - ۸۰٪، ۴۵/۸٪ از ترکیبات بین ۱۰۰٪ - ۹۰٪، ۳۷/۵٪ از ترکیبات بین ۱۱۰٪ - ۱۰۰٪ و ۸/۳٪ از ترکیبات بین ۱۲۰٪ - ۱۱۰٪ بودند که این نتایج نشان از صحت روش دارد.

۳-۴- تعیین حد تشخیص (LOD) و حد تعیین

مقدار (LOQ)

طبق معیار ICH، با احتساب نسبت سیگنال به نویز ۳/۱ جهت LOD و نسبت سیگنال به نویز ۱۰/۱ جهت LOQ حدود شناسایی و حدود تعیین مقدار هر ترکیب تعیین شد. براساس آنچه که در جدول ۲ دیده می‌شود، مقادیر LOD و LOQ به دست آمده برای ترکیبات PAH مورد مطالعه به ترتیب ng/g ۰/۱۴-۱/۴۹ و ۰/۴۶-۴/۹۱ بودند که همگی مطابق معیارهای ICH بود [۱۶]. در تحقیقات اسلامی زاد و همکاران (۱۸) برای

۶-۳- ردیابی ترکیبات PAH در نان‌های بربری آنالیز شده

نتایج آنالیز بر روی نمونه‌های نان نشان داد که از میان ۲۰ نمونه نان بربری فریز (نیمه صنعتی) آنالیز شده، در هیچ‌کدام از نمونه‌ها ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای ردیابی نشد، ولی در نان بربری تنوری سنتی، از ۲۰ نمونه نان آنالیز شده در ۹ نمونه (۴۵٪ ترکیبات مورد مطالعه) ترکیب نفتالن (NPH) با میانگین ng/g $1/89 \pm 6/34$ ردیابی شد که مقدار آن از حدود قانونی اتحادیه اروپا برای غذاهای فرایند شده بر پایه غلات (1.0 ng/g) بیشتر بود [۱۹]. آنچه قابل توجه می‌باشد این است که تمام نمونه‌های مثبت در نان‌های تهیه شده در تنور سنتی که با حرارت مستقیم پخته شدند، ردیابی گردید. مطالعات گذشته نشان داده است که درباره PAHها در نان‌های ایرانی و خصوصاً نان‌های سنتی تحقیقات کمی انجام گرفته است. در مطالعات انجام شده توسط Al-Rashdan و همکاران، تعداد ۱۶ ترکیب PAH در ۱۸ نمونه نان و آرد بررسی شد. از ۱۸ نمونه مورد مطالعه، تعداد ۷ نمونه، نان‌های ایرانی حاصل از آرد سفید پخته شده با آون گازی بودند. از میان ترکیبات شناسایی شده در نان‌های مورد مطالعه، ترکیبات نفتالن (NPH)، فلورن (FLR) و فنانترون (PHE) بیشترین ترکیبات شیمیایی تولید شده بودند. همچنین آنها گزارش کردند که نمونه‌های نان ایرانی دارای مقادیر بالای NPH با دامنه ng/g $1-102$ و PHE با دامنه ng/g $22-177$ بودند. از آنجایی که در ایران اکثر نان‌های سنتی با حرارت مستقیم شعله گاز در زمان کوتاه پخته می‌شوند، بنابراین مقادیر بالای این دو ترکیب به دلیل شعله مستقیم گاز می‌تواند تولید شود [۱]. در یافته‌های ما نیز مانند مطالعات Al-Rashdan و همکاران، ترکیب NPH از جمله ترکیبی بود که ردیابی شد. همچنین به دلیل اینکه نمونه‌های مثبت فقط در نان بربری‌های سنتی که با حرارت مستقیم پخت می‌شوند وجود داشت، بنابراین در این پژوهش هم اثر شعله‌ی مستقیم در تولید ترکیبات آروماتیک در نان دیده می‌شود. تحقیقات بر روی نان بربری انجام نگرفته است ولی در تحقیقی که توسط اسلامی‌زاد و همکاران [۱۷] بر روی تعیین ترکیب بنزوآپیرن (BaP) در نان‌های سنتی و نیمه صنعتی سنگگ و نان صنعتی در تهران انجام گرفت، نتایج نشان داد که $35/5\%$ از

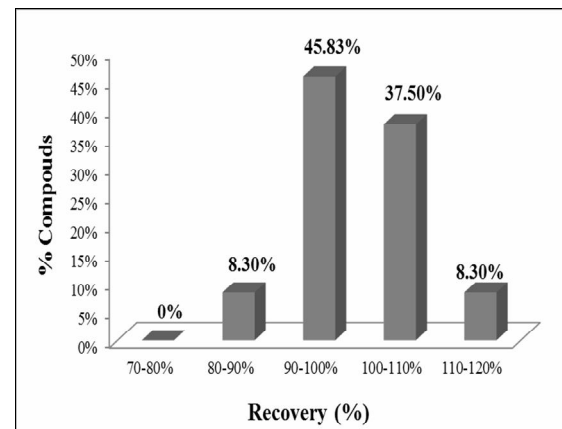


Fig 3 Recovery percent of studied PAHs in bread samples

همچنین بررسی میزان انحراف استاندارد نسبی (RSDr) که بیان کننده تکرارپذیری روش است، نشان داد که $7/7\%$ ترکیبات دارای میزان انحرافات بین $5\% - 25\%$ ، ترکیبات بین $10\% - 5\%$ و $8/3\%$ ترکیبات دارای انحراف بین $10\% - 15\%$ بوده و هیچ ترکیبی در محدوده $20\% - 15\%$ قرار نداشت و میانگین کلی درصد انحراف استاندارد نسبی نیز در محدوده $11/57 - 2/85$ بود (شکل ۴). بنابراین نتایج آنالیزهای سه روزه و میانگین آنها نشان داد که در تمام نمونه‌های انجام شده میزان بازیافت در محدوده $70-120\%$ و انحراف نسبی (RSD) کمتر از 20% بود که نشان دهنده صحت و دقت بسیار خوب روش مورد مطالعه و مطابق با معیارهای ICH بود [۱۶]. تحقیقات اسلامی‌زاد و همکاران (۱۸) بازیافت $119/85 - 110/5$ بنزوآپیرن در نمونه‌های اسپایک و مقادیر کمتر از $11/68\%$ برای RSD را نشان داد و در تحقیقی دیگر (۱۷) مقدار بازیافت $97-120\%$ درصد بود.

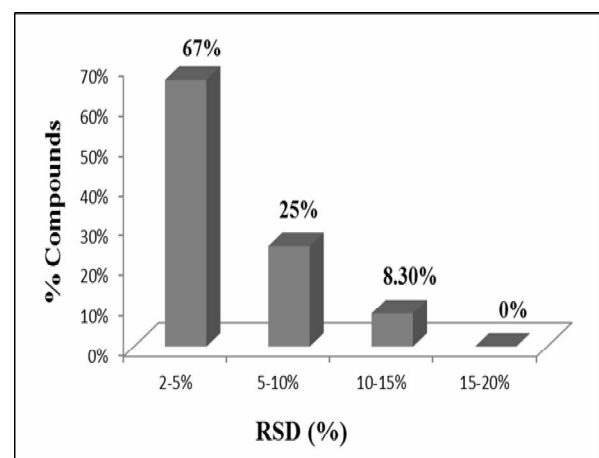


Fig 4 Percentage of relative standard deviation of studied PAHs in bread samples

بنابراین در نان‌های بربری بررسی شده در مقایسه با نان‌های سنگگ تحقیقات پیشین [۱۸ و ۱۹]، در هیچ‌کدام از نمونه‌ها ترکیب BaP ردیابی نشد.

نمونه‌های نان به BaP آلوده بودند و مقدار آن از حدود قانونی اتحادیه اروپا برای غذاهای فرایند شده بر پایه غلات (1.0 ng/g) بیشتر بود [۱۹]. در تحقیق دیگری ردیابی BaP در نان سنگگ نشان داد که از ۲۹ نمونه نان، ۲ نمونه مثبت بودند [۱۸].

Table 3 PAHs values determined in semi industrial (n=20) and traditional Barbary bread samples (n=20).

Compound	Semi industrial bread		Traditional bread				
	Numbers of positive samples	Numbers of positive samples	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Mean ±SD (ng/g)	Min Level (ng/g)	Max Level (ng/g)
NPH	0	9 (45%)	1.49	4.91	46.34 ±1.89	44.254	47.954
ACL	0	0	0.65	2.50	0	nd	nd
ACP	0	0	0.65	2.15	0	nd	nd
FLR	0	0	0.75	2.48	0	nd	nd
PHE	0	0	0.61	2.01	0	nd	nd
ANT	0	0	0.56	1.85	0	nd	nd
FLA	0	0	0.14	0.46	0	nd	nd
PYR	0	0	0.87	2.88	0	nd	nd
B(c)F	0	0	0.18	0.60	0	nd	nd
CP(c,d)P	0	0	0.82	2.71	0	nd	nd
B(a)A	0	0	0.24	0.80	0	nd	nd
CHR	0	0	0.20	0.67	0	nd	nd
5-M-CHR	0	0	0.24	0.80	0	nd	nd
B(b)F	0	0	0.35	1.15	0	nd	nd
B(k)F	0	0	0.39	1.28	0	nd	nd
B(a)P	0	0	0.79	2.59	0	nd	nd
PER	0	0	0.39	1.29	0	nd	nd
I(1,2,3-cd)P	0	0	0.56	1.85	0	nd	nd
DB(a,h)A	0	0	0.36	1.19	0	nd	nd
B(g,h,i)PER	0	0	0.58	1.90	0	nd	nd
DB(a,l)P	0	0	0.59	1.96	0	nd	nd
DB(a,e)P	0	0	0.30	1.52	0	nd	nd
DB(a,i)P	0	0	0.84	2.76	0	nd	nd
DB(a,h)P	0	0	0.57	1.88	0	nd	nd
Σ24 PAHs	0	9 (45%)	-	-	0	nd	nd

*nd: not detected

۴- نتیجه‌گیری

تأثیرگذار بر آنالیز انجام گرفت، روش معتبر شده در آنالیز نمونه‌های نان با موفقیت به کار گرفته شد. نتایج نشان داد که در نان‌های بربری فریز که از حرارت غیرمستقیم در آن استفاده شده است، ترکیب PAH ردیابی نشد ولی در نان‌های بربری تنورپز از ۲۰ نمونه نان آنالیز شده، در ۹ نمونه ترکیب نفتالن با مقداری بالاتر از حدود قانونی اتحادیه اروپا برای غذاهای فرایند شده بر پایه غلات (1.0 ng/g) ردیابی شد.

در این تحقیق روش QuEChERS و دستگاه گاز کروماتوگرافی مجهز به اسپکترومتری جرمی برای استخراج و پاک‌سازی (clean up) و آنالیز ۲۴ ترکیب هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای در نان سنتی و نیمه صنعتی بربری به کار رفت. روش به کار گرفته شده در آماده‌سازی نمونه روشی آسان، کم هزینه و سبب صرفه‌جویی در زمان می‌گردد. پس از اطمینان از کارایی روش که توسط اعتبارسنجی روش و محاسبه پارامترهای

۵- منابع

- quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. (2012). Available at: http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntlD=727.
- [12] European Commission. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. 2002. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content>.
- [13] Paul, J.T. (2005). Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 38, 328-334.
- [14] Kmellar, B., Fodor, P., Pareja, L., Ferrer, C., Martinez-Uroz, M.A., Valverde, A and Fernandez-Alba, A.R. (2008). Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by Liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1215, 37-50.
- [15] Unnamed. (1999). Cereal and cereal products - Flat bread - Barbary - Code of practice. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. ISIRI number 5809.
- [16] Chandran, S., Sing, R.S.P. (2007). Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie*, 62, 4-14.
- [17] Eslamizad, S., Kobarfard, F., Javidnia, K., Sadeghi, R., Bayat, M., Shahabipour, S., Khalighian, N and Yazdanpanah, H. (2016). Determination of Benzo [a] pyrene in traditional, industrial and semi-industrial breads using a modified QuEChERS extraction, dispersive SPE and GC-MS and estimation of its dietary intake. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 15 (Special issue): 165-74.
- [18] Eslamizad, S., Yazdanpanah, H., Javidnia, K., Sadeghi, R., Bayat, M., Shahabipour, S., Khalighian, N., and Kobarfard, F. (2016). Validation of an Analytical Method for determination of Benzo[a]pyrene bread using QuEChERS method by GC-MS. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 15 (2), 465-474.
- [19] Official Journal of the European Union, Commission Regulation No. 1881/2006 of the December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- [1] Al-Rashdan, A., Helaleh, M. I. H., Nisar, A., Ibtisam, A. & Al-Ballam, Z. (2010). Determination of the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread using gas chromatography mass spectrometry. *International Journal of Analytical Chemistry*, 1-8.
- [2] Li, G., Wu, Sh., Wang, L., Akoh, C. (2016). Concentration, dietary exposure and health risk estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in youtiao, a Chinese traditional fried food. *Food Control*, 59, 328-336.
- [3] Purcaro, G., Moret, S., & Conte, L.S. (2013). Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: occurrence, legislation and innovative determination in foods. *Talanta*, 105, 292-305.
- [4] Shibamoto, T., Bjeldanes, L.F. (2009). *Introduction to food toxicology: Academic press*, second edition, 320-325.
- [5] Sahari, M.H. (2010). Design of bread quality indicators. Government trading corporation of Iran. Cereal research center and tarbiat modares university. Project NO. 88031.
- [6] Azizi, M.H. (2011). The survey of the capacity of the kind of traditional breads production in a massive industrial way. Government trading corporation of Iran. Cereal research center and national nutrition and food technology research institute.
- [7] Lerda, N. (2011). Poly aromatic hydrocarbons factsheet, 4th edition. JRC (Joint Research Center) 66955, 27-30.
- [8] Kobarfard, F., Amidi, S. (2007). Principles and Applications of Liquid Chromatography - Mass Spectrometry. Salekan Publication Co., Tehran, Iran, 1-45.
- [9] Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Tajnbaheer, D., & Schenck, F.J (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residue in produce. *Journal of AOAC international* 86, 412-431.
- [10] Commission Regulation (EC) No 333/2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs. (2011). Available from: http://www.iss.it/binary/lcdr2/cont/CR_333_2007.pdf.
- [11] European Commission. Document No. SANCO/12495/2011: Method validation and

Identification and simultaneous analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Barbary bread samples using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Moradi, V. ¹, Seyedain Ardabili, S. M. ^{2*}, Shakoori, A. ³, Hoseyni, S. E. ⁴

1. PHD of Faculty of Agricultural Science and Food Industry, Department of Science and Food Industry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Associate Professor of Faculty of Agricultural Science and Food Industry, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Assistant professor of Food Safety Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Associate Professor of Faculty of Agricultural Science and Food Industry, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

(Received: 2019/07/14 Accepted:2019/12/02)

In this research a validated and effective method for simultaneous analysis of 24 poly aromatic hydrocarbons (PAHs) using gas chromatography-mass spectrometric detector was developed in traditional and semi industrial bread samples. Sample preparation was done based on QuEChERS method and developed method was validated and applied for analysis of bread samples. Matrix effect was evaluated by comparing the slopes of solvent-based calibration curve and spiked calibration curve in blank sample. Among the 24 analyzed compounds, 22 (91%) and 2 (8%) compounds presented the ion enhancement and ion suppression respectively. Therefore spiked calibration curve was used for overcoming matrix effect. In the concentration range of 10-500 ng/g, the calibration curves for each analyte was linear with a determination coefficient (R^2) of 0.990 to 0.999. The limits of detection (LODs) and quantitation (LOQs) for different PAHs were between 0.14-1.49 and 0.46-4.91 ng/g, respectively. The mean recoveries obtained for three fortification levels (25, 50 and 200 ng/g, three replicates in each day) in three consecutive days were 86-111% ($n=27$), and also the average of relative standard deviations (RSDs) of PAHs were in the range of 2.85-11.57% with a satisfactory precision ($RSD < 20\%$). Analysis of bread samples using the validated method showed that Naphthalene was found in 9 traditional Barbary bread samples (45%) in the range of 46.34 ± 1.89 ng/g and any compounds was detected in semi- industrial samples. All of the obtained positive results were higher than the legal permissible limits (1.0 ng/g) proposed by the European Union for processed cereal-based foods. The final findings showed that direct flame exposure in gas oven during baking of Barbary bread could produce PAH compounds.

Keywords: Gas chromatography- mass spectrometry (GC-MS); Poly Aromatic Hydrocarbons; Barbary bread.

* Corresponding Author E-Mail Address: mahdi_seyedain@yahoo.com