

POLİSİKLIK AROMATİK HİDROKARBON (PAH)'LARDAN BENZO(A)PİRENİN SIZMA, RİVİERA VE PRİNA ZEYTİNYAĞLARINDA BELİRLENMESİ*

DETERMINATION OF BENZO(A)PYRENE FROM POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN EXTRA VIRGIN, RIVIERA AND OLIVE POMACE OILS

Zehra BALOĞLU¹, Ali BAYRAK²

¹Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Ankara İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Ankara

²Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

ÖZET: Bu çalışma, 20 adet naturel sızma zeytinyağı, 20 adet riviera zeytinyağı ve 10 adet rafine prina yağında bulunan benzo(a)piren (BaP) miktarlarını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Örneklerin hazırlanmasında silika kartuş kullanılmış ve katı faz ekstraksiyonu yapılmıştır. Analizler floresans dedektörü ile kombine edilmiş HPLC cihazında yapılmıştır. Yöntemde ortalama geri alma oranı % 76,08 ± 1,49, tespit edilebilir en düşük miktar 0,3 µg/kg olarak belirlenmiştir. Bu bilgiler, yöntemin zeytinyağlarındaki BaP miktarının belirlenmesinde rutin olarak kullanılabilmesini göstermiştir.

Analizi yapılan naturel sızma zeytinyağı örneklerinin 3'ünde 0,330 µg/kg ile 0,870 µg/kg arasında BaP tespit edilmiştir. Bu örnekler için ortalama BaP miktarı 0,539 ± 0,167µg/kg'dır. Riviera zeytinyağının 8'inde tespit edilebilir düzeyde BaP kalıntısına rastlanmazken, 12'sinde 2,465 µg/kg seviyesine kadar BaP bulunmuştur. BaP tespit edilen örneklerde ortalama miktar 0,737 ± 0,192 µg/kg olarak saptanmıştır. Prina yağlarının çoğunda yüksek miktarlarda BaP bulunmuştur. BaP tespit edilen 7 örnekte ortalama miktar 31,472 ± 7,42 µg/kg (en az: 0,460 µg/kg, en çok: 58,241 µg/kg)'dir.

Naturel sızma zeytinyağı, riviera zeytinyağı ve prina yağlarının ortalamaları arasındaki farklılıkların irdelenmesinde varyans analizi tekniği kullanılmış ve ortalamalar arasındaki farkların önemli olduğu saptanmıştır. Farklı yağ gruplarının tespitinde ise DUNCAN testinden yararlanılmış, sadece prina yağı ortalaması ile diğer yağ örneklerinin ortalamaları arasındaki farkların istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir (p< 0,01).

Anahtar kelimeler: Benzo(a)piren, sızma, riviera, prina, zeytinyağı, HPLC

ABSTRACT: This study was carried out to determine the amount of benzo(a)pyrene in 20 of extra virgin olive oils, 20 of riviera olive oils and 10 of refined olive pomace oils.

Solid phase extraction (silica cartridge) was used in the preparation of samples. Analyses were made by HPLC combined with fluorescence dedector. In this method, mean of recovery was found % 76,08 ± 1,49 and limit of dedection was 0,3 µg/kg. The findings showed that this method can be used for determining benzo(a)pyrene in olive oils for routine analysis.

In three of the extra virgin olive oil samples analysed, BaP was determined between 0,330 µg/kg and 0,870 µg/kg and mean concentration was 0,539 ± 0,167µg/kg.

BaP was not determined at limit of dedection in eight of riviera olive oils samples whereas, it was found 2,465 µg/kg in 12 of these samples. In the samples containing BaP, mean concentration of BaP was determined 0,737 ± 0,192 µg/kg.

In the most of the olive pomace oils, BaP was found at the highest level. The mean concentration of BaP was 31,472 ± 7,42 µg/kg (min: 0,460 µg/kg, max: 58,241 µg/kg) in 7 samples containing BaP.

Results were analyzed by the one-way analysis of variance for determining the differences among the BaP concentrations of extra virgin olive oils, riviera olive oils, olive pomace oils. It was found that the mean concentrations were significantly different (p<0,09) DUNCAN test for comparison among means, only mean concentration of BaP in olive pomace oil was statistically significant (p< 0,01).

Key words: Benzo(a)pyrene, extra virgin, riviera, olive-pomace, olive oil, HPLC

* Bu çalışma Zehra BALOĞLU'nun Yüksek Lisans tezinden hazırlanmıştır.

² E-posta: abayrak@eng.ankara.edu.tr

GİRİŞ

Polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)'lar, çeşitli şekillerde birleşen iki veya daha fazla benzen halkalı bileşikler olup, organik maddelerin tamamlanmamış yanması sonucu oluşurlar (1, 2, 3, 4, 5, 6).

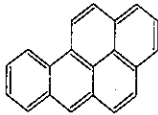
Yapılan çalışmalar PAH'ların insanlarda ve çeşitli hayvanlarda kanserojenik etkiye neden olduğunu veya kanser oluşumunu uyardığını bildirmektedir (4, 6, 7, 8, 9, 10).

PAH'lar çevreyi kirleten diğer maddelerle karşılaştırıldığında çok düşük derişimde bulunmalarına rağmen, kanserojenik ve mutajenik etkilerinin çok büyük (11, 12) olduğu anlaşılmaktadır. Bunlar hem lipofilik olmalarından hem de çevrede yaygın olarak bulunmalarından dolayı yağlara kolayca bulaşır (8, 13). PAH'ların yağlara bulaşması çevresel kirliliklerden ve/veya rafınasyondan önceki işlem basamaklarının birinden olabilir (12, 14).

Bitkisel yağlardaki PAH kontaminasyonu hakkında farklı görüşler vardır (3). Bu görüşlere göre PAH'lar hava kirliliği, tarlaların yakılması, toprak-su, ambalaj materyali, jüt çuvaları, yağlama yağları ve ekstraksiyon çözücülerini gibi faktörlerin biri veya birkaçı ile bitkilerin yenilebilir kısımlarına ve/veya biyokimyasal sentezle bitkilere bulaşabilirler (3, 11, 12, 13, 15), özellikle prina yağlarında bulunurlar. Bu durum üretim sırasındaki birkaç faktörden kaynaklanabilir. Birincisi, prinanın kurutulması aşamasında, ikincisi çözücünün uçurulması sırasında yüksek sıcaklık uygulanması, üçüncüsü prinadan yağın ekstraksiyonu sırasında, önceden kontamine olmuş çözücünün kullanılmasıdır (16, 17, 18, 19).

Yağlı tohumların yanıcı gazlarla doğrudan kurutulması sırasında, ayçiçek, soya, palm, üzüm çekirdeği ve hindistancevizi yağı gibi bazı yağlar PAH'larla kontamine olabilir. Fakat bütün bu bilgilere rağmen, çoğu PAH'ların bitkisel yağlara kontaminasyonu yolu ile olduğuna dair kesin bilgiler yoktur (15).

Rafınasyon, seçilen koşullara bağlı olarak PAH'ların miktarını azaltır (11, 15, 20, 21, 22). Bu azalma PAH'ların molekül ağırlığının bir fonksiyonudur (10). Bitkisel yağlardan PAH'ların uzaklaştırılması rafınasyon basamaklarından renk açma ve koku giderme aşamasında gerçekleşir (23). Hafif PAH'lar çoğunlukla koku giderme aşamasında buharlaştırma yolu ile, daha yüksek molekül ağırlıklı PAH'lar ise renk açma işlemi ile uzaklaştırılır (3). Aktif karbon ile ağartma toprağı kombine edildiğinde, ağır PAH'ların uzaklaştırılması daha etkin olmaktadır (24, 25). Ağır PAH'lar tamamen uzaklaştırılmaz (10), 5-6 halkalı ağır PAH'ların hafif olanlara oranla daha zor uzaklaştırılmasının nedeni, daha hidrofobik ve uçuculuklarının daha az olmasıdır (26). Uluslararası Kanseri Araştırma Merkezi (IARC)'ne göre PAH'lardan en kanserojenik ve mutajenik olanı BaP'dir. Bu nedenle su ve gıdalardaki PAH analizlerinde belirteç olarak kullanılır (3, 8, 12, 23, 27). Polisiklik aromatik hidrokarbonlardan olan BaP, IUPAC tarafından 3,4-benzopiren olarak isimlendirilen organik bir bileşiktir (28). BaP'in kimyasal formülü, bazı özellikleri ve oluşumu aşağıda verilmiştir.



Şekil 1. BaP'in kimyasal formülü (29)

Cas no: 50-32-8

EINECS no: 200-028-5

Molekül ağırlığı: 252,32

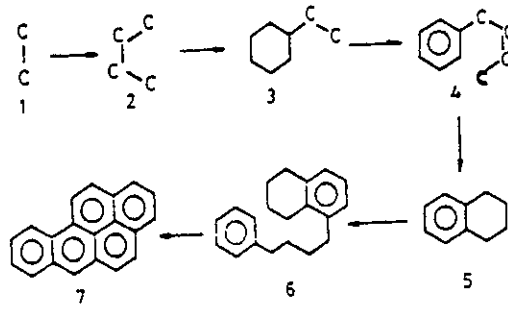
Molekül formülü: C₂₀H₁₂

Kaynama noktası: 495 °C

Erime noktası: 178 °C

Buhar basıncı: 8,4x10⁻⁷ Pa (25 °C)

Yoğunluğu: 1,351 g/cm³



Şekil 2. BaP'in oluşum şeması (30).

BaP'in kanserojenik özellikleri ispat edilmiş olmasına rağmen, kanserin nedenlerinin çeşitli olması ve toksikolojik etkilerinin tahmininin zor olması nedeniyle, sağlık riski oluşturan PAH seviyeleri belirlenememiştir (21).

Almanya, Avusturya, Hollanda gibi bazı Avrupa ülkeleri tükülenmiş gıdalarda BaP için 1 ppb'yi yasal limit kabul etmiştir (31). Fakat bu ülkelerin katı ve sıvı yağlar için yasal limitleri bulunmamaktadır (21).

Rafine edilmiş yağlardaki PAH'ların en yüksek seviyeleri, toplam PAH < 25 ppb, ağır PAH < 5 ppb ve BaP < 1 ppb olarak Avrupa Yenebilir Yağ Üreticileri Ticari Birliği (FEDIOL) tarafından kabul edilmiştir (32).

İspanya, toplam ağır PAH için 5 ppb, her bir ağır PAH için 2 ppb sınır belirlemiştir (3). Türkiye, katı ve sıvı yağlar için 10 µg/kg BaP sınırlaması getirmiştir (33).

Uluslararası Zeytinyağı Konseyi 2001 yılında prina yağlarında, B(a)P'nin en yüksek tolere edilebilir derişimini 2 µg/kg olarak belirtmiş, aynı miktar Birleşmiş Milletler Gıda Güvenlik Araştırmacıları ve İrlanda tarafından da kabul edilmiştir (19).

Bitkisel yağlardaki BaP miktarlarının belirlenmesi için analizlerde uygulanan temel işlem basamakları ekstraksiyon, saflaştırma ve analitik tespittir (3).

Bugün PAH'ların analizinde GC ve HPLC teknikleri kullanılmaktadır (3). Ters faz HPLC-FLD ile GC-MS, PAH'ların duyarlı olarak tespitinde en güçlü tekniklerdir (Moret ve Conte 1998). Kapiler kolonlu GC ile çok düşük miktarlardaki PAH'lar kolayca tespit edilebilmektedir. PAH'ların çoğu güçlü fluoresans özellik gösterir, bu nedenle spektrofotometrik dedektör ile kombine edilmiş HPLC, seçicilik ve duyarlılık için en iyisidir. HPLC tekniği, GC'nin analiz edemeyeceği yüksek molekül kütleli PAH'ların tespitini sağlamada çok daha başarılıdır (3, 34).

Moret ve ark. (1997), naturel sızma, rafine ve lampante zeytinyağından oluşan 51 örneğin PAH miktarını sıvı-sıvı dağılıma, katı faz ekstraksiyon ve HPLC-FLD yöntemi ile tespit etmiştir. BaP için yöntemin en düşük tespit edilebilir miktarı 0,015 ppb'dir. Elde edilen veriler naturel sızma zeytinyağlarındaki PAH miktarının 2,96 ppb ile 75,414 ppb arasında değiştiğini göstermiş, BaP miktarı ise 1,210 ppb seviyesine kadar bulunmuştur. Rafine ve naturel sızma zeytinyağı karışımından oluşan 5 yağ örneğinin analiz sonuçlarına göre, PAH'ların toplam miktarı naturel sızma zeytinyağlarının PAH miktarından daha düşük bulunmuştur. Hafif PAH miktarındaki azalmaya rafinasyon basamaklarının neden olduğu belirtilmiştir. Ağır PAH'ların miktarı ise bazen naturel sızma yağlardan daha yüksek tespit edilmiştir. Rafinasyon basamaklarında kullanılan çözücünün kontaminasyona neden olabileceği bildirilmiştir.

Camacho ve ark. (35), İspanya prina yağlarında renk açma prosesinin polisiklik aromatik hidrokarbonların eliminasyonuna etkisini araştıran bir çalışma yapmışlardır. Bu amaçla ağartma topraklı aktif karbon, adsorbent olarak kullanılmış ve ağartma toprağı kullanımı BaP miktarını düşürmüştür. Fakat bunun yeterli olmadığı, bu yüzden bu aşamada aktif karbon kullanımının gerekliliği belirtilmiştir. Pollard ve ark. (36) tarafından yapılan bir çalışmada ise, ham hindistan cevizi yağındaki BaP miktarlarındaki azalma incelenmiş, ağartma toprağıyla (%15,6'lık) 10,8 µg/kg'a, toz halindeki aktif karbonla (>%99,2'lik) 0,1 µg/kg'dan daha düşük konsantrasyonlara ulaşılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Araştırmada kullanılan sızma, riviera zeytinyağları ile prina yağları piyasadan temin edilmiştir. Çalışma, 20 adet sızma, 20 adet riviera zeytinyağı ile 10 adet rafine prina yağı üzerinde yapılmıştır.

Yöntem

Örneklerde BaP miktarlarının kalitatif ve kantitatif tespiti, Moret ve Conte (3)'ye göre yapılmıştır. Katı faz ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanan örnekler floresans dedektörlü HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Bu analizlerin yapılmasında kullanılan kimyasal malzemeler, çözeltiler ve cihazlar aşağıda verilmiştir.

Kimyasal malzemeler

n-Hekzan, kromatografik saflıkta (Merck no 104391, Cas no 110-54-3). Diklorometan, kromatografik saflıkta (Merck no 106044, Cas no 75-09-2). Aseton, kromatografik saflıkta (Merck no 100020, Cas no 67-64-1). Asetonitril, kromatografik saflıkta (Merck no 100029, Cas no 75-05-8). BaP stok standart çözeltisi, 10 ng/µL asetonitrilde (Dr.Ehrenstorfer GmbH, L20635000AL, Lot: 20812AL). Su, bidestile, Millipore ultra saf su cihazı (Elix 3 model, F1NN21161, Millipore) ile saflaştırılmış.

Çözeltiler

n-Hekzan / diklorometan çözeltisi (70/30, v/v)

Cihaz ve malzemeler

Kartuş, silika, 5 g'lık, (Varian, ME-SI, 5GM 20 mL, 20/PK, Lot 0135203, MFG code: 05404, Part 12256026). Vakum manifoldu (Supelco Visiprep DL, 571004, Visidry Drying Attachment, US Pat No 4,810,471). Azot, saflık derecesi yüksek (%99.99, BOS). Kullanılan cam malzemelerden kaynaklanan herhangi bir bulaşmanın olmaması için, tüm cam malzemeler asitle yıkandıktan sonra kullanılmıştır.

Standart çözeltiler

İlgili firmalardan satın alınan 10 µg/mL konsantrasyondaki stok standart BaP çözeltisinden 10 mL'lik balona 1 mL aktarılır. Balon aseton ile işaret çizgisine kadar tamamlanarak 1 µg/mL'lik BaP çözeltisi hazırlanır. Bu çözelti aseton ile seyreltilerek 100, 50, 10, 5, 2, 1,5 ve 1 ng/mL konsantrasyonlardaki BaP standart çözeltileri hazırlanır. Elde edilen bu standart çözeltiler aseton ile 0,5, 0,3, 0,25 ve 0,15 ng/mL'ye seyreltilir. Hazırlanan tüm çözeltiler karanlıkta ve +4 °C'da muhafaza edilir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı

Çalışmada kullanılan HPLC; gaz giderici, quaterney pompa, otosampler, DAD dedektör, floresans dedektör, ısıtıcı kolon bloğu ve handheld kontrol modülü ile donatılmış Hewlett Packard 1100 serisidir. Tüm sistem bilgisayar ortamı ile bağlantılıdır. Analizler Varian ChromSep HPLC kolon kullanılarak, 375 ve 430 dalga boyunda, floresans dedektörle gerçekleştirilmiştir. Moret *et al.* (2001) tarafından önerildiği şekilde asetonitril/su, hareketli faz olarak kullanılmıştır (34). Asetonitril 0,45 µm'lik filtreden, su 0,2 µm'lik selüloz asetat filtreden süzölmüştür. HPLC ile çalışma koşulları aşağıda verilmiştir.

Cihaz HPLC, Agilent 1100, kolon Varian ChromSpher 5 PAH, (250 x 4,6 mm), dedektör floresans, dalga boyu (UV) 375 ve 430 nm, kolon sıcaklığı 25°C, hareketli faz %90 asetonitril ve %10 bidestile su, akış hızı 1 mL/dakika, enjeksiyon hacmi 20 µL.

Benzo(a)pirenin belirlenmesi

BaP'in saptanmasında kullanılan yöntem üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalar, katı faz ekstraksiyonu, tayin ve hesaplama. Katı faz ekstraksiyonu: Yağdaki BaP'in belirlenebilmesi amacıyla Moret ve Conte (5) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Bu amaçla 5 g ± 0,00005 g yağ 10 mL'lik balona tartılmış, üzerine n-hekzan ilave edilerek balon işaret çizgisine kadar tamamlanmış ve homojen oluncaya kadar titreşimli karıştırıcıda karıştırılmıştır. Geri kazanım denemelerinde örnekler uygun miktarda BaP ilavesi bu

aşamada gerçekleştirilmiştir. Örneğe ilave edilen BaP miktarları ise 0,5 , 1 ve 2 µg/kg'dır. Yağı n-hekzanla çözdükten sonra, vakum manifolduna 5 g'lık silika kartuş yerleştirilerek şartlanması için 20 mL n-hekzan kartuştan geçirilmiş, akış hızı yaklaşık saniyede 1 damla olacak şekilde ayarlanmıştır. Sonra 20 mL diklorometan geçirilerek kartuşun şartlanması tamamlanmış ve şartlanan kartuşa 1 mL örnek konmuştur. Kartuşa 70 /30 (v/v) oranında n-hekzan / diklorometan çözeltisinden 6 mL ilave edilerek yine saniyede 1 damla geçirilmiştir. Bu aşamaya kadar biriken artıklar atılarak kartuşun altına yeni bir 15 mL'lik vial yerleştirilmiştir. BaP'i elue etmek için kartuşa 10 mL n-hekzan / diklorometan çözeltisi ilave edilmiştir. Bu çözeltinin tamamı yine aynı akış hızında alttaki vial toplandı, toplanan 10 mL'lik çözeltinin tamamı azot gazı altında uçurulmuştur. Bu içerik 1 mL asetonla çözülerek 2 mL'lik vial alınmış ve HPLC'de analiz edilmiştir.

Kromatografik tayin: Bu amaçla hazırlanan örnekten 20 µL alınarak HPLC cihazına enjekte edilmiştir.

Hesaplama: Yağ örneğindeki BaP miktarı, aşağıdaki eşitliklerden yararlanılarak hesaplanmış ve sonuç µg/kg olarak verilmiştir.

a) Deneysel çözeltisindeki BaP derişiminin hesaplanması

Pikler, BaP standardının alıkonma zamanı ile örnek piklerinin alıkonma zamanı karşılaştırılarak tanımlanmış, miktarlar ise kalibrasyon eğrisinden yararlanarak hesaplanmıştır. Örneğin pik alanı dikkate alınarak uygun kalibrasyon eğrisi denklemi kullanılmıştır. 0,15-2 ng/mL konsantrasyon için $y=6,3301x$ denklemi, 2-100 ng/mL konsantrasyon için ise $y= 5,2274x$ denkleminde yararlanılmıştır. Deneysel çözeltisindeki BaP konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$C_t = \frac{C_s \cdot A_t}{A_s}$$

- C_t : Deneysel çözeltisindeki BaP'in konsantrasyonu, ng/mL
 C_s : Standart çözeltinin konsantrasyonu, ng/ mL
 A_t : Deneysel çözeltisindeki BaP'in pik alanı
 A_s : Standart çözeltinin pik alanı

b) Yağdaki BaP miktarının hesaplanması

$$\text{Benzo(a)piren (ng/g)} = \frac{C_t \cdot V_t}{m}$$

Yağdaki BaP aşağıdaki eşitlikten hesaplanır.

- C_t : Deneysel çözeltisindeki BaP'in konsantrasyonu (ng/mL)
 V_t : Deneysel çözeltisinin hacmi, mL
 m : Deneysel çözeltisinin temsil ettiği örnek miktarı, g

Sızma, riviera zeytinyağları ve prina yağının grup ortalamaları arasındaki farklılıkların irdelenmesinde varyans analizi (one way ANOVA) tekniği, farklı yağ gruplarının tespitinde ise DUNCAN testi kullanılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

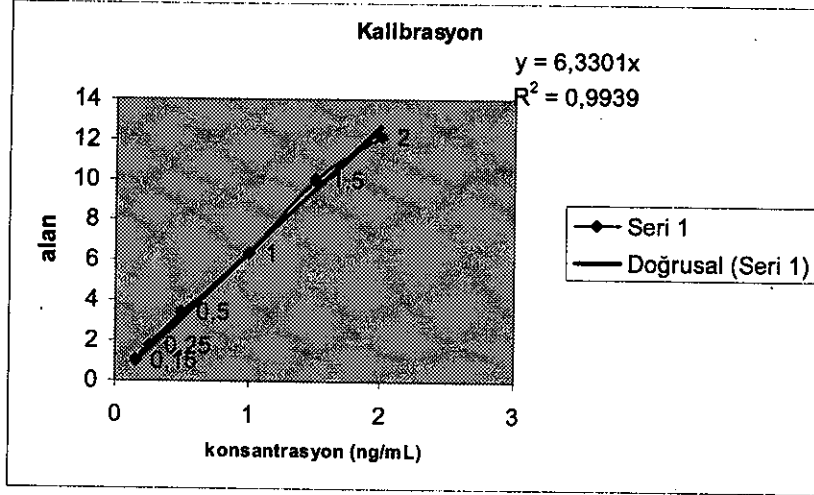
Kalibrasyon

BaP'in HPLC ile analizinde, kalibrasyon aralığı 0,15 -2 ng/mL ve 2 – 100 ng/mL olarak belirlenmiştir. Bu nedenle farklı konsantrasyonlara ait 2 kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

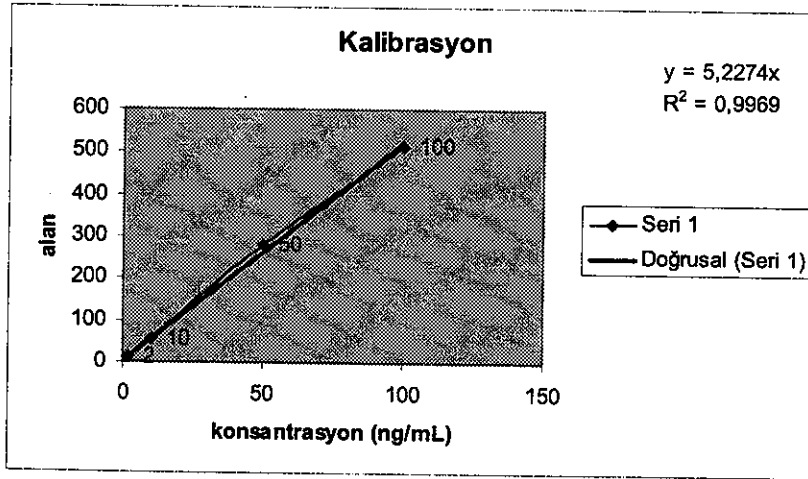
Birinci kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında 0,15, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 ng/mL konsantrasyonlarına eşdeğer BaP standart çözeltileri kullanılmış olup, regresyon katsayısı (R^2) 0,9939'dur. İkinci eğrinin hazırlanmasında ise 2,

10, 50 ve 100 ng/mL konsantrasyonlarına eşdeğer BaP standart çözeltileri kullanılmış olup, regresyon katsayısı (R^2) 0,9969'dur.

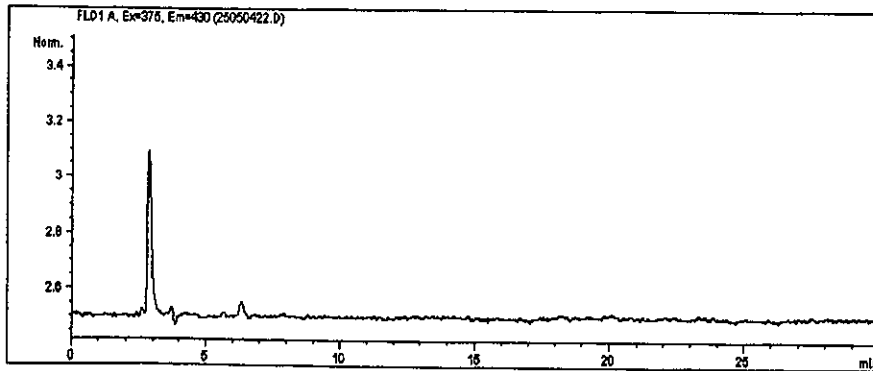
Standart kalibrasyon eğrilerinin hazırlanmasında konsantrasyona (ng/mL) karşılık pik alanları esas alınmıştır. Standart kalibrasyon eğrileri Şekil 3 ve Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 3. BaP standart kalibrasyon eğrisi (0,15-2 ng/mL)



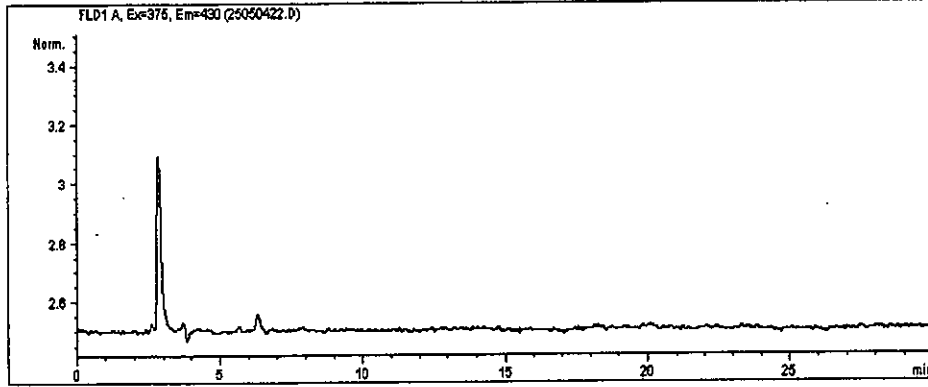
Şekil 4. BaP standart kalibrasyon eğrisi (2-100 ng/mL)



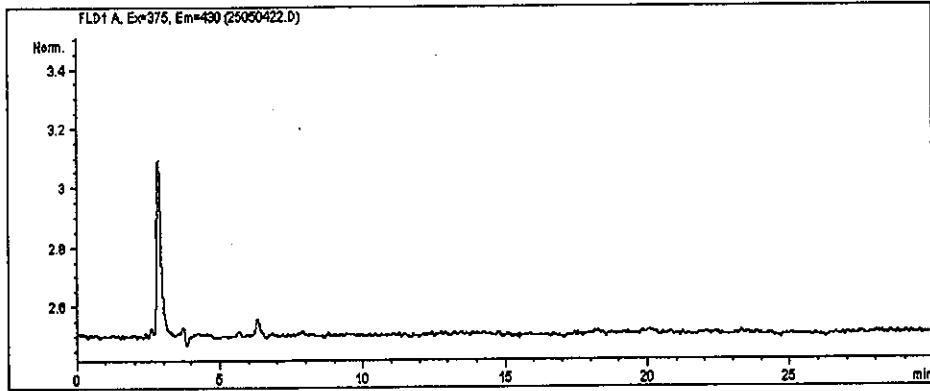
Şekil 5. Kullanılan kimyasalların kontrolü amacıyla elde edilen kromatogram

Geri Kazanım

BaP tespit yönteminin performans deneyleri, BaP geri kazanım oranlarının belirlenmesi yolu ile gerçekleştirilmiştir. Kimyasallardan kaynaklanan bir girişim olup olmadığı ise örnek kullanmaksızın hazırlanan deney çözeltisinin HPLC-FLD analizi ile belirlenmiştir. Şekil 5'te örneksiz gerçekleştirilen analiz sonucunda elde edilen kromatogram verilmiştir. Buna göre BaP analizinde kullanılan kimyasallardan kaynaklanan herhangi bir girişim olmadığı anlaşılmaktadır.



Şekil 6. BaP ilave edilmemiş yağ örneğinin kromatogramı



Şekil 7. BaP ilave edilmiş yağ örneğinin kromatogramı (0,5 µg/kg)

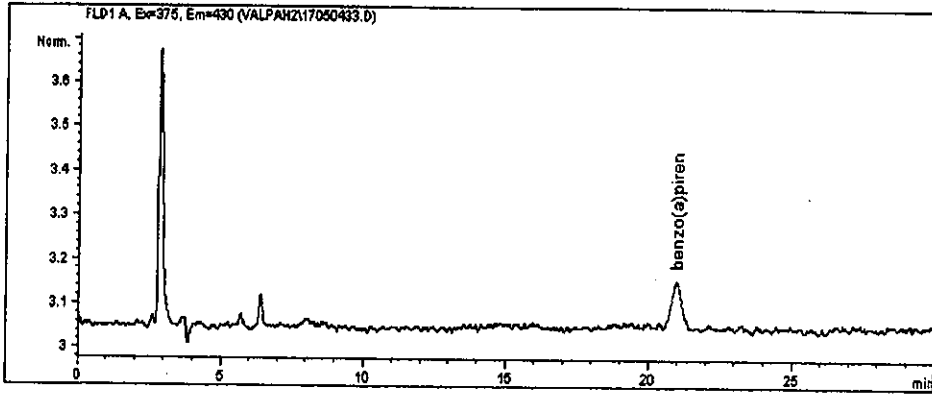
Yöntemin etkinliğini kanıtlamak için yapılan BaP geri kazanımlar 0,0, 0,5, 1 ve 2 µg/kg ilave düzeyleri için ayrı ayrı, 6 paralelli olarak belirlenmiştir. Geri kazanım analizlerinde BaP kontaminasyonu olmadığı bilinen yağ örneği kullanılmıştır.

Şekil 6'da herhangi bir ilave yapılmaksızın analiz edilen yağ örneğine ait kromatogram verilmiştir. Şekilden de görüleceği gibi BaP'nin alıkonma süresine karşılık gelen noktada girişim yaparak tespiti olumsuz etkileyebilecek herhangi bir pik gözlenmemiştir.

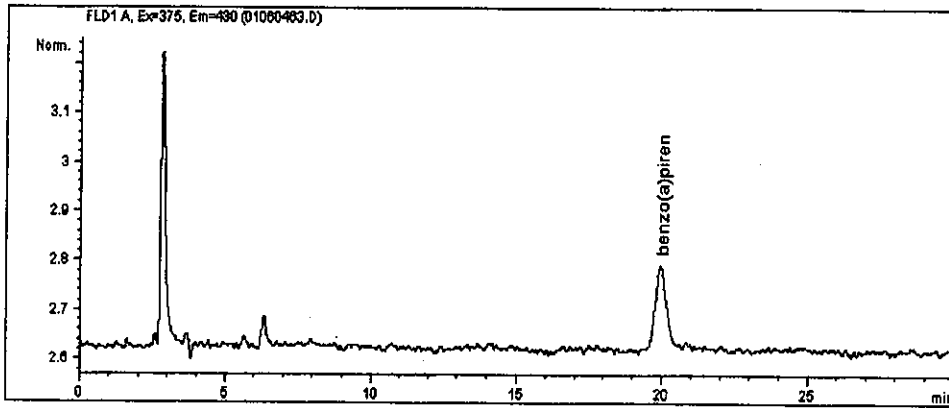
Şekil 7, 8 ve 9'da sırasıyla 0,5 µg/kg, 1 µg/kg ve 2 µg/kg düzeyinde BaP içerecek şekilde standart ilave edilmiş yağ örneklerinde geri kazanım denemeleri sonucunda elde edilen kromatogramlar verilmiştir.

Çizelge 1'de zeytinyağlarına uygulanan analiz yöntemi ile elde edilen BaP geri kazanım oranları verilmiştir. Ortalama geri kazanım oranı % 76,08 ± 1,49 olarak belirlenmiştir.

Kalıntı analiz yöntemlerinin performansı, farklı ilave düzeylerine karşılık elde edilen geri kazanım oranları ile ifade edilmektedir. Codex Alimentarius kalıntı analizlerinde ortalama geri kazanım oranının %70-120 aralığında olması gerektiğini bildirmiştir. (37, 38) Çizelge 1.'de görüldüğü gibi, bu çalışmada elde edilen analiz yöntemine ait geri kazanım değerleri, Codex Alimentarius Komisyonu değerleriyle uyumludur.



Şekil 8. BaP ilave edilmiş yağ örneğinin kromatogramı (1 µg/kg)



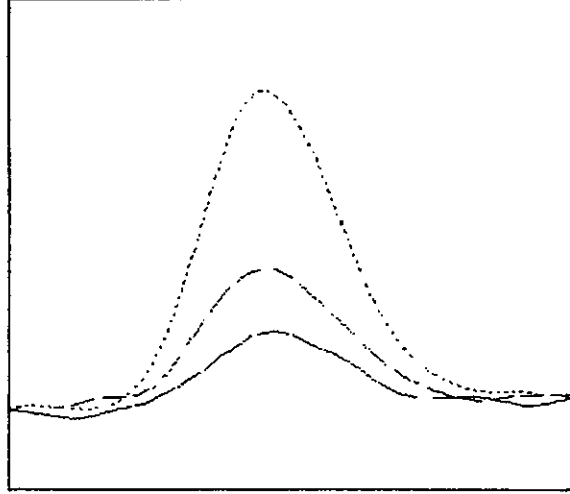
Şekil 9. BaP ilave edilmiş yağ örneğinin kromatogramı (2 µg/kg)

Çizelge 1. Zeytinyağında BaP geri kazanım oranları

İlave düzeyi, µg/kg	BaP geri kazanım oranı
0,5	77,72 ± 1,87
1,0	77,29 ± 1,64
2,0	73,25 ± 0,98
Ortalama	76,08 ± 1,49
n= 6	

Yöntemde BaP'e ait alıkonma sürelerinin tekrar edilebilirlik düzeyleri yüksek bulunmuştur (Şekil 10). Farklı konsantrasyonlardaki 3 standart çözeltiye (0,5 ng/mL, 1 ng/mL ve 2 ng/mL) ait alıkonma sürelerinin ortalamadan sapma oranları (varyasyon katsayısı) % 0,039 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, alıkonma sürelerindeki sapmanın ihmal edilebilir düzeyde olduğunu göstermektedir. Şekil 4.8.'de alıkonma sürelerinin tekrarlanabilirliğinin yanında, konsantrasyon-FLD sinyali arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu da açık bir şekilde görülmektedir.

Yağlardaki BaP'in HPLC-FLD ile analizinde duyarlılık düzeyi yüksek bulunmuştur. Zeytinyağında bulunan 0,3 µg/kg düzeyindeki BaP kalıntısı, HPLC-FLD analizi ile net bir şekilde saptanabilmektedir. Tespit edilebilir en düşük BaP miktarı 0,3 µg/kg olarak belirlenmiştir. Zeytinyağı örneklerine ait kromatogramlarda girişim yaparak BaP pikinin tanımlanmasını engelleyen herhangi bir madde piki görülmemiştir.



Şekil 10. BaP standardının 3 farklı konsantrasyondaki (0,5 ppb, 1 ppb ve 2 ppb) kromatogramları.

Yöntemde silika kartuş ile katı faz ekstraksiyonu, tek örnek hazırlama basamağı olarak uygulanmış ve elde edilen veriler saflaştırma düzeyinin uygun olduğunu göstermiştir. Bu durum, BaP analizinin daha kısa zamanda ve daha az kimyasal madde kullanılarak yapılabileceğini göstermiştir.

Benzo(a)piren Analiz Sonuçları

Araştırmada piyasadan temin edilen 20 adet naturel sızma zeytinyağı, 20 adet riviera zeytinyağı ve 10 adet rafine prina yağında (toplam 50 adet örnekte) BaP miktarları kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir. Analizi yapılan örneklerin BaP miktarları Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Naturel sızma, riviera ve prina yağlarında BaP miktarları, µg/kg

	Naturel sızma zeytinyağı	Riviera zeytinyağı	Prina yağı
1	0,870	0,809	0,460
2	te	0,461	te
3	te	0,340	te
4	te	te	58,241
5	te	0,380	48,730
6	te	0,394	15,698
7	0,330	2,465	34,664
8	te	0,383	37,300
9	te	0,324	25,214
10	te	te	te
11	te	te	
12	te	te	
13	te	te	
14	0,417	1,691	
15	te	0,485	
16	te	te	
17	te	0,418	
18	te	0,696	
19	te	te	
20	te	te	

te: Tespit edilemedi (< 0,300 µg/kg)

Çizelge 2'nin incelenmesinden anlaşılacağı gibi, analiz edilen 20 adet naturel sızma zeytinyağı örneğinden 3 tanesinde BaP tespit edilmiştir. Diğer örneklerde tespit edilebilir düzeyde BaP kalıntısına rastlanmamıştır. BaP saptanan örneklerin ortalama miktarı $0,539 \pm 0,167 \mu\text{g/kg}$ (en az: $0,330 \mu\text{g/kg}$, en çok: $0,870 \mu\text{g/kg}$)'dir.

Analiz edilen 20 riviera zeytinyağı örneği için analiz sonuçları incelendiğinde, 8 örnekte tespit edilebilir düzeyde BaP kalıntısına rastlanmazken, 12 örnekte $2,465 \mu\text{g/kg}$ seviyesine kadar BaP bulunmuştur. BaP tespit edilen örneklerde ortalama miktar $0,737 \pm 0,192 \mu\text{g/kg}$ (en az: $0,324 \mu\text{g/kg}$, en çok: $2,465 \mu\text{g/kg}$)'dir.

Prina yağlarının analizinden elde edilen değerlere bakıldığında, hemen hemen tüm örneklerde yüksek miktarlarda BaP kalıntısına rastlanmıştır. BaP tespit edilen 7 örneğin sonuçlarına göre ortalama miktar $31,47 \pm 7,41 \mu\text{g/kg}$ (en az: $0,460 \mu\text{g/kg}$, en çok: $58,241 \mu\text{g/kg}$) olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen analiz sonuçlarına göre, naturel sızma zeytinyağı, riviera zeytinyağı ve prina yağı gruplarının ortalamaları arasındaki farklılıkların irdelenmesinde varyans analizi (one way ANOVA) tekniği kullanılmıştır. Yapılan hesaplamalar sonunda, yağ örneklerinin ortalamaları arasındaki farkların önemli olduğu saptanmıştır ($p < 0,01$). Farklı yağ gruplarının tespitinde ise DUNCAN testi kullanılmıştır. DUNCAN testine ilişkin hesaplamalar sonunda sadece prina yağı ortalaması ile diğer yağ örneklerinin ortalamaları arasındaki farkların istatistik olarak önemli olduğu saptanmıştır ($p < 0,01$). Çizelge 3'te yağ örneklerinin DUNCAN test sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 3. Yağ örneklerinin BaP miktarları, $\mu\text{g/kg}$

	n	$X \pm S_x$
Sızma zeytinyağı	3	$0,539 \pm 0,167$ b
Riviera zeytinyağı	12	$0,737 \pm 0,192$ b
Prina yağı	7	$31,472 \pm 7,41$ a

DUNCAN test sonuçlarına göre, aynı sütündeki farklı harfler, örneklerin istatistik olarak birbirinden farklı olduklarını göstermektedir ($p < 0,01$).

DUNCAN test sonuçlarına göre, aynı sütündeki farklı harfler, örneklerin istatistik olarak birbirinden farklı olduklarını göstermektedir ($p < 0,01$).

Analiz sonuçlarına göre, hiçbir naturel sızma zeytinyağı örneği Avrupa Yenebilir Yağ Üreticileri Ticari Birliği tarafından kabul edilen 1 ppb BaP seviyesini aşmamıştır.

Moret ve ark. (10), yapmış olduğu analizler sonucunda 51 naturel sızma zeytinyağı örneğinden sadece 1'inde $1,210$ ppb seviyesinde BaP tespit etmişlerdir (10). Diğer 50 örneğin hemen hemen hepsinde $0,3$ ppb'nin altında BaP bulunduğunu bildirmişlerdir. Troche ve ark. (12) naturel sızma zeytinyağlarında $0,79 \mu\text{g/kg}$ ve $0,34 \mu\text{g/kg}$, riviera zeytinyağlarında $1,16 \mu\text{g/kg}$, $0,48 \mu\text{g/kg}$, $0,70 \mu\text{g/kg}$ ve $<0,32 \mu\text{g/kg}$ düzeylerinde BaP bulunduğunu bildirmişlerdir.

Riviera zeytinyağı sonuçları incelendiğinde, 2 örnekte 1 ppb'nin üstünde BaP tespit edilmiş, genelde BaP miktarı $0,3 \mu\text{g/kg}$ ile $0,5 \mu\text{g/kg}$ seviyeleri arasında bulunmuştur. Naturel sızma zeytinyağı ve riviera zeytinyağı örneklerinin ortalama BaP miktarı 1 ppb'nin altındadır.

Bir çalışmada analiz edilen 5 adet riviera zeytinyağında ise $0,460$ – $1,335$ ppb arasında BaP tespit edilmiştir. Riviera zeytinyağlarının BaP miktarı, naturel sızma zeytinyağlarından daha fazla bulunmuştur. Bu duruma, rafinasyon basamaklarında kullanılan çözücünün kontamine olmasının neden olabileceği bildirilmiştir (10). Analiz edilen prina yağı örneklerinde 2 ppb seviyesinin çok üzerinde (ortalama $31,47 \mu\text{g/kg}$) BaP tespit edilmiştir. Uluslararası Zeytinyağı Konseyi, prina yağlarında en çok bulunabilecek BaP miktarını $2 \mu\text{g/kg}$ olarak belirtmiştir (19).

Prina yağlarındaki BaP miktarlarının daha yüksek olması, üretim sırasındaki birkaç faktörden kaynaklanmış olabilir. Prinanın kurutulması aşamasında ve çözücü uçurulması sırasında yüksek sıcaklık uygulanması veya

prinadan yağın ekstraksiyonu sırasında önceden kontamine olmuş çözücünün kullanılması muhtemel nedenlerden sayılabilir. Özellikle prinaya uygulanan kurutma işleminin BaP kontaminasyonuna neden olduğu bildirilmektedir (16).

Prina yağlarında bulunan BaP seviyesinin naturel sızma ve riviera zeytinyağlarından yüksek olması beklenen bir durumdur. Fakat elde edilen seviyeler çok yüksek düzeydedir. Ağartma toprağı kullanımının BaP miktarını gerekli limitlere düşürmek için yeterli olmadığı gözlenmiştir. Bu yüzden yağlardaki PAH'ların başlangıç miktarı da dikkate alınarak renk açma aşamasında mutlaka aktif karbon kullanılmalıdır.

Modern sürekli sistemlerden elde edilen prina, klasik sistemlerden gelen prinaya oranla daha çok nem ve daha az yağ içerdiğinden dolayı, prina kekini kurutmak amacıyla uygulanan sıcaklık daha yüksektir. Bu durum daha fazla PAH kontaminasyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle, prina yağlarındaki PAH kontaminasyonunu önlemenin yolu, kurutma sıcaklığının düşürülmesi ve zeytin kalıntısına uygulanan ısıtma işlemi sırasındaki yakıt dumanının önlenmesidir (16, 17, 18).

Bu çalışma sonucunda, 3 naturel sızma zeytinyağı ve 12 riviera zeytinyağında BaP bulunmuştur. Geleneksel veya modern yöntemlerde soğuk pres kullanarak zeytinyağı elde edilmesinin PAH oluşumuna neden olmadığı ifade edilmiştir (17, 32). Halbuki araştırılan yağlardan riviera zeytinyağlarında daha fazla sayıda örnekte BaP'e rastlanmıştır. Bu durum, pahalı zeytinyağını seyreltmek amacıyla, rafine prina yağı veya kontamine rafine zeytinyağının kullanılmasından kaynaklanmış olabilir.

Speer ve ark. (29) çeşitli bitkisel yağların PAH miktarlarını araştırmış, zeytinyağı örneklerinin ağır PAH bakımından diğer bitkisel yağlarla benzer kontaminasyonlar göstermesine rağmen, hafif PAH miktarlarının daha fazla olduğunu tespit etmiş ve bu sonucu naturel zeytinyağlarına PAH miktarını azaltan rafinasyon işleminin uygulanmaması ile açıklamıştır. Aynı araştırmacılar 7 adet riviera zeytinyağı örneğinde ortalama 0,7 µg/kg (0,2-1,2) BaP bulmuşlardır. Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular, Speer ve ark.(29)'ın bulguları ile (riviera zeytinyağı sonuçlarımız) paralellik göstermektedir.

Pupin ve Toledo (11), Brezilya marketlerinden aldıkları zeytinyağı örneklerinde çok yüksek miktarlarda BaP tespit etmiştir. Avrupa'dan paketli ithal edilen 7 zeytinyağında ortalama 0,6 ppb, Avrupa'dan ithal edilip Brezilya'da paketlenen örneklerde 0,9 ppb ile 9,7 ppb arasında BaP bulmuşlardır. Arjantin'den ithal edilen örneklerde ise 164,4 ppb gibi çok yüksek rakamlara kadar BaP bildirmişlerdir. Bizim bulduğumuz BaP sonuçları Avrupa'dan paketli ithal edilen yağ örneklerinin sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Fakat Arjantin'den ithal edilen yağ örnekleri kadar yüksek kontaminasyon olmadığı sonuçlardan anlaşılmaktadır.

Barranco ve ark. (31), 15 zeytinyağı ve 14 prina yağında yapmış olduğu PAH analiz sonuçlarına göre, zeytinyağında 0,5 ppb, prina yağında 67 ppb ve 2,6 ppb BaP tespit etmiştir (31). İspanyada prina yağları için en çok 2 ppb BaP sınırı getirilmiştir. Sınır belirlenmeden önce analiz yapılan prina yağlarında 67 ppb BaP tespit edilirken, limit getirildikten sonra marketten alınarak analiz edilen prina yağlarında 2,6 ppb BaP'e rastlanmıştır. Böylece yasal bir limit belirlemenin PAH miktarını en aza indirmek için faydalı olduğu görülmüştür.

PAH'larla ilgili en önemli konulardan birisi, gıdalarda bulunmasına izin verilebilecek en yüksek miktarının belirsizliğidir. BaP gibi diğer PAH'lar için de yasal bir limit getirilmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

SONUÇ

Sızma ve riviera zeytinyağları ile rafine prina yağlarındaki BaP miktarlarının kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, 20 adet sızma, 20 adet riviera zeytinyağı ve 10 adet prina yağı analiz edilmiştir.

Analiz edilen naturel sızma zeytinyağı örneklerinden 3 tanesinde BaP tespit edilmiştir. BaP saptanan örneklerde ortalama miktar $0,539 \pm 0,167$ µg/kg (en az: 0,330 µg/kg, en çok: 0,870 µg/kg) bulunmuştur.

Riviera zeytinyağlarında 8 örnekte tespit edilebilir düzeyde BaP kalıntısına rastlanmazken, 12 örnekte 2,465 µg/kg seviyesine kadar BaP bulunmuştur. BaP tespit edilen örneklerde, ortalama miktar $0,737 \pm 0,192$ µg/kg (en az: 0,324 µg/kg, en çok: 2,465 µg/kg)'dir.

BaP tespit edilen 7 prina yağı örneği sonuçlarına göre ortalama BaP miktarı $31,47 \pm 7,41 \mu\text{g/kg}$ (en az: 0,460 $\mu\text{g/kg}$, en çok: 58,24 $\mu\text{g/kg}$) bulunmuştur.

Prina yağı örneklerindeki BaP miktarının daha fazla olması, prinanın kurutulması aşamasında ve çözücü uçurulması sırasında yüksek sıcaklık uygulanması veya prinadan yağın ekstraksiyonu sırasında önceden kontamine olmuş çözücünün kullanılması olabilir. Özellikle prinaya uygulanan kurutma işleminin BaP kontaminasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Riviera zeytinyağı örneklerindeki ortalama BaP miktarı, naturel sızma zeytinyağı örneklerinden biraz daha fazla tespit edilmiştir. Bunun sebebi, ucuz olan prina yağı ile pahalı zeytinyağını seyreltmek veya kontamine rafine zeytinyağının kullanılması olabilir.

Naturel sızma, riviera zeytinyağı ve prina yağı örneklerinin ortalamaları arasındaki farklılıkların irdelenmesinde varyans analizi (one way ANOVA) tekniği kullanılmıştır. Yapılan hesaplamalar sonunda yağ örneklerinin ortalamaları arasındaki farkların önemli olduğu saptanmıştır ($p < 0,01$). Farklı yağ gruplarının tespitinde ise DUNCAN testi kullanılmıştır. DUNCAN testi sonunda sadece prina yağı ortalaması ile diğer yağ örneklerinin ortalamaları arasındaki farkın istatistik olarak önemli olduğu saptanmıştır ($p < 0,01$). Yöntemin ortalama geri kazanım oranı % $76,08 \pm 1,49$, en düşük tespit limiti 0,3 $\mu\text{g/kg}$ 'dir. Uygulanan bu yöntemin rutin analizler için uygulanabileceği anlaşılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Tuominen J. 1990. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by gas chromatography/mass spectrometry and method development in supercritical fluid chromatography. Technical Research Centre of Finland, Publications 60 Espoo, Finland
2. Williams PT. 1990. Sampling and analysis of polycyclic aromatic compounds from Combustion systems. Journal of The Institute of Energy, 63; 22
3. Moret S, Conte L. S. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. Journal of Chromatography A, 882; 245-253
4. Kaya S., Piriñçi, İ., Bilgili A. 1998. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Medisan Yayın Serisi:35, 1. Baskı, 452 s, Ankara.
5. Moret, S, Conte L. S. 2002. A rapid method for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in vegetable oils. Journal of Separation Science, 25; 96-100.
6. Anonim. 2003b. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Çevre Sağlığı Araştırma Müdürlüğü Hava Kirliliğine Genel Bakış. 47-60 s.
7. Anonim. 1983. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemical to humans, polynuclear aromatic compounds. Part 1, France.
8. Dıraman E. 1994. Aspirin ve antioksidantların (butylated hydroxyanisole ve askorbik asit) farelerde (mus musculus) benzo(a)pyrene hidroksilaz aktivitesi üzerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Samsun.
9. Shuguang L, Dinhuia, P, Guoxiong, W. 1994. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cooking oil fumes. Archives of Environmental Health, 49(2); 119-122.
10. Moret S, Piani B, Bortolomeazzi R, Conte L S. 1997. HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oils. Z. Lebensm Unters Forsch A, 205; 116-120.
11. Pupin, A. M., Toledo, M. C. F. 1996. Benzo(a)pyrene in olive oils on the Brazilian market. Food Chemistry, 55(2); 185-188.
12. Troche, V. S, Falcon, G. M. S, Amigo, G. S, Yusty, L. M. A, Lozano, S. J. 2000. Enrichment of benzo(a)pyrene in vegetable oils and determination by HPLC-FL. Talanta, 51; 1069-1076
13. Gfrerer, M, Lankmayr, E. 2003. Microwave-assisted saponification for the determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from pumpkin seed oils. Journal of Separation Science, 26; 1230-1236.
14. Stijn, F. V, Kerkhoff, M. A. T, Vandeginste, B. G. M 1996. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and fats by on-line donor-acceptor complex chromatography and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Journal Chromatography A, 750; 263-273.
15. Moreda, W, Perez-Camino, M. C, Cert, A. 2001. Gas and liquid chromatography of hydrocarbons in edible vegetable oils. Journal of Chromatography A, 936; 159-171.
16. Anonim. 2001a. Contaminants- Polycyclic aromatic hydrocarbons in olive residue oil.

17. Anonim.2002a. European Commission. Directorate F- Food and Veterinary Office.Final report of a mission carried out in France from 21st to 30th october 2002 in order to assess the control measures in place for vegetable oil production and in particular for the assessment of controls on PAH (polycyclic aromatic hydrocarbons) contamination of such oils.
18. Anonim. 2003a. Prininin bir yakıt olarak kullanımı ve eldesi. Gazi Üniv.
19. Bogusz, M. J, Hajj, S. A. E, Ehaideb, Z., Hassan, H, Al-Tufail, M. 2004. Rapid determination of benzo(a)pyrene in olive oils samples with solid-phase extraction and low-pressure, wide-bore gas chromatography-mass spectrometry and fast liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1026; 1-7.
20. Larsson, B. K, Erikson, A. T, Cervenka, M. 1987. Polycyclic aromatic hydrocarbons in crude and deodorized vegetable oils. *JAOCS*, 64(3);365-370.
21. Moret, S, Dudine, A., Conte, L. S. 2000. Processing effects on the polyaromatic hydrocarbon content of grapeseed oil. *JAOCS*, 77(12); 1289-1292.
22. Cert, A., Moreda, W., Perez-Camino, M. C. 2000. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 881; 131-148.
23. Perrin, J. L, Poirot, N, Liska, P., Thienpont, A., Felix, G. 1993. Trace enrichment and HPLC analysis of PAHs in edible oils and fat products, using liquid chromatography on electron acceptor stationary phases in connection with reverse phase and fluorescence detection. *Fat Sci Technol.*, 95; 46-51.
24. Anonim 2003c. Removal of PAH from vegetable oil.
25. Anonim 2003d. Polynuclear aromatic hydrocarbons removal.
26. Bogan, B. W., Trbovic, V., Paterek, J. R. 2003. Inclusion of vegetable oils in Fenton's chemistry for remediation of PAH-contaminated soils. *Chemosphere*, 50; 15-21.
27. Osborne, M. R., Crosby, N. T. 1987. *Benzopyrenes*. Cambridge University Press,128-129, UK.
28. Anonim 2004a. Outline of the amendment of the cabinet ordinance and the ministerial ordinance for the law for the control of house hold products containing harmful substances.
29. Speer, K., Steeg, E., Horstmann, P., Kühn, T., Montag,A.1990.Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oysters and bream from the River Elbe. *Journal of High Resolution Chromatography*, Vol 13 (February);104-111.
30. Björseth, A., Becher, G. 1986. PAH in work atmospheres: occurrence and determination. Boca Raton, Fl: CRC Pres; 103-116
31. Barranco, A. Alonso-Salces, R. M., Bakkali, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., Vicente, F., Sarobe, M. 2003a. Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. *Journal of Chromatography A*, 988; 33-40.
32. Anonim 2002b. Polyaromatic hydrocarbons (PAH) in evening primrose oil.
33. Anonim 2002d. Türk gıda kodeksi gıda maddelerinde belirli bulaşanların maksimum seviyelerinin belirlenmesi hakkında tebliğ (tebliğ no: 2002/63). Resmi gazete: 23 Eylül 2002 tarihli ve 24885 sayılı tebliğ.
34. Moret, S., Cerizzo, V., Conte, L. S. 2001. On-line solvent evaporator for coupled normal phase-reversed phase high-performance liquid chromatography systems: Heavy polycyclic aromatic hydrocarbons analysis. *J. Microcolumn Separations*, 13(1); 13-18.
35. Camacho, M. L., Alcaide, I. V., Mendez, M. V. R. 2003. Elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons by bleaching of olive pomace oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 105; 9-16.
36. Pollard, S.J.T., Sollars, C.J., Perry, R. 1993. The reuse of spent bleaching earth: a feasibility study in waste minimisation for the edible oil industry. *Bioresource technology*, 45; 53-58.
37. Anonim 1993. Guidelines on good laboratory practice in pesticide residue analysis. Food and Agricultural Organization of United Nations. World Health Organization, Rome.
38. Anonim 2004c.Food Standarts Agency.Update on EU discussions on chemical contaminants. Annex II. Sample preparation and criteria for methods of analysis used in official checking of the levels of benzo(a)pyrene in foods.