

**XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 16 HYDROCARBON THƠM ĐA VÒNG
TRONG THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT BẰNG SẮC KÝ
KHÍ KHỐI PHỔ 2 LẦN (GC-MS/MS)**

Đến tòa soạn 06 - 07 - 2016

Trần Cao Sơn, Lê Thị Hồng Hảo

Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia

Nguyễn Thị Tâm

Trường Đại học khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Lê Đình Chi

Trường Đại học Dược Hà Nội

SUMMARY

**SIMULTANEOUS DETERMINATION OF 16 POLYAROMATIC
HYDROCARBONS IN MEAT AND MEAT PRODUCTS BY GAS
CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY**

An analytical method using QuEChERS sample preparation and GC-MS/MS determination was developed for the determination of PAHs in meat and meat products. The method was in-house validated in term of specificity, linearity, repeatability, recovery, LOD and LOQ, and was proved as suitable and reliable for the intended application. The method was used for detecting PAHs in 6 meat samples and 24 meat-based food samples (8 fried meat samples, 8 grilled meat skewer samples and 8 smoked meat samples). Analytical results showed that 22/24 samples of meat-based food contained PAHs, 8/24 samples having the total residual amount of PAHs higher than the maximum limit tolerated by EC (35 $\mu\text{g/kg}$), 4/24 samples containing benzo(a)pyren at levels lower than the maximum limit tolerated by EC (5 $\mu\text{g/kg}$).

Keywords: PAHs, GC-MS/MS, QuEChERS, meat

1. MỞ ĐẦU

Các hydrocacbon thơm đa vòng (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – PAH) là một nhóm hợp chất gây ô nhiễm nguy hiểm do chúng có độc tính cao và tồn dư lâu trong môi trường (đất, không khí, các nguồn nước, các lớp trầm tích và đặc biệt tích lũy trong thực phẩm). Các hợp chất nhóm này ít tan trong nước, dễ tan trong các chất béo, dung môi hữu cơ hay acid hữu cơ, dễ đi vào cơ thể thông qua chuỗi thức ăn. Trong số các PAH, người ta đặc biệt chú ý đến benzo(a)pyren vì độc tính của chất này. Ở những

liều lượng nhất định PAH thường gây ra những tác động không tốt đến sự sinh sản, sinh trưởng, phát triển và khả năng miễn dịch. Sau một thời gian dài tích tụ trong cơ thể, PAH sẽ gây ảnh hưởng trực hoặc gián tiếp đến sức khỏe con người thông qua một số con đường khác nhau. Với con người, PAH có thể là tác nhân gây đột biến dẫn đến ung thư, gây đột biến gen [4].

Với đối tượng thực phẩm, việc chế biến có sử dụng nhiệt như rán, nướng... hoặc bảo quản bằng xông khói thường làm cho thực phẩm bị nhiễm PAH [4]. Một số nghiên cứu trên thế giới đã tiến hành xác định PAH trong các sản phẩm chứa nhiều chất béo như cá hồi, thịt... [3][5]. Tại Việt Nam, cho tới nay chưa có nghiên cứu nào được thực hiện về tình trạng có mặt của PAH trong thực phẩm, nhất là thực phẩm chế biến sẵn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng một phương pháp để xác định đồng thời các PAH trong thịt và thực phẩm chế biến sẵn từ thịt, sử dụng kỹ thuật sắc ký khí khối phổ hai lần (GC-MS/MS) nhằm đưa ra một quy trình phân tích phù hợp cho việc góp phần giám sát, đánh giá mức độ nhiễm PAH trong một số loại thịt và thực phẩm chế biến sẵn từ thịt lưu hành trên thị trường nước ta.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị và dụng cụ

Thiết bị phân tích chính là hệ thống GC-MS/MS gồm máy GC 7890A và khối phổ MS7000B (ba tứ cực) của Agilent. Cột sắc ký DB5MS (30m x 0,25mm; 0,25 μ m) được sử dụng để tách các PAH. Ngoài ra, một số thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thí nghiệm gồm cân phân tích, máy ly tâm, bộ thổi khô bằng N₂, máy lắc xoáy, micropipet, dụng cụ thủy tinh đã được sử dụng trong nghiên cứu.

2.2. Hóa chất và chất chuẩn

Hỗn hợp chất chuẩn gồm 16 PAH trong cyclohexan của hãng Sigma Aldrich, có nồng độ của từng PAH khoảng 10 μ g/mL đã được sử dụng (bảng 1). Các dung môi gồm acetonitril, n-hexan và các muối magnesi sulfat khan, natri clorid thuộc loại tinh khiết phân tích của Merck (Đức). Các chất hấp phụ Primary secondary amin (PSA), octadecylsilan (C18) được cung cấp bởi Aligent (Mỹ).

2.3. Đối tượng nghiên cứu

Để xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích các PAH trong thịt và sản phẩm thịt, chúng tôi tiến hành nghiên cứu trên các đối tượng sau: thịt lợn tươi, thịt quay, thịt xiên, và thịt xông khói lưu hành trên các địa bàn Hà Nội, Thái Bình.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát các điều kiện tối ưu để phân tích các PAH bằng GC-MS/MS

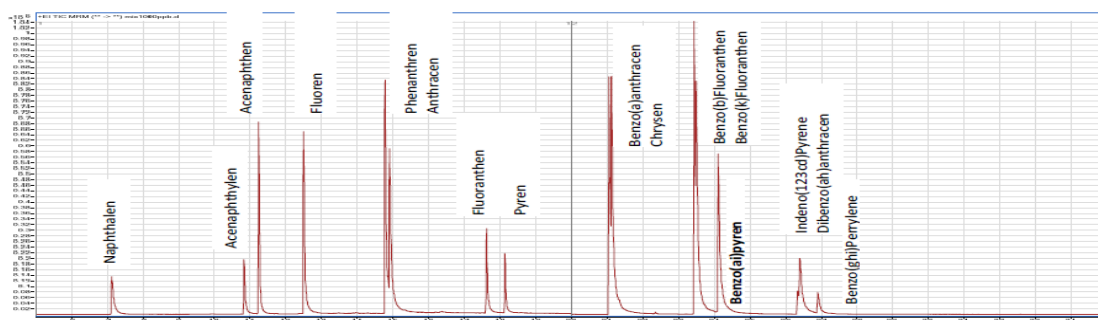
Để tìm được điều kiện GC-MS/MS tối ưu cho việc phân tích các PAH trong các mẫu thực phẩm, chúng tôi đã khảo sát tối ưu hóa các điều kiện sắc ký khí cũng như các điều kiện phân tích MS/MS cho từng PAH. Các điều kiện phân tích được sử dụng chính thức để phát hiện các PAH trong các mẫu thực phẩm cụ thể như sau:

❖ *Điều kiện sắc ký khí*: Chương trình nhiệt độ: 70°C (giữ trong 1 phút), tăng 10°C/phút lên 310°C (giữ trong 5 phút). Tổng thời gian phân tích là 30 phút. Nhiệt độ buồng bơm mẫu: 310°C. Chế độ tiêm mẫu không chia dòng, thời gian không chia dòng: 1 phút. Khí mang heli, tốc độ dòng 1,0 mL/phút. Nhiệt độ bộ phận kết nối sắc ký khí và khối phổ: 310°C. Thể tích tiêm mẫu 1 µL

❖ *Điều kiện MS/MS*: Nguồn ion hoá: EI 70 eV, nhiệt độ nguồn Ion: 250°C. Thời gian cắt dung môi: 5 phút. Chế độ phân tích đa phản ứng (MRM) với các giá trị ion mẹ, ion con và năng lượng va chạm được lựa chọn và tối ưu đối với từng PAH như trong bảng 1. Mỗi chất PAH được lựa chọn 2 ion con, một ion con có cường độ cao hơn được sử dụng để định lượng, ion còn lại được sử dụng để khẳng định.

Bảng 1. Thời gian lưu và điều kiện MS/MS để phân tích PAH

TT	Hợp chất PAH	Thời gian lưu (phút)	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	Năng lượng bắn phá (eV)	Ghi chú
1	Naphthalen	7,2	128	127	15	Định lượng
				102	20	Xác nhận
2	Acenaphthylen	10,9	154	153	15	Định lượng
				152	20	Xác định
3	Acenaphthen	11,3	152	151	15	Định lượng
				150	20	Xác định
4	Flouren	12,5	166	165	15	Định lượng
				164	20	Xác định
5	Phenanthren	14,8	178	176	15	Định lượng
				152	20	Xác định
6	Anthracen	14,8	178	176	15	Định lượng
				152	20	Xác định
7	Flouranthen	17,7	202	200	15	Định lượng
				152	20	Xác định
8	Pyren	18,2	202	200	15	Định lượng
				152	20	Xác định
9	Benzo(a)anthracen	21,2	228	226	30	Định lượng
				202	35	Xác định
10	Chrysen	21,2	228	226	30	Định lượng
				202	35	Xác định
11	Benzo(b)flouranthen	23,6	252	250	25	Định lượng
				226	30	Xác định
12	Benzo(k)flouranthen	23,6	252	250	25	Định lượng
				226	30	Xác định
13	Benzo(a)pyren	24,3	252	250	25	Định lượng
				226	30	Xác định
14	Indeno(1,2,3-c,d)pyren	26,5	276	274	30	Định lượng
				250	40	Xác định
15	Benzo(g,h,i)perylene	26,5	276	274	30	Định lượng
				250	40	Xác định
16	Dibenz(a,h)anthracen	27,0	278	276	30	Định lượng
				252	40	Xác định



Hình 1. Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn 16 PAH tại nồng độ 1000 ng/mL

3.2. Khảo sát điều kiện chiết các PAH từ mẫu thực phẩm

Để thu được quy trình xử lý mẫu cho phép chiết được hết các PAH từ mẫu thực phẩm, chúng tôi đã dựa trên nguyên tắc của kỹ thuật QuEChERS [3] tiến hành khảo sát lựa chọn dung môi chiết và các điều kiện khác của quá trình chiết: thể tích dung môi sử dụng, loại chất hấp phụ.

Từ kết quả tối ưu hóa thu được, chúng tôi lựa chọn quy trình chiết các PAH từ thực phẩm như sau: Mẫu được đồng nhất và cân khoảng 5 g vào ống ly tâm 50 mL, thêm khoảng 5 mL nước, 10 mL acetonitrile sau đó đồng nhất bằng máy đồng nhất trong 1 phút. Thêm 4 g MgSO_4 và 1 g NaCl vào ống ly tâm và lắc kỹ trong 1 phút bằng máy lắc xoáy. Ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 6 mL dịch lớp trên vào ống ly tâm 15 mL có chứa 0,9 g MgSO_4 ; 0,3 g PSA; 0,3 g C18. Lắc xoáy 1 phút, ly tâm 6000 vòng/phút trong 3 phút. Hút 4,0 mL dịch sau ly tâm vào ống nghiệm, cô cạn bằng khí N_2 . Hòa cạn bằng 0,4 mL n-hexan, lọc qua màng lọc 0,45 μm và tiêm vào GC-MS/MS.

3.3. Thẩm định quy trình phân tích

Quy trình phân tích các PAH đã được chúng tôi thẩm định về tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ thu hồi, giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện.

a. Tính đặc hiệu

Để đánh giá tính đặc hiệu, chúng tôi đã tiến hành phân tích các mẫu thịt trắng (mẫu không chứa các PAH), mẫu thịt trắng thêm chuẩn PAH và so sánh với dung dịch chuẩn các PAH. Kết quả thực nghiệm cho thấy, trên sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện pic vào thời điểm tương ứng với pic các PAH trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn PAH. Trên sắc ký đồ mẫu trắng thêm chuẩn xuất hiện pic ở cùng thời điểm với pic các PAH trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn, pic này được tách riêng khỏi các pic khác trong nền mẫu. Như vậy, quy trình đã xây dựng đảm bảo tính đặc hiệu khi phân tích phát hiện các PAH.

b. Khoảng tuyến tính

Khoảng tuyến tính đã được đánh giá cho toàn bộ 16 PAH nghiên cứu phân tích. Kết quả thực nghiệm cho thấy hệ số xác định R^2 của các đường hồi quy tuyến tính cho các PAH đều $> 0,99$ cho thấy giữa tín hiệu phân tích MS/MS và nồng độ từng PAH ở

các khoảng nồng độ đã khảo sát đều có quan hệ tuyến tính chặt chẽ và có ý nghĩa. Với đặc điểm của phân tích phát hiện PAH trong mẫu thực phẩm là không biết trước mức nhiễm PAH, và mức nhiễm PAH, nếu có, có thể dao động trong khoảng nồng độ rộng, khoảng tuyến tính rộng của phương pháp với cả 16 PAH được phân tích đồng thời (đều ít nhất trong khoảng từ 50 – 1000 ng/mL) là một lợi thế quan trọng khi ứng dụng phân tích PAH trên các đối tượng mẫu thực phẩm thực tế đa dạng trên thị trường.

c. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

LOD và LOQ của quy trình khi phân tích các PAH được xác định bằng phương pháp phân tích các mẫu trắng thêm chuẩn các PAH ở các nồng độ thấp để thu được tỷ số tín hiệu trên nhiễu (S/N) tương ứng là 3 và 10. Các kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. LOD và LOQ của các PAH trên nền mẫu thịt

Chất phân tích	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Chất phân tích	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
Naphthalen	1,0	3,0	Pyren	1,0	3,0
Acenaphthylen	0,6	2,0	Benzo(a)anthracen và chrysen	0,6	2,0
Acenaphthen	0,6	2,0	Benzo(b)flouranthen và Benzo(k)flouranthen	0,6	2,0
Fluoren	1,0	3,0	Benzo(a)pyren	1,0	3,0
Phenanthren và anthracen	1,0	3,0	Indeno(1,2,3-c,d)pyren và Dibenzo(a,h)anthracen	1,0	3,0
Fluoranthen	1,0	3,0	Benzo(g,h,i)perylene	1,0	3,0

Theo quy định châu Âu [2], nồng độ cho phép của PAH trong các sản phẩm thịt là: tổng lượng PAH tổng số: 35 µg/kg; benzo(a)pyren: 5 µg/kg. Kết quả thực nghiệm cho thấy, LOQ của benzo(a)pyren là 1 µg/kg, đáp ứng yêu cầu định lượng tại nồng độ tối đa là 5 µg/kg. Đối với các PAH khác, LOQ trên mẫu thay đổi từ 2 đến 6 µg/kg, đều thấp hơn so với giá trị tối đa cho phép là 35 µg/kg, do đó phương pháp có độ nhạy đáp ứng để kiểm soát nồng độ PAH theo quy định của châu Âu.

d. Độ lặp lại, độ đúng

- *Độ lặp lại* của quy trình được đánh giá qua phân tích độc lập 6 lần trên mẫu thực phẩm trắng được thêm chuẩn PAH ở các mức nồng độ 20 µg/kg và 100 µg/kg (tương ứng nồng độ trong dịch tiêm sắc ký là 100 ng/mL và 500 ng/mL). Kết quả (bảng 3) cho thấy quy trình đã xây dựng có độ lặp lại tốt khi ứng dụng phân tích các PAH (với độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) sau 6 lần phân tích dao động từ 2,7 - 14,0% ở mức nồng độ 20 µg/kg và từ 3,3 – 12,0% ở mức nồng độ 100 µg/kg). So sánh với quy định về hiệu lực phương pháp của EC, với mức hàm lượng đối tượng phân tích 100 µg/kg, giá trị CV (%) yêu cầu phải ≤ 23% [1]. Như vậy, quy trình cho độ lặp lại phù hợp khi phân tích các PAH.

- *Độ đúng* của quy trình được đánh giá thông qua độ thu hồi (R%) của lượng chuẩn các PAH vào nền thực phẩm không chứa các PAH. Với cả 16 PAH, chất chuẩn được thêm vào ở mức 20 µg/kg và 100 µg/kg. Tỷ lệ thu hồi ở mức thêm chuẩn 20 µg/kg dao động trong khoảng từ 84,8 - 96,5 %, trong khi tỷ lệ thu hồi ở mức thêm chuẩn 100 µg/kg dao động trong khoảng từ 91,2 – 103,0 % (bảng 3). Theo quy định của EC, tỷ lệ thu hồi ở khoảng nồng độ ≥ 10 µg/kg phải đạt từ 80 – 110 % [1]. Như vậy, quy trình được thiết lập có độ đúng đạt yêu cầu.

Bảng 3. Độ lặp lại và độ thu hồi của các PAH trên nền mẫu thịt

Chất phân tích	Nồng độ 20 µg/kg (n = 6)		Nồng độ 100 µg/kg (n = 6)	
	RSD(%)	R% trung bình	RSD (%)	R% trung bình
Naphthalen	6,4	92,6	12,0	102
Acenaphthylen	8,2	96,5	11,0	103
Acenaphthen	14,0	90,4	12,0	90,6
Fluoren	5,8	89,1	11,0	93,9
Phenanthren và anthracen	5,2	93,8	12,0	97,9
Fluoranthren	3,6	91,3	12,0	98,5
Pyren	2,7	84,8	11,0	89,7
Benzo(a)anthracen và chrysene	4,7	92,8	12,0	95,4
Benzo(b)fluoranthren và Benzo(k)fluoranthren	5,0	89,0	7,3	93,0
Benzo(a)pyren	6,7	88,2	7,1	91,7
Indeno(1,2,3-c,d)pyren và Dibenzo(a,h)anthracen	4,3	85,6	3,3	96,3
Benzo(g,h,i)perylene	5,2	93,6	4,8	80,2

3.4. Ứng dụng phân tích các PAH trong thực phẩm

Sử dụng phương pháp phân tích bằng GC-MS/MS đã thẩm định, nhóm nghiên cứu đã phân tích 16 PAH trong 6 mẫu thịt tươi (3 mẫu thịt bò, 3 mẫu thịt lợn) và 24 mẫu thịt đã chế biến (gồm 8 mẫu thịt quay, 8 mẫu thịt xiên và 8 mẫu thịt hun khói) các mẫu đang lưu hành trên địa bàn Hà Nội và Thái Bình trong tháng 7/2015, 8/2015. Để đánh giá mức độ nhiễm PAH trong thịt và sản phẩm thịt, hai chỉ tiêu được đánh giá là **tổng PAH và benzo(a)pyren**. Các kết quả phân tích được trình bày ở bảng 4. Trên 6 mẫu thịt tươi đều không phát hiện có PAH. Trong 24 mẫu sản phẩm thịt đã chế biến, có tới 22 mẫu phát hiện thấy có PAH, trong đó có tới 8 mẫu có tổng lượng PAH vượt quá mức giới hạn cho phép, trong đó đáng chú ý có tới 6 mẫu là thịt xiên (75%) và 2 mẫu thịt quay (25%). Về chỉ tiêu benzo(a)pyren, chỉ có 4 mẫu (đều là mẫu thịt xiên, 2 mẫu ở Hà Nội, 2 mẫu ở Thái Bình) phát hiện thấy có benzo(a)pyren, nhưng hàm lượng xác định

được đều dưới mức cho phép của EC (5 µg/kg), và 4 mẫu này đồng thời cũng đều có tổng lượng PAH vượt quá giới hạn cho phép của EC.

Bảng 4. Kết quả xác định PAH trong thịt và sản phẩm thịt

TT	Tên mẫu	Địa điểm lấy mẫu	Tổng PAH (µg/kg)	Benzo(a)pyren (µg/kg)
Giới hạn tối đa cho phép theo EC			35,0	5,0
1.	Thịt 1 (thịt lợn)	Nguyễn Huy Tự- Hà Nội	-	-
2.	Thịt 2 (thịt lợn)		-	-
3.	Thịt 3 (thịt bò)	Chợ Đông Xuyên- Thái Bình	-	-
4.	Thịt 4 (thịt bò)		-	-
5.	Thịt 5 (thịt bò)	Siêu thị Big C - Hà Nội	-	-
6.	Thịt 6 (thịt bò)		-	-
7.	Thịt quay 1	Chợ Cổ Nhuế- Hà Nội	165,0	-
8.	Thịt quay 2		158,0	-
9.	Thịt quay 3	Chợ Bưởi- Hà Nội	7,0	-
10.	Thịt quay 4		4,8	-
11.	Thịt quay 5	Chợ Đông Xuyên – Thái Bình	12,0	-
12.	Thịt quay 6		15,0	-
13.	Thịt quay 7	Chợ Tiểu Hoàng– Thái Bình	6,8	-
14.	Thịt quay 8		7,3	-
15.	Thịt xiên 1	Chợ Trần Cung- Hà Nội	246,0	1,1
16.	Thịt xiên 2		214,0	1,0
17.	Thịt xiên 3	Chợ Cầu Giấy- Hà Nội	84,0	-
18.	Thịt xiên 4		80,0	-
19.	Thịt xiên 5	Chợ Tiền Hải- Thái Bình	457,0	1,0
20.	Thịt xiên 6		421,0	1,1
21.	Thịt xiên 7	Chợ An Đồng – Thái Bình	-	-
22.	Thịt xiên 8		-	-
23.	Thịt xông khói 1	Chợ Cổ Nhuế- Hà Nội	6,0	-
24.	Thịt xông khói 2		5,0	-
25.	Thịt xông khói 3	Siêu thị Big C – Hà Nội	14,0	-
26.	Thịt xông khói 4		16,0	-
27.	Thịt xông khói 5		5,0	-
28.	Thịt xông khói 6		4,1	-
29.	Thịt xông khói 7	Siêu thị Thái Bình	4,3	-
30.	Thịt xông khói 8		4,0	-

*Ghi chú: -: không phát hiện thấy

Những kết quả phân tích trên mẫu thực tế đã cho thấy rõ nguyên nhân gây phát sinh PAH trong sản phẩm thịt là quá trình chế biến sử dụng nguồn nhiệt trực tiếp ở nhiệt độ cao (quay, nướng, xông khói), trong đó việc chế biến bằng quay, nướng gây nhiễm PAH cao hơn hẳn so với xông khói trên những mẫu đã phân tích (25% số mẫu thịt quay, 75% số mẫu thịt xiên nướng có tổng hàm lượng PAH vượt quá quy định, trong khi

không có mẫu thịt xông khói nào có tổng hàm lượng PAH vượt quá quy định), cho thấy ảnh hưởng tiêu cực của nhiệt độ cao trong quay, nướng tới mức độ an toàn của sản phẩm thịt. Ngoài ra, nhóm sản phẩm thịt xiên nướng cũng đáng chú ý ở chỗ đây là nhóm sản phẩm duy nhất qua quá trình phân tích đã phát hiện nhiễm benzo(a)pyren, chất độc hại điển hình của nhóm PAH trên 50% số mẫu (4/8). Trong số 24 mẫu chế phẩm từ thịt, 8 mẫu có tổng lượng PAH vượt quá mức quy định của EC đều là mẫu lấy tại các chợ dân sinh ở Hà Nội và Thái Bình, khó kiểm soát được về quy trình chế biến, bảo quản.

4. KẾT LUẬN

Một phương pháp nhạy và chọn lọc sử dụng kỹ thuật GC-MS/MS đã được phát triển, thẩm định nhằm phân tích các PAH trong thịt và sản phẩm thịt. Các kết quả thẩm định chứng tỏ sự phù hợp, tin cậy của phương pháp trong việc sử dụng để xác định các PAH trong thịt và sản phẩm thịt lưu hành trên thị trường. Phương pháp đã được ứng dụng phân tích trên 30 mẫu được lấy ngẫu nhiên trên 2 địa bàn Hà Nội và Thái Bình. Những kết quả phân tích cho thấy thực trạng đáng lo ngại khi 22/24 sản phẩm thịt chế biến bị nhiễm PAH, trong đó 8/24 sản phẩm có tổng lượng PAH vượt quá giới hạn tối đa cho phép của EC, và cả 8 mẫu đều lấy tại các chợ dân sinh, khó kiểm soát về nguồn gốc nguyên liệu cũng như quy trình chế biến. Bên cạnh đó, đã phát hiện được sự có mặt của benzo(a)pyren, chất điển hình có độc tính cao cần kiểm soát riêng rẽ của nhóm PAH, trong 4 sản phẩm thịt xiên nướng. Những kết quả này cho thấy nguy cơ về sức khỏe từ các loại sản phẩm thịt chế biến sẵn bằng các phương pháp quay, xiên nướng, vốn là các hình thức chế biến rất phổ biến và được ưa chuộng vì hương vị hấp dẫn người tiêu dùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Commission of the European Communities (2002), “Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC)”, *Official Journal of European Communities*, L221/8 - L221/35.
2. Commission of the European Communities (2006), “Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs”, *Official Journal of the European Communication*, pp. 364 - 369.
3. Forsberg N.D., Wilson G.R., & Anderson K.A. (2011), “Determination of Parent and Substituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in High-fat Salmon Using a Modified QuEChERS Extraction, Dispersive SPE and GC-MS”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(15), pp 8108–8116.
4. Hiroshi A., Stephanie B., David K., & Rob P. (1998), *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Properties and Environmental Fate*, Environmental Organic Chemistry.
5. Kao T.H., Chen S., Chen C.J., Huang C.W., & Chen B.H. (2012), “Evaluation of Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by the QuEChERS Method and Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Their Formation in Poultry Meat as Affected by Marinating and Frying”, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 60(6), pp 1380–1389.