

Magdalena Polak-Śliwińska, Łukasz Łamejko, Mariusz S. Kubiak¹⁾

ZAWARTOŚĆ PATULINY I 5-HMF W SOKACH OWOCOWO-WARZYWNYCH Z PRODUKCJI EKOLOGICZNEJ I KOMERCYJNEJ*

Katedra Towaroznawstwa i Badań Żywności, Wydziału Nauk o Żywności,
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Kierownik: dr hab. inż. E. Gujska, prof. UWM

¹⁾ Katedra Procesów i Urządzeń Przemysłu Spożywczego, Wydziału Mechanicznego,
Politechniki Koszalińskiej
Kierownik: prof. dr hab. inż. J. Diakun

W pracy oznaczono zawartość patuliny i 5-HMF w sokach owocowo-warzywnych pochodzących z produkcji komercyjnej oraz ekologicznej, znajdujących się na rynku olsztyńskim. We wszystkich analizowanych próbkach stwierdzono obecność tych substancji, jednak ich stężenie w żadnym przypadku nie przekraczało dopuszczalnych limitów. Badania nad zawartością 5-HMF wykazały, że jego poziom wahał się od 0,27 do 0,33 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ w sokach komercyjnych, podczas gdy w sokach z produkcji ekologicznej od 0,09 do 0,26 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Patulinę wykryto w 10 analizowanych sokach (100% próbek) na poziomie od 0,21 do 11,76 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Wyniki badań wskazują, że patulina i 5-HMF nie wydają się być problemem w sokach na bazie jabłek na rynku olsztyńskim.

Hasła kluczowe: mikotoksyny, patulina, 5-HMF, soki owocowo-warzywne.
Key words: micotoxins, patulin, 5-HMF, fruit and vegetable juices.

Z dynamiki rynku żywności wynika, że współczesny konsument skupia uwagę na wartość odżywczą nabywanej żywności, poszukuje produktów, które spełniają jego oczekiwania w zakresie smaku, świeżości, ekologii i pochodzenia. Chętniej są nabywane tradycyjnie wytwarzane wędliny i pieczywo, naturalnie dojrzewające sery, czy świeżo wyciśnięty sok. Atutem żywności ekologicznej jest certyfikat produkcji ekologicznej. Kontrola procesu na wszystkich etapach produkcji i przetwórstwa, zapewnia określoną jakość produktów ekologicznych oraz zwiększa zaufanie konsumentów (1).

Prowadzone w ostatnich latach kontrole jakości wykazały wiele uchybień dotyczących produktów branży sokowniczej. Sytuacja ta, spowodowana jest wprowadzeniem do obrotu w dużych sieciach handlowych marek własnych tzw. *private labels*, które są o 20–30% tańsze od produktów markowych. Obniżenie ceny nie odbywa się bez konsekwencji, jaką jest pogorszenie jakości wytwarzanych wyrobów. Mikroor-

* Badania naukowe są fragmentem prac wykonanych w ramach projektu badawczego własnego finansowanego przez MNiSW nr N N312 439837.

ganizmy zidentyfikowane w sokach owocowych mają swe źródło w surowcu, z którym są wprowadzane do zakładów i przetwórni (2). Zagrożenia biologiczne związane z żywnością stanowią m.in. bakterie, wirusy, a także produkty wtórnego metabolizmu grzybów toksynotwórczych zwane mikotoksynami (3). Szacuje się, że dotychczas zidentyfikowano ok. 400 mikotoksyn, wśród których najlepiej poznane to aflatoksyny, ochratoksyny, trichoteceny, fumonizyny, zearalenon oraz patulina (3, 4).

Patulina (PAT) jest wtórnym metabolitem produkowanym przez grzyby z rodzaju *Penicillium*, *Aspergillus* i *Byssosclamys* (4). Spośród nich, najważniejszy jest rodzaj *Penicillium expansum* (5). Toksyna ta, występuje przede wszystkim w jabłkach i produktach z jabłek. Sporadycznie można ją spotkać w innych owocach, takich jak: gruszki, morele, ananasy, banany, brzoskwinie i winogrona (6). Długotrwałe narażenie na mikotoksyny może być przyczyną wielu przewlekłych chorób (7). Patulina powoduje m. in. zapalenia, owrzodzenia i krwawienia, choroby układu pokarmowego, uszkodzenia jelit, w tym zwyrodnienie komórek nabłonkowych, wykazuje działanie rakotwórcze, teratogenne, genotoksyczne, immunotoksyczne oraz neurotoksyczne (6). Stąd wynika konieczność kontrolowania poziomu tych substancji w żywności i paszach dla zwierząt (4).

Niebezpiecznymi związkami występującymi w żywności są również furfural. Pod wpływem procesów cieplnych, jak również długiego przechowywania, w żywności zachodzi szereg następujących po sobie reakcji między cukrami redukującymi a aminokwasami, peptydami lub białkami, które zawierają wolną grupę aminową i prowadzą do utworzenia licznej grupy nowych związków chemicznych (8). Reakcje te określane są jako reakcje Maillarda, inaczej nazywane reakcjami nieenzymatycznego brązowienia. W reakcji 1,2 – enolizacji przy pH = 7 oraz w środowisku kwaśnym tworzą się głównie furfural (F), jeśli w próbce występują pentozy, lub hydroksyfurfural (HMF), jeśli w próbce występują heksozy (8). Związki te, są niepożądane w produktach spożywczych. Pozostaje także kontrowersyjna sprawa ich toksyczności czy mutagenności. Są one używane do oceny jakości procesu oraz cech organoleptycznych końcowego produktu (8). 5-hydroksymetylofurfural (5-HMF) występuje w wielu produktach spożywczych, łącznie z kawą, suszonymi owocami, sokami owocowymi, miodem, mlekiem i chlebem (9, 10). Od lat badania nad zawartością HMF w produktach spożywczych budzą zainteresowanie, gdyż wykazuje on aktywność mutagenną i destruktywne działanie na nić DNA. Konsekwencją obecności HMF w żywności są objawy toksyczne wskazujące na ten związek oraz jego pochodne, sulfoksymetylofurfural (SMF) oraz chlorometylofurfural (CMF). Są to substancje prawdopodobnie cytotoksyczne, genotoksyczne, mutagenne, rakotwórcze, przez co mogą powodować raka jelita grubego, skóry i wątroby (10). Obecność 5-HMF jest postrzegana jako wskaźnik pogorszenia jakości produktu. Substancja ta, jest wypadkową procesu dehydratacji ketonopentoz, zachodzącego szczególnie w środowisku wysokiej temperatury i zakwaszenia (6). Ta chemiczna konwersja została stwierdzona podczas przechowywania soków pomarańczowych, w których poziom HMF wyraźnie wzrósł (6). Stąd zarówno 5-HMF, jak i patulina są ważnymi markerami jakości soków owocowych (9).

Dopuszczalne poziomy patuliny w środkach spożywczych ujmuje Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 – z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych (11).

Według tego dokumentu maksymalny dopuszczalny poziom zanieczyszczenia patuliną środków spożywczych wynosi:

- soki owocowe, koncentrat soków owocowych po rozcieńczeniu wodą oraz nektary owocowe – 50 µg/kg,
- napoje spirytusowe, jabłecznik i inne sfermentowane napoje otrzymywane z jabłek lub zawierające sok jabłkowy – 50 µg/kg,
- produkty z jabłek, w tym kompot jabłkowy, puree jabłkowe przeznaczone do bezpośredniego spożycia – 25 µg/kg,
- sok jabłkowy i produkty z jabłek, w tym kompot jabłkowy i puree jabłkowe, dla niemowląt i małych dzieci, jako takie oznakowane i sprzedawane – 10 µg/kg,
- żywność dla niemowląt, inna niż przetworzona żywność na bazie zbóż dla niemowląt i małych dzieci – 10 µg/kg.

Do oznaczania patuliny w owocach i sokach owocowych wykorzystuje się metodę TLC, HPLC, GC oraz ELISA (12). Przy oznaczaniu HMF w produktach spożywczych głównie stosuje się metodę HPLC-UV, LC-MS/MS, GC-MS i metodę MEKC (10). Zaproponowano także metodę refraktometryczną z paskami testowymi Reflectoquant[®] HMF przez firmę Merck pozwalającą na analizę ilościową tego analitu w przedziale od 1–60 mg/dm³. Test pozwala na szybką kontrolę jakości produktu.

Przeprowadzone badania miały na celu oznaczenie zawartości patuliny i 5-HMF w sokach owocowo-warzywnych pochodzących z produkcji komercyjnej oraz ekologicznej, znajdujących się w obrocie na terenie Olsztyna.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły soki owocowe pochodzące: z produkcji komercyjnej (n = 6) oraz z produkcji ekologicznej (n = 4) zakupione w sieciach handlu detalicznego na terenie Olsztyna (tab. I). Oznaczanie zawartości patuliny i 5-HMF w badanych sokach wykonywano w trzech równoległych powtórzeniach z podwójnym dozowaniem próbki na kolumnę.

Tab e l a I. Materiał do badań

Tab l e I. Test material

Nr próbki	Rodzaj soku	Produkcja	Wygląd
1	Jabłkowo-winogronowy	komercyjna	klarowny
2	Jabłkowy	komercyjna	klarowny
3	Jabłkowo-malinowy	komercyjna	mętny
4	Jabłkowo-śliwkowy	komercyjna	mętny
5	Brzoskwinowo-jabłkowo-marchwiowy	komercyjna	mętny
6	Marchwiowo-jabłkowo-morelowy	komercyjna	mętny
7	Jabłko – czarna porzeczką	ekologiczna	klarowny
8	Jabłkowy	ekologiczna	klarowny
9	Jabłko – mango	ekologiczna	mętny
10	Jabłkowo-marchwiowy	ekologiczna	mętny

Analizę próbek soków w kierunku oznaczania zawartości patuliny i 5-hydroksymetylofurfuralu przeprowadzono metodą HPLC wg *Rój i Przybyłowski* (13) oraz *Gökmen i Açar* (6).

Przygotowanie próbek analitycznych

5 cm³ próbki soku przenoszono do cylindra miarowego poj. 100 cm³. Sok ekstrahowano trzykrotnie za pomocą octanu etylu, a do połączonych ekstraktów dodawano 1,5% węgla sodu i wytrząsano. Oddzieloną górną warstwę sączono przez sączek ilościowy miękki wobec bezwodnego siarczanu sodu. Przesącz odparowano za pomocą wyparki próżniowej, pozostawiając 2 cm³ roztworu, które dosuszano w strumieniu azotu o czystości 4,0. Suchą pozostałość rozpuszczano w 500 mm³ wody zakwaszonej (pH 4,0) i sączono przez filtr strzykawkowy firmy Millipore. Tak przygotowaną próbkę poddano analizie HPLC w celu oznaczenia zawartości patuliny i 5-HMF.

Analiza HPLC

Rozdział chromatograficzny badanych próbek przeprowadzono techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (HPLC – RP) na aparacie LC-10A firmy Shimadzu. Warunki rozdziału chromatograficznego: kolumna chromatograficzna – Phenomenex® Synergy 4u Hydro – RP 80A, 250 × 4,6 mm z prekolumną Phenomenex® Security Guard Cartiges AQ C18 4 × 3,0 mm; faza ruchoma: acetonitryl – woda (75 : 25, v/v); temp. rozdziału: 20°C; prędkość przepływu: 1 cm³/min; obj. nastrzyku: 50 mm³; detektor spektrofotometryczny z matrycą fotodiod SPD – M 20 A, detekcja przy dł. fali $\lambda = 254$ nm.

Robocze roztwory wzorcowe patuliny oraz 5-hydroksymetylofurfuralu przygotowano poprzez sporządzenie serii rozcieńczeń wzorców podstawowych patuliny (firma Romer Labs®) i 5-HMF (firma Sigma Aldrich) w wodzie zakwaszonej o pH=4. Interpretację ilościową i jakościową otrzymanych chromatogramów przeprowadzono na podstawie porównania czasu retencji i wielkości pola powierzchni pików patuliny i 5-HMF w próbkach standardowych o znanym stężeniu, a czasem retencji i wielkością pola powierzchni pików analitów w próbkach badanych.

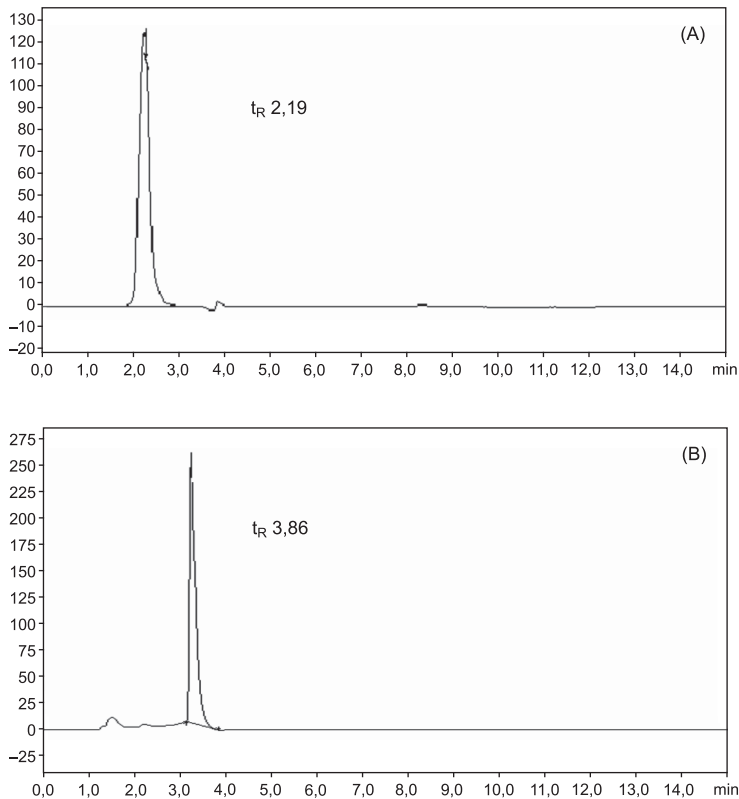
Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej, uwzględniając podstawowe miary statystyczne (\bar{x} , s, RSD). Istotność różnic między grupami określono testem *Duncana*.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W celu oznaczenia zawartości patuliny oraz 5-HMF wykorzystano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Zastosowanie tej metody pozwoliło na otrzymanie pełnych rozdziałów chromatograficznych patuliny oraz 5-HMF w badanych próbkach soków (ryc. 1 i ryc. 2).

Ustalono zakres roboczy metody oznaczania patuliny i 5-HMF w badanych produktach, a sporządzone 5-punktowe krzywe wzorcowe oznaczanych substancji posłużyły do przeprowadzenia analizy ilościowej badanych analitów w wybranych sokach. Krzywe wzorcowe patuliny i 5-HMF opisują równania:

$$\text{patulina} - y = 5 \cdot 10^6 x; \quad R^2 = 0,9999; \quad \text{5-HMF} - y = 4 \cdot 10^7 x; \quad R^2 = 0,9867.$$



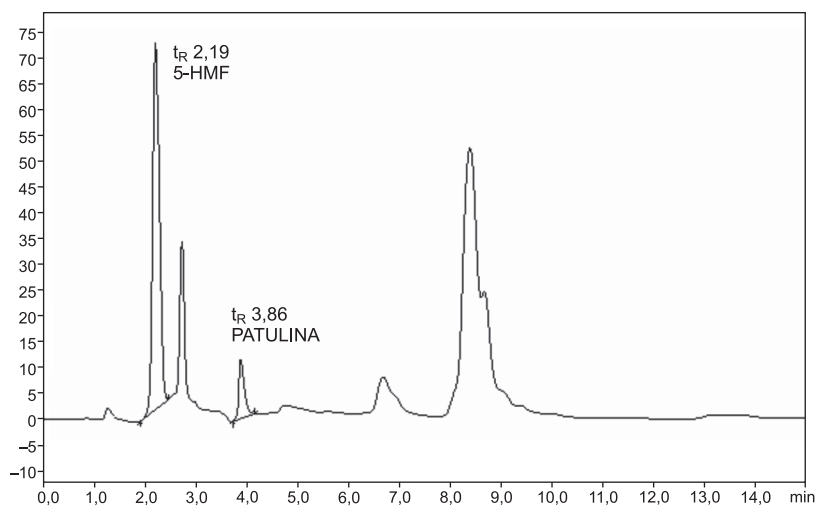
Ryc. 1. Przykładowe chromatogramy: wzorca 5-HMF (A) o stężeniu $0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ i wzorca patuliny (B) o stężeniu $0,025 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Fig. 1. Example of chromatogram of $0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 5-HMF (A) and $0,025 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ patulin (B) standards (B).

Materiał do badań stanowiły soki na bazie jabłek, klarowne i mętne z produkcji komercyjnej i ekologicznej. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, iż poziom patuliny w sokach komercyjnych kształtował się na poziomie od $0,87$ (sok brzoskwińowo-jabłkowo-marchwiowy, mętny) do $11,76 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ (sok marchwiowo-jabłkowo-morelowy, mętny) (RSD od $1,44$ do $6,30\%$). W sokach ekologicznych poziom PAT wahał się od $0,21$ (sok jabłkowo-marchwiowy, mętny) do $1,74 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ (sok jabłko-mango, mętny), zaś RSD od $1,09$ do $7,09\%$ (ryc. 3).

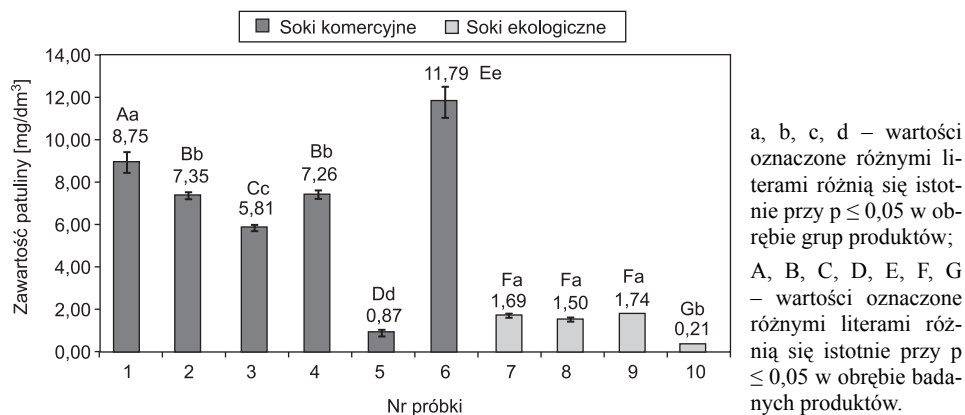
Uzyskane wyniki badań dotyczące patuliny oceniano pod względem przekroczenia najwyższych dopuszczalnych poziomów zawartych w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 1881/2006 – z dn. 19 grudnia 2006 r. ustalającym najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych (11). We wszystkich badanych próbkach soków zawartość tej mikotoksyny nie przekraczała $50 \mu\text{g}/\text{kg}$. Większy jej poziom oznaczono w sokach komercyjnych, klarownych i mętnych niż w sokach z produkcji ekologicznej. W badaniach Pokrzywy i współpr. (4) zawartość patuliny stwierdzono w 2 z 50 badanych próbek soku jabłkowego. Uzyskane wyniki nie przekraczały dopuszczalnej zawartości tej mikotoksyny, przyczem jeden

mieścił się w zakresie do 25% obowiązującego najwyższego dopuszczalnego poziomu (NDP), natomiast drugi pomiędzy 76–100% NDP. Badania przeprowadzone przez *Marín* i współpr. (14) w kierunku oznaczania patuliny w sokach owocowych również nie wykazały obecności tej mikotoksyny w zakresie przekraczającym najwyższy dopuszczalny poziom tej substancji ustanowiony przez Komisję EU. *Yuan* i współpr. (15) przebadali 95 produktów z jabłek, w których średnia zawartość patuliny wynosiła 20,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Badania te wykazały również, iż możliwa jest redukcja poziomu patuliny w sokach jabłkowych (o 46,2%) w wyniku procesu przetwarzania do wytworzenia produktu finalnego.



Ryc. 2. Przykładowy chromatogram próbki soku komercyjnego (próbka numer 6).

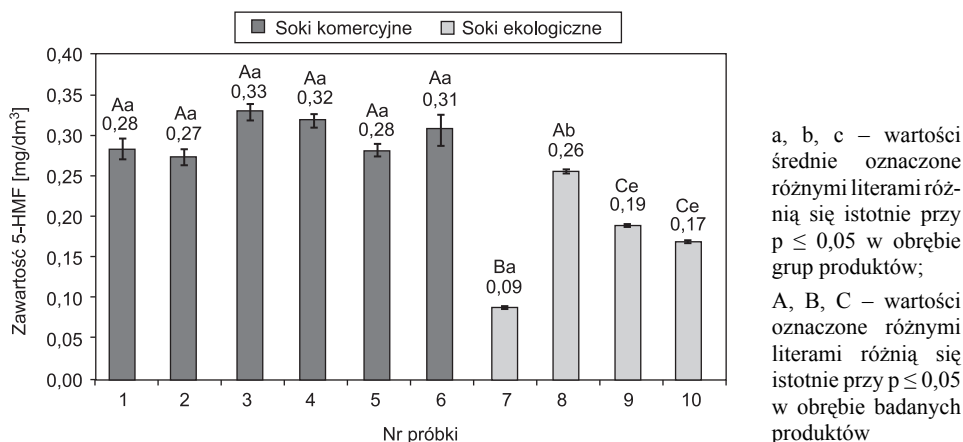
Fig. 2. Exemple of chromatogram of commercial juice sample (sample number 6).



Ryc. 3. Średnia zawartość patuliny w badanych sokach ($\mu\text{g}/\text{dm}^3$).

Fig. 3. Mean content of patulin in analysed juices ($\mu\text{g}/\text{dm}^3$).

HMF jest postrzegany jako główna interferencja przy oznaczaniu patuliny. Separacja tych dwóch związków jest wymagana dla rzetelnego oznaczenia zawartości patuliny w sokach (14). Poziom 5-HMF w sokach komercyjnych wahał się od 0,27 (sok jabłkowy) do 0,33 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ (sok jabłko – malina) (RSD od 2,59 do 7,11%), natomiast w sokach ekologicznych – od 0,09 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ (sok jabłko – czarna porzeczka) do 0,26 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ (sok jabłkowy) (RSD od 0,94 do 2,69%). Wyniki tych analiz oceniano na podstawie dopuszczalnej zawartości 5-HMF określonej przez Międzynarodową Federację Producentów Soków Owocowych (IFFJP), która dla soku jabłkowego wynosi 50 mg/dm^3 . Jak obrazuje ryc. 4, wszystkie badane soki zawierały dopuszczalne zawartości 5-HMF. Najwyższe stężenie – 0,33 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ oznaczono w soku tradycyjnym, najniższe – 0,09 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ w soku ekologicznym.



Ryc. 4. Średnia zawartość 5-HMF w badanych sokach ($\mu\text{g}/\text{dm}^3$).

Fig. 4. Mean content of 5-HMF in analysed juices ($\mu\text{g}/\text{dm}^3$).

Widome jest, iż 5-HMF jako produkt reakcji Maillarda powstaje z heksoz w środowisku kwaśnym w procesie ogrzewania oraz długotrwałego przechowywania produktów. W odniesieniu do przeprowadzonych analiz wszystkie badane soki odznaczały się niskim stopniem przetworzenia i były produktami o krótkim terminie przydatności. Prawdopodobnie z tego względu zawartości 5-HMF w badaniach własnych stwierdzono na tak niskim poziomie. Badania przeprowadzone przez *Gaspára* i *Lucena* (9) w Portugalii określające zawartość 5-HMF w sokach jabłkowych mętnych i klarownych wskazują na wysoką jakość tych produktów. W obu rodzajach soków jego stężenie wyniosło 0,2 mg/dm^3 .

Opublikowane prace dotyczące kontroli poziomu 5-HMF w sokach owocowych świadczą o zwiększającej się jakości tych produktów. Jednocześnie poznanie czynników powodujących tworzenie się tego związku w produktach spożywczych pozwala na znaczne obniżanie jego zawartości.

WNIOSKI

1. Oznaczone poziomy patuliny i 5-HMF w sokach na bazie jabłek pochodzących z produkcji komercyjnej i ekologicznej nie przekroczyły najwyższych dopuszczalnych poziomów wskazanych, jako obligatoryjne przez obowiązujące prawo.

2. Obecność patuliny i 5-HMF w sokach, których głównym komponentem są jabłka nie stanowi ryzyka zagrożenia zdrowia potencjalnego konsumenta tych produktów, aczkolwiek badania nad spożyciem szkodliwych substancji występujących na wyższym poziomie niż NDP w produktach na bazie różnych owoców powinny być przeprowadzone i udokumentowane.

M. Polak-Śliwińska, Ł. Łamejko, M. S. Kubiak

PATULIN AND 5-HMF CONTENT IN FRUIT AND VEGETABLE JUICES
FROM ECOLOGICAL AND COMMERCIAL PRODUCTION

Summary

The aim of this study was to determine the content of patulin and 5-HMF in fruit and vegetable juices from ecological and commercial production, available in the Olsztyn market. In total analysed samples, these substances were present, but within the admissible limits.

The study of 5-HMF content showed that its levels ranged from 0.27 $\mu\text{g L}^{-1}$ to 0.33 $\mu\text{g L}^{-1}$ in juice from commercial production, while in the juice from organic production – from 0.09 $\mu\text{g L}^{-1}$ to 0.26 $\mu\text{g L}^{-1}$. Patulin in concentrations ranging from 0.21 $\mu\text{g L}^{-1}$ to 11.76 $\mu\text{g L}^{-1}$ was detected in ten samples (100%). The results of this study show that patulin and 5-HMF do not seem to be a problem in apple-based juices available in the Olsztyn market. Although incidence and levels of patulin found were low, constant surveillance is recommended, since the occurrence of the toxin in apple products is dependent on many factors.

PIŚMIENNICTWO

1. Komorowska D.: Rozwój produkcji i żywności ekologicznej. Stowarzyszenie Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu. Roczniki Naukowe 2009; 3: 183-187. – 2. Luning P.A., Marcelis W. J., Jongen W.M.F.: Zarządzanie jakością żywności. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2005. – 3. Filipek A., Daniewski M., Bal K.: Mikotoksyny z grupy trichotecenów w żywności. Żywnienie, Człowiek i Metabolizm 2001; 2: 169-177. – 4. Pokrzywa P., Cieślak E., Topolska K.: Ocena zawartości mikotoksyn w wybranych produktach spożywczych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2007; 3 (52): 139-146. – 5. Welke J.E., Hoeltz M., Dottori H.A., Noll I.B.: Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels. Food Control, 2009; 20: 48-52. – 6. Gökmen V., Açar J.: Rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. Journal of Chromatography A, 1996; 730: 53-58. – 7. Goliński P., Waśkiewicz A., Gromadzka K.: Mycotoxins and mycotoxicoses under climatic conditions of Poland. Polish J. Vet. Sci., 2009; 12(4): 581-588. – 8. Michalska A., Zieliński H.: Produkty reakcji Maillarda w żywności. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2007; 2 (51): 5-16. – 9. Gaspar E.M.A.M., Lucena A.F.F.: Improved HPLC methodology for food control – furfurals and patulin as markers of quality. Food Chemistry 2009; 114: 1576-1582. – 10. Teixidó E, Núñez O, Santos F.J., Galceran M.T.: 5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography. Food Chemistry 2011; 26: 1902-1908.

11. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych. – 12. Polska Norma PN-EN 14177:2004. Artykuły żywnościowe. Oznaczenie zawartości patuliny w klarownym i w mętym soku jabłkowym oraz w przecierze jabłkowym. Metoda HPLC z oczyszczaniem w układzie ciecz–ciecz (oryg.).

– 13. Rój A., Przybyłowski P.: The content of patulin in apple juices of different degree of processing. *Polish Journal of Natural Sciences*, 2007; 4: 93-96. – 14. Marín S., Mateo E.M., Sanchis V., Valle-Algarra F.M., Ramos A.J., Jimenez M.: Patulin contamination in fruit derivatives, including baby food, from the Spanish market. *Food Chemistry* 2011; 124: 563-568. – 15. Yuan Y., Zhuang H., Zhang T., Liu J.: Patulin content in apple products marketed in Northeast China. *Food Control* 2010; 21: 1488-1491.

Adres: 10-957 Olsztyn, Pl. Cieszyński 1.