

Marta Słowianek, Joanna Leszczyńska

WIELOPIERŚCIENIOWE WĘGLOWODORY AROMATYCZNE W ŻYWNOSCI – ASPEKTY PRAWNE I ANALITYCZNE

Instytut Podstaw Chemii Żywności Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechniki Łódzkiej

Kierownik: prof. dr hab. *S. Wysocki*

Hasła kluczowe: detekcja, żywność, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, wysokosprawna chromatografia cieczowa, chromatografia gazowa.

Key words: detection, food, polycyclic aromatic hydrocarbons, high-performance liquid chromatography, gas chromatography.

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) są organicznymi związkami zawierającymi od dwóch do kilkunastu pierścieni aromatycznych połączonych ze sobą w różnych konfiguracjach geometrycznych, co decyduje o ich różnicowanych właściwościach fizykochemicznych i toksycznych (1). Powstają w szerokim zakresie temperatur (250–920°C) podczas niepełnego spalania (pirolizy) materii organicznej, zachodzącego w wyniku procesów naturalnych i antropogennych (2). Najczęściej, źródłem zanieczyszczeń środowiska przez WWA jest działalność człowieka: rafinerie ropy naftowej, koksownie, motoryzacja (spaliny samochodowe, ścieranie się opon), spalarnie odpadów, dymy z kotłowni i pieców domowych, dym papierosowy oraz procesy przemysłowe takie jak: przemysł koksowniczy, huty żelaza, aluminium, miedzi, elektrownie i elektrociepłownie, przemysł materiałów plastycznych i farbiarskich. Do naturalnych źródeł emisji WWA do środowiska zaliczamy pożary lasów i erupcje wulkanów (1). Związki te, dostają się do organizmu ludzkiego różnymi drogami: skórą, inhalacyjną i pokarmową. Najwięcej WWA przenika jednak do organizmu z żywnością (3).

Zanieczyszczenie żywności przez WWA

Produkty żywnościowe mogą ulegać zanieczyszczeniu WWA na skutek oddziaływania środowiska (pyły, powietrze, woda i gleba). Zanieczyszczenie środowiskowe żywności tymi związkami może mieć charakter bezpośredni, bądź pośredni przez skażenie surowców używanych do jej produkcji. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne mogą trafiać do żywności z różnych składników biosfery, a następnie są przekazywane przez kolejne ogniwa łańcucha pokarmowego. W przypadku roślin, zanieczyszczenie WWA następuje na skutek osiadania na nich cząstek pyłów (z zaadsorbowanymi WWA) oraz poboru WWA z gleby, dla której poziom zawartości WWA jest jednym ze wskaźników stopnia skażenia roślin (4). Związki te, mogą się również tworzyć w samej żywności (pierwotnie), jak i podczas procesów jej

przemysłowego przetwarzania, przygotowywania do spożycia czy utrwalania (4, 5). Do procesów niekorzystnie wpływających na poziom zanieczyszczenia produktów żywnościowych przez WWA należy: wędzenie, pieczenie na rożnie, grillowanie, prażenie, smażenie, jak również suszenie zwłaszcza konwekcyjne (6). Szczególnie wysokie stężenia WWA zostały oznaczone w produktach grillowanych (4). Poziom WWA w żywności przetworzonej zależy głównie od warunków i metod jej przygotowywania (4, 5). Przykładowo, na proces tworzenia WWA podczas wędzenia żywności ma wpływ skład drewna, typ generatora, dostępność tlenu, temperatura oraz długość trwania procesu (5). Podczas tych procesów produkty termicznego rozkładu wchodzi w bezpośredni kontakt z produktem żywnościowym (6).

Pośród produktów żywnościowych najwięcej WWA zawierają wędzone ryby i skorupiaki (4,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dla zawartości grupy czterech specyficznych WWA takich jak: benzo(a)piren, chryzen, benzo(a)antracen, benzo(b)fluoranten – WWA4 i 0,68 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dla zawartości benzo(a)pirenu – BaP) oraz wędzony drób i dziczyzna (0,92 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dla WWA4; 0,12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dla BaP). W mniejszych ilościach spotyka się je w takich produktach jak: warzywa i produkty warzywne (0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dla BaP), zboża i produkty zbożowe/chleb, mąka (0,06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dla BaP) (7). Stężenia WWA w rafinowanych (oczyszczonych) olejach wahają się w zakresie kilku $\mu\text{g}/\text{kg}$, podczas gdy w surowych (nieoczyszczonych) olejach poziom może przekraczać 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (5).

Regulacje prawne

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, udowodnione jest genotoksyczne, mutagenne i karcynogenne działanie niektórych WWA. W molekułach WWA takich jak fenantren, chryzen, benz(a)antracen, benzo(a)piren, benzo(b)fluoranten, benzo(e)piren, dibenz(a,h)antracen, benzo(g,h,i)perylene, indeno(1,2,3-cd)piren występuje tzw. „bay region” (struktura fenantrenu) – obszar o zwiększonej gęstości elektronowej umożliwiający tworzenie się np. adduktów z białkami (hemoglobina, albuminy) lub DNA, przez co związki te mogą oddziaływać na replikację komórki i wykazywać tym samym działanie mutagenne (8). Zatem obecność WWA w żywności stanowi niebezpieczeństwo dla zdrowia konsumenta i wymaga ciągłego monitorowania.

Międzynarodowa Agencja do Badań nad Rakiem (IARC – International Agency for Research on Cancer) sklasyfikowała benzo(a)piren do grupy 1 jako karcynogeny dla ludzi (9). Podczas 64 spotkania Wspólny Komitet Ekspertów FAO/WHO ds. Dodatków do Żywności (JECFA – The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) ocenił 33 WWA i wywnioskował, że 13 z nich jest wyraźnie karcynogennych i genotoksycznych. Lista obejmuje benzo(a)antracen, chryzen, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(a)piren, indeno(1,2,3-c,d)piren, di-benzo(a,h)antracen, 5-metylochryzen, benzo(j)fluoranten, dibenzo(ae)piren, dibenzo(ah)piren, dibenzo(ai)piren i dibenzo(al)piren (10).

Z kolei Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (US EPA – Environmental Protection Agency) wyselekcjonowała 16 WWA, które mają służyć do oceny stopnia zanieczyszczenia środowiska (5). Wśród nich obecne są zarówno WWA mało toksyczne, ale występujące w dużych ilościach oraz związki spotykane w ilościach śladowych, ale o potwierdzonym naukowo silnym potencjale karcynogen-

nym takie jak: benzo(a)antracen, chryzen, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(a)piren, indeno(1,2,3-c,d)piren, di-benzo(a,h)antracen i benzo(g,h,i)perylen (5, 11). Inaczej prezentuje się lista Unii Europejskiej, która zawiera tylko związki o najwyższej toksyczności. Obejmuje ona 15 WWA zaklasyfikowanych przez UE do związków karcynogennych, których poziom w żywności powinien być stale monitorowany. Lista zawiera 8 WWA z listy EPA oraz 7 nowych, tj.: 5-metylochryzen, cyklopenta(c,d)piren, benzo(j)fluoranten, dibenzo(ae)piren, dibenzo(ah)piren, dibenzo(ai)piren i dibenzo(al)piren, potem uzupełniono listę o benzo(c)fluoren (11).

W celu ochrony zdrowia publicznego Komisja Europejska uregulowała obecność WWA w żywności. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r., określiło benzo(a)piren (BaP) jako marker występowania i karcynogennego działania WWA i ustaliło najwyższą dopuszczalną zawartość benzopirenu w poszczególnych produktach żywnościowych w zakresie 1–10 µg/kg (produkty mięsne wędzone, tkanka mięśniowa ryb wędzonych i skorupiaków, oleje jadalne, produkty dla dzieci) (12). W jednym ze swoich rozporządzeń (rozporządzenie WE nr 333/2007 z 28 marca 2007 r., uzupełnione dyrektywą Komisji nr 2005/10/WE z dnia 4 lutego 2005 r.) UE określa także wymagania i kryteria sprawności, stawiane metodom analitycznym stosowanym do oznaczania związków WWA. Należą do nich m.in.: specyficzność metody, granica wykrywalności nie mniejsza niż 0,3 µg/kg, granica oznaczalności nie mniejsza niż 0,9 µg/kg, odzysk w zakresie 50–120% (13).

Późniejszy raport Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA-European Food Safety Authority) wykazał, że istnieją lepsze niż BaP markery całkowitej zawartości WWA w żywności (14). Wniosek ten sformułowano na podstawie oznaczenia 16 głównych WWA (13 WWA z raportu WHO z 2005 r. (10) i dodatkowo benzo(ghi)perylen, cyklopenta(cd)piren i benzo(c)fluoren) w 9714 próbkach należących do różnych kategorii żywności. Wyniki wykazały obecność kilku karcynogennych WWA w ok. 33% analizowanych próbek, chociaż stężenie BaP było poniżej granicy wykrywalności. Na podstawie tego badania, panel naukowy ds. Zanieczyszczeń w Łańcuchu Żywnościowym przy EFSA wywnioskował, że następujące grupy specyficznych WWA: BaP, chryzen (Chry), benzo(a)antracen (BaA), benzo(b)fluoranten (BbF) (nazwane jako WWA4) i dodatkowo benzo(k)fluoranten (BkF), dibenzo(a,h)antracen (DBahA), benzo(g,h,i)perylen (BgHiP) i indeno(1,2,3-cd)piren (nazwane jako WWA8) są obecnie jedynymi możliwymi wskaźnikami dla oceny karcynogennego potencjału WWA w żywności. Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności stwierdził także, że w porównaniu z układem czterech związków (WWA4) układ ośmiu związków (WWA8) nie wnosi istotnej wartości dodanej. Ustalono również nowy, najwyższy, dopuszczalny poziom dla sumy czterech substancji (WWA 4) w żywności przy zachowaniu oddzielnego, najwyższego, dopuszczalnego poziomu dla benzo(a)pirenu (14). Aktualnie obowiązujące rozporządzenie Komisji (UE) Nr 835/2011 z 19/08/2011 odnośnie najwyższych, dopuszczalnych poziomów zawartości grup WWA i benzo(a)pirenu (WWA4 i BaP) w żywności to dla następujących produktów: olejów i tłuszczów jadalnych – 10 µg/kg dla WWA4 i 2 µg/kg dla BaP; produktów mięsnych wędzonych, tkanki mięśniowej ryb wędzonych i skorupiaków – 12 µg/kg dla WWA4 i 2 µg/kg dla BaP; produktów dla dzieci – 1 µg/kg, zarówno dla WWA4, jak i BaP (15).

Analiza WWA w żywności

Główne problemy związane z analizą WWA w matrycach żywnościowych to: – trudna ekstrakcja z powodu występowania tych związków w śladowych ilościach w żywności (rzędu ppb lub ppt); – koekstrakcja razem z WWA wielu organicznych związków z matrycy żywnościowej, co przeszkadza w późniejszej separacji i identyfikacji WWA; – wzajemne strukturalne podobieństwo i obecność wielu izomerycznych form WWA, co czyni trudnym ich rozdział i identyfikację (16); – skomplikowana natura lipofilnych matryc żywności, wykazujących podobieństwo do WWA w zakresie właściwości fizykochemicznych (rozpuszczalność, masa molekularna itd.) (5).

Metodyka badań obejmuje ekstrakcję WWA z matrycy żywnościowej, następnie oczyszczenie ekstraktu od związków interferujących przy wykorzystaniu m.in. chromatografii preparatywnej (PLC) oraz jakościowe i ilościowe oznaczenie związków (7). Zasadnicze, podstawowe metody przygotowania próbki obejmują ekstrakcję przy użyciu aparatu Soxhleta, ekstrakcję do fazy stałej (w układzie ciecz-ciało stałe) z zastosowaniem sorbentów – najczęściej modyfikowanego żelu krzemionkowego (SPE) i ekstrakcję w układzie ciecz-ciecz (cykloheksan-woda, dimetyloformamid-woda) poprzedzoną zmydleniem (saponifikacją) metanolowym roztworem KOH lub kompleksowaniem kofeiną (5, 18). Następnie ma miejsce jedna lub więcej procedur oczyszczania (kolumna chromatograficzna, chromatografia cienkowarstwowa, chromatografia wykluczania (preparatywna chromatografia wykluczania sterycznego (SEC – size exclusion chromatography) (18). Te metody jednak są trudne, monotonne, czasochłonne i zużywają duże ilości rozpuszczalnika, a z powodu długiej i skomplikowanej procedury są niewygodne dla rutynowej analizy (5). Alternatywą dla tradycyjnego przygotowania próbki jest chromatografia cieczowa LC i off-line LC–LC umożliwiająca bezbłędną, dokładną analizę WWA w czasie krótszym niż 2 godz. Oprócz tego stosowana jest ekstrakcja z zastosowaniem rozpuszczalnika w fazie nadkrytycznej, która umożliwi przeprowadzenie obydwu procesów: ekstrakcji i oczyszczenia we wspólnym jednym etapie. Sprawniejsze jest także łączenie ze sobą technik takich jak LC–GC i LC–LC–GC (18).

Najczęściej stosowane metody analityczne do oznaczania karcynogennych WWA to wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) z selektywnym detektorem fluorescencyjnym (FLD) i wysokorozdzielcza chromatografia gazowa sprzężona z spektrometrią mas jako detektorem (GC-MS). Metoda GC-MS jest zwykle polecana kiedy związek chemiczny nie może być łatwo zidentyfikowany przez HPLC (5). Wcześniej często stosowanymi metodami były chromatografia cienkowarstwowa (TLC), HPLC z detektorem spektrofotometrycznym (UV) lub fotodiodowym (PDA) i GC z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID), ale obecnie z powodu ich gorszej selektywności i czułości zostały wyparte przez lepsze techniki (3). Jednym z ograniczeń detekcji monochromatycznej z użyciem jednej długości fali (UV) jest brak oznaczenia jednorodności piku i jakościowa analiza inna niż czas retencji (5).

Metody on-line upraszczają procedurę analizy WWA z powodu pominięcia kilku oddzielnych etapów przygotowania próbki. W metodzie on-line HPLC ekstrakt próbki jest nastrzykiwany na kolumnę chromatograficzną, która jest połączona on-line z kolumną analityczną w systemie HPLC-FLD (3). Analizę WWA metodą HPLC

prowadzi się w układzie faz odwróconych (RP), tzn. na niepolarnej fazie stacjonarnej. Ten typ chromatografii jest najbardziej odpowiedni do rozdzielania mieszaniny związków niepolarnych lub słabo polarnych na pojedyncze składniki (19). Dawniej używane fazy stacjonarne takie jak tlenek glinu i żel krzemionkowy zostały zastąpione fazami wiążącymi chemicznie. Obecnie najczęściej używane są odwrócone fazy takie jak ODS, gdzie niepolarną (hydrofobową) jest faza oktadecylosilanowa o 18 atomach węgla w łańcuchu (C18) (20). Fazy ruchome stanowią woda, acetonitryl i metanol oraz ich mieszaniny. Detektor rejestruje sygnał (np. absorpcja promieniowania), którego miarą jest wysokość (lub powierzchnia) piku chromatograficznego (19). W ostatnich latach metoda HPLC jest szeroko stosowana do oznaczania WWA w żywności. Główne jej zalety w analizie WWA to: bardzo dobra rozdzielczość dla separacji izomerów; wystarczająca czułość i specyficzność detektorów UVD i FLD; możliwość oszacowania wielkości cząsteczek WWA na podstawie czasu retencji z użyciem kolumny w odwróconym układzie faz (RP); możliwość oznaczenia związków z wysoką masą molekularną; brak ryzyka termicznego rozkładu (analiza prowadzona w temperaturze pokojowej) (19, 20).

Drugą metodą powszechnie stosowaną w analizie WWA w żywności stała się GC-MS m.in. z powodu dużej selektywności detektora MS, użycia widma masowego dla wiarygodnego potwierdzenia obecności WWA w próbce i możliwości używania jako wewnętrznych standardów – WWA znakowanych izotopem. W analizie wykorzystywana jest przeważnie pojedyncza kwadrupolowa spektrometria mas (MS), ale wzrasta popularność i częstość stosowania tandemowej spektrometrii mas (MS-MS), zapewniającej więcej specyficznych fragmentów mas (daughter ions), przez co zwiększa się specyficzność i czułość tej metody. Zaprogramowany temperaturowo układ nastrzykowy (PTV) zastosowany w GC umożliwia nastrzyk dużych objętości próbki i stąd są osiągnięte niskie limity detekcji dla WWA. Oznaczenie dużej ilości WWA w próbkach wymaga kolumn z wysoką wydajnością (3).

W analizie ilościowej i jakościowej WWA powszechnie używane są określone wewnętrzne standardy. Stanowią je wzorce węglowodorów analitycznych deuterowanych lub znakowanych izotopem ^{13}C . W większości metod GC-MS z powodu niestabilności wzorców deuterowanych są preferowane standardy WWA znakowane izotopem ^{13}C (3, 21). Duża zmienność wyników odnotowanych dla niektórych WWA w żywności może być rezultatem braku niektórych standardów, dlatego ciągle istnieje potrzeba stworzenia nowych znakowanych analogów różnych WWA takich jak: benzo(j)fluoranten, dibenzo(a,h)piren, dibenzo(a,l)piren, cyklopenta(cd)piren, 5-metylochryzen i benzo(c)fluoren. Poza tym na rynku są dostępne certyfikowane materiały referencyjne (CRMs) dla WWA używane do walidacji i oceny sprawności metody (3).

Chromatografia gazowa (GC) czy wysokosprawna chromatografia ciekłowa (HPLC) w analizie WWA?

W jednej z prac badawczych porównano ww. metody biorąc pod uwagę takie parametry jak: odzysk, jakość rozdziału, czas analizy, koszt wykonania (22). Prze-testowano statystycznie 35 par wyników (test t-studenta), spośród nich 25 nie różniło się znacząco w zakresie 95% poziomu ufności. Odchylenia standardowe pokazały

że powtarzalność obu metod była bardzo dobra, w granicach 10%. Obydwie metody wypadły dobrze, pozwoliły porównać dane w szerokim zakresie wartości (0,2–1000 µg/kg). Kapilarna GC posiadała znacznie wyższą zdolność rozdzielczą, zatem większa liczba WWA może być oznaczonych i rozdzielonych tą metodą. Finalnie jednak to HPLC była zdolna do rozdzielenia poszczególnych izomerów (BbF i BkF; Chr i Tph), zatem miała większą selektywność. Podsumowując, na efekt chromatograficznej analizy mają wpływ 3 elementy: zdolność rozdzielcza kolumny, wydajność kolumny i selektywność rozdzielenia separacji. GC ma wyższą wydajność kolumny zatem nadaje się do analizy złożonych mieszanin, zaś HPLC może często mieć wyższą selektywność kolumny, co jest bardziej przydatne dla rozdzielenia izomerycznych związków. Zatem obie metody wzajemnie się uzupełniają i są niezbędne do precyzyjnej i wiarygodnej analizy WWA (20).

Wykorzystanie metod HPLC i GC do analizy produktów żywnościowych

Wysokosprawną chromatografię cieczową z detekcją fluorescencyjną zastosowano do oznaczenia 8 WWA w oleju jadalnym i produktach wędzonych. Oznaczono zawartość WWA w 12 próbkach: oleju jadalnym, ziarnach rzepaku, mleku w proszku, białku i żółtku jaja kurzego, wędzonej kiełbasie, białym twarogu, szprotach. Przetestowano 3 metody jednoetapowego przygotowania próbki (usunięcie lipidów i innych wysokocząsteczkowych związków) takie jak: ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz, ekstrakcja do fazy stałej i SEC. Stwierdzono, że jednoetapowa procedura z udziałem dwóch z metod (ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz i ekstrakcja do fazy stałej), nie usuwa całkowicie lipidów. Wygodną i wydajną techniką oczyszczania WWA w żywności i matrycach roślinnych z tłuszczu okazała się SEC. Jako standard dla oznaczenia ilościowego użyto benzo(b)chryzenu. Liniowość krzywej kalibracyjnej była prawidłowa dla wszystkich WWA w zakresie stężeń od limitu detekcji (ok. 0,1 ppb) do 100 ppb. Powtarzalność (RSD, n=6) dla różnych WWA oscylowała w zakresie od 0,5 do 5% (5).

Metodą HPLC-FLD przebadano 9 typów popularnych malezyjskich, grillowanych dań mięsnych pod kątem zawartości toksycznych WWA takich jak: fluoranten, benzo(b)fluoranten i benzo(a)piren. Stwierdzono znaczące różnice ($p < 0,05$) w stężeniach WWA w zależności od sposobu grillowania mięsa (węgiel drzewny, gaz, piekarnik) w zakresie od 3,1 do 106 ng/g. We wszystkich próbkach był obecny fluoranten; najwyższą zawartość WWA uzyskano w szaszłykach wołowych, zaś najniższą w kurczaku grillowanym w piekarniku, o wartości odpowiednio: 132 ng/g i 3,51 ng/g (23).

Metodą HPLC-FLD zbadano obecność 7 WWA (benzo(a)antracen (BaA), chryzen (CRY), benzo(b)fluoranten (BbF), benzo(k)fluoranten (BkF), benzo(a)piren (BaP), dibenzo(a,h)antracen (DahA), benzo(g,h,i)perylene (BghiP)) w palonych ziarnach kawy z rynku koreańskiego. Przygotowanie próbki obejmowało zmydlenie roztworem KOH, ekstrakcję w układzie ciecz-ciecz, ekstrakcję do fazy stałej (SPE). Uzyskane limity detekcji i oznaczenia ilościowego dla 7 WWA oscylowały w zakresie odpowiednio od 0,016 do 0,497 i od 0,054 do 1,656 µg/kg. Stężenie WWA w 10 próbkach kawy wahało się od $0,62 \pm 0,08$ do $53,25 \pm 9,38$ µg/kg. We wszystkich próbkach BaP był obecny w ilości dopuszczalnej dla człowieka (24).

Za pomocą techniki HPLC/FLD określono poziom zanieczyszczenia benzo(a)pirenem wybranych rynkowych przetworów mięsnych poddanych tradycyjnej metodzie wędzenia. Przygotowanie próbek do oznaczenia benzo(a)pirenu obejmowało ekstrakcję frakcji lipidowej, a następnie wydzielenie węglowodorów z tłuszczu za pomocą chromatografii wykluczania (SEC). Spośród przebadanych wędzonych przetworów mięsnych aż 98% prób odznaczało się zawartością benzo(a)pirenu poniżej prawnie dopuszczalnej (5,0 µg/kg) wartości w tego rodzaju żywności, co wskazuje m.in. na prawidłowo realizowany proces wędzenia (1).

Wydajną i selektywną analityczną metodę opracowano dla oznaczenia ilościowego 19 WWA w żywności i oleju. Połączenie selektywnej ekstrakcji i następującej po niej procedury oczyszczania (ekstrakcja do fazy stałej – SPE) z użyciem układu polistyren-diwinylbenzen pozwoliło na otrzymanie wysoce czystego analitu. Identyfikacja i oznaczenie zostały przeprowadzone z użyciem GC–MS/MS wykorzystując WWA znakowane ¹³C. Zaletą GC–MS/MS w porównaniu do innych metod detekcji jest wysoka czułość i selektywność. Uzyskany limit detekcji dla WWA w żywności wahał się między 0,008 i 0,15 g/kg, zaś limit oznaczenia ilościowego między 0,025 i 0,915 g/kg. Krzywa kalibracyjna wykazała dobrą liniowość dla wszystkich WWA ($R^2 > 0,99$) (21).

Metodą HPLC/FLD oznaczono 15 WWA w próbkach mielonej pszenicy, gotowych płatków zbożowych, mleka w proszku, słoju, szpinaku i oleju do smażenia. Wyniki pokazały, że partia otrębów mielonej pszenicy, podobnie jak gotowe płatki wykazywały znacznie wyższą zawartość WWA niż inne partie próbek lub produkty końcowe. Wykryto, że użycie bezpośredniego ogrzewania do wysuszenia mleka w proszku i słoju w niektórych przypadkach prowadzi do podwyższenia poziomu WWA i korelowało to z poziomem obecnych nitrozamin. Trzy próbki szpinaku miały bardzo niski poziom WWA. Niską zawartość karcynogennych WWA (rzędu kilku µg/kg) odnotowano także dla dwóch spośród trzech różnych typów oleju do smażenia (25).

Techniką GC–MS oznaczono stężenie 16 WWA w 18 próbkach chleba pieczonego z białej i brązowej mąki pszennej. Analizę przeprowadzono po uprzedniej ekstrakcji WWA aparatem Soxhleta. W 10 na 18 próbek nie wykryto obecności B(a)P, natomiast w pozostałych jego poziom był różnicowany od 2,83 do 16,54 µg/kg. Stężenia B(a)A, CHR, B(b)FA, B(k)FA, IP, DB(a,h)A, i B(ghi)P były mniejsze niż 10,0 µg/kg. Benzo(a)piren nie został wykryty w białej i brązowej mące użytej do wytworzenia chleba. Całkowita zawartość WWA wahała się w granicach 1,06–44,24 µg/kg i 3,08–278,66 µg/kg, odpowiednio dla ciężkich WWA i lekkich WWA. Odtwarzalność i powtarzalność zaproponowanej metody zostały obliczone i przedstawione z punktu widzenia odzysku i względnych odchyłeń standardowych. Uzyskane wyniki wahały się od 72,46 do 99,06% z RSD ±0,28–15,01% i od 2,39 do 95,01% z RSD±1,91–13,01%, odpowiednio dla powtarzalności i odtwarzalności (26).

Technika HPLC/FLD została wykorzystana do oznaczenia 16 WWA w filetach rybnych. próbki analizowano pod kątem zawartości takich WWA jak: naftalen (Nap), acenaftylen (Acy), acenaften (Ace), fluoren (Flu), fenantren (Phe), antracen (Ant), fluoranten (Fln), piren (Pyr), 1,2-ben(a)antracen (BaA), chryzen (Chr), benzo(e)piren (BeP), benzo(e)acenaftylen (BeA), benzo(k)fluoranten (BkF), dibenz(a,h)antracen (DahA), benzo(g,h,i)perylene (Bghi)P i indeno(1,2,3-cd)piren (InP). Metoda obej-

mowała szybką, łatwą, tanią, efektywną i bezpieczną (QuEChERS) wielosadową procedurę przygotowania próbek. Anality były rozdzielane na kolumnie HPLC Agilent ZORBAX Eclipse PAH (4,6 mm × 50 mm, 1,8 μm) przez gradient elucji w podwójnym układzie acetonitryl-woda, zaś późniejsza detekcja fluorescencyjna odbyła się przy odpowiedniej dla wzbudzenia i emisji długości fali. Odzysk wahał się od 83,4 do 101% z względnym odchyleniem standardowym od 0,6 do 1,9%. Limit detekcji i oznaczenia ilościowego oscylowały odpowiednio od 0,04 do 0,84 i od 0,1 do 2,8 ng/g (27).

Chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC-MS) zastosowano do oznaczenia zawartości 19 WWA w wybranych popularnych gatunkach handlowych herbaty zielonej, czerwonej i czarnej. Odnotowano zbliżone profile jakościowe WWA z bardzo wysokim udziałem lekkich WWA w zanieczyszczeniu analizowanych herbat. W badanych herbatach nie wykryto obecności benzo(a)pirenu oraz związków zaliczanych do najbardziej karcynogennych WWA, a więc dibenzopirenow. Wykazano natomiast istotne zróżnicowanie poziomów zawartości 19 WWA między różnymi gatunkami handlowymi herbat. Stwierdzono niski poziom zanieczyszczenia herbat przez WWA zwłaszcza z grupy poliarenow, wśród których około 63 do 92% całkowitej zawartości WWA stanowiły cztery lekkie WWA (17).

Metodą GC/MS oznaczano 10 WWA (w tym 6 karcynogennych WWA) w wędzonych produktach mięsnych i płynach wędzarniczych. Krzywa kalibracji wykazała dobrą liniowość dla wszystkich WWA w zakresie stężeń 0,01–10,000 ppb, powtarzalność (RSDs, n=6) dla różnych WWA oscylowała od 3 do 12% (28).

Podsumowanie

W przeciągu ostatnich kilkunastu lat udało się przeprowadzić wiele badań jakościowych i ilościowych WWA w różnych produktach żywnościowych. Najpowszechniej stosowane metody to wzajemnie uzupełniające się HPLC-FLD i GC-MS, które są wysoce specyficzne i czułe. Mimo to, tego typu analizy nadal stwarzają wiele problemów, szczególnie na etapie przygotowania próbek. Dlatego konieczne są dalsze badania mające na celu udoskonalenie obecnych metod oraz ich parametrów technicznych.

M. Słowianek, J. Leszczyńska

POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN FOOD –
LEGAL AND ANALYTICAL ASPECTS

PIŚMIENNICTWO

1. Kubiak M.S., Polak M., Siekierko U.: Zawartość B(a)P w rynkowych przetworach mięsnych. *Ż. N. T. J.*, 2011; 3(76): 120-129. – 2. Sharma R.K., Hajaligol M.R.: Effect of pyrolysis condition on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from polyphenolic compounds. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.*, 2003; 66: 123-144. – 3. EFSA: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question N° EFSA-Q-2007-136) Adopted on 9 June 2008. *The EFSA Journal*, 2008; 724: 1-114. – 4. Łozowicka B.: Zanieczyszczenia chemiczne w żywno-

ści pochodzenia roślinnego. Post. Ochr. Roślin, 2009; 49(4): 2071-2080. – 5. *Wegrzyn E., Grzeskiewicz S., Poplawska W., Glód B.K.*: Modified analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons, using SEC for sample preparation and RP-HPLC with fluorescence detection. Application to different food samples. Acta Chromatogr., 2006; 17: 233-249. – 6. *Ciecierska M., Obiedziński M.*: Występowanie WWA w preparatach do początkowego i dalszego żywienia niemowląt oraz w żywności dla małych dzieci w odniesieniu do wymagań prawa żywnościowego Unii Europejskiej. Ż. N. T. J., 2009; 1(62): 37-45. – 7. FSA (Food Standard Agency): Polycyclic aromatic hydrocarbons in cereals, cereal products, vegetables, vegetable products and traditionally smoked foods. Food Survey Information Sheet, 2012; 1: 1-52. – 8. *Smolik E.*: Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, Sosnowiec. – 9. IARC: Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. In A Review of Human Carcinogens: Chemical Agents and Related Occupations (Vol. 100F). 2012, Lyon, France. – 10. WHO (World Health Organization): Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2005, Rome.

11. *Ciemniak A., Witczak A.*: Zmiany zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) podczas przechowywania konserw ze szprota w oleju. Bromat. Chem. Toksykol., 2010; 43(1): 86-92. – 12. European Commission Regulation No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels of certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union, 2006; L364/5. – 13. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 333/2007 z dnia 28 marca 2007 r. ustanawiające metody pobierania próbek i metody analiz do celów urzędowej kontroli poziomów ołowiu, kadmu, rtęci, cyny nieorganicznej, 3-MCPD i benzo(a)pirenu w środkach spożywczych. Dz. Urz. UE., 2007; L 88/29. – 14. EFSA: Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. The EFSA Journal, 2008; 724: 1-114. – 15. Commission Regulation (EU) No. 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. Official Journal of the European Union, 2011; L 215/4-7. – 16. *Chen B.H., Wang C.Y., Chiu C.P.*: Evaluation of Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Meat Products by Liquid Chromatography. J. Agric. Food Chem., 1996; 44: 2244-2251. – 17. *Ciecierska M., Obiedziński M.*: Oznaczenie zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w herbatach liściastych metodą GC-MS. Bromat. Chem. Toksykol., 2009; 42(2): 182-188. – 18. *Moret S., Conte L.S.*: Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. J. Chromatogr. A, 2000; 882: 245-253. – 19. *Kumirska J., Golebiowski M., Paszkiewicz M., Bychowska A.*: Analiza żywności – skrypt z ochrony środowiska. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, 2010; 65-67. – 20. *Simko P.*: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. J. Chromatogr. B, 2002; 770: 3-18.

21. *Veyrand B., Brosseau A., Sarcher L., Varlet V., Monteau F., Marchand P., Andre F., Le Bizec B.*: Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach. J. Chromatogr. A, 2007; 1149: 333-344. – 22. *Dennis M. J., Massey R.C., McWeeny D. J., Larsson B., Eriksson A., Sahlberg G.*: Comparison of a capillary gas chromatographic and a high-performance liquid chromatographic method of analysis for polycyclic aromatic hydrocarbons in food. J. Chromatogr., 1984; 285(1): 127-133. – 23. *Farhadian A., Jinap S., Abas F., Sakar Z.I.*: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat. Food Control, 2010; 21: 606-610. – 24. *Kyueun Lee K., Shin H.S.*: Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Commercial Roasted Coffee Beans. Food Sci. Biotechnol., 2010; 19(6): 1435-1440. – 25. *Lawrence J.F., Weber D.F.*: Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Canadian Samples of Processed Vegetable and Dairy Products by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. J. Agric. Food Chem., 1984; 32: 794-797. – 26. *Al-Rashdan A., Helaleh M.I.H., Nisar A., Ibtisam A., Al-Ballam Z.*: Determination of the Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Toasted Bread Using Gas Chromatography Mass Spectrometry. Int. J. Anal. Chem., 2010; 2010: 1-8. – 27. *Pulle B.O., Mmualefe L.C., Torto N.*: Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in fish with Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC Kit and HPLC-FLD. Agilent Technologies, 2012; 1-8. – 28. *Jira W.*: A GC/MS method for the determination of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in smoked meat products and liquid smokes. Eur. Food Res. Technol., 2004; 218: 208-212.