

*Dorota Kowalska, Eliza Gruczyńska, Mariola Kozłowska,
Katarzyna Tarnowska, Bolesław Kowalski*

3-CHLOROPROPAN-1,2-DIOL I 2-CHLOROPROPAN-1,3-DIOL W SOSACH SOJOWYCH I HYDROLIZOWANYCH BIAŁKACH ROŚLINNYCH DOSTĘPNYCH NA RYNKU KRAJOWYM

Katedra Chemii Wydziału Nauk o Żywności
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. *E. Białecka-Florjańczyk*

Oznaczano zawartość 3- i 2-monochloropropandiolu (3-MCPD i 2-MCPD) oraz kwasu lewulinowego w sosach sojowych kupowanych w lokalnej sieci handlu detalicznego oraz w hydrolizatach białek roślinnych (HVP) z hurtowni i od prywatnych importerów w latach 2012–2016. Wyniki wskazały na obecność obydwu chloropochodnych w każdej próbce HVP (3-MCPD 168,1 µg/kg – 1210,0 µg/kg, 2-MCPD 12,2 µg/kg – 96,8 µg/kg) i 3-MCPD w 29 próbkach sosów sojowych (5,8 µg/kg – 25,6 µg/kg). 3 próbki sosu sojowego zawierające (23,0 µg/kg – 25,6 µg/kg) wykazały przekroczenie dopuszczalnej przepisami zawartości (20 µg/kg) 3-MCPD. Stwierdzono 100% zgodność występowania kwasu lewulinowego i 3-MCPD w HVP i sosach sojowych

Hasła kluczowe: sos sojowy, 3-monochloropropan-1,2-diol, 2-monochloropropan-1,3-diol, kwasowo hydrolizowane białka roślinne.

Key words: soy sauce, 3-monochloropropane-1,2-diol, 2-monochloropropane-1,3-diol, acid hydrolysed vegetable proteins.

Sosy sojowe od wieków produkowane w krajach Wschodniej Azji: Shoyu, Tamaru Shoyu (Japonia), Jiang You (Chiny), Ketjap/Kecap (Indonezja), Kicap (Malezja), Kanhang/Ganjang (Korea), Toyo (Filipiny), Si-iw (Tajlandia), Nuoc tuong, Xi dau (Wietnam) posiadające ostry i słony smak stanowią jedną z ważniejszych przypraw stosowanych w wymienionych krajach w produkcji żywności i użytku domowym (1–5). Skład sosów sojowych i ich walory smakowo-zapachowe zależą od technologii produkcji (technologia fermentacyjna lub kwasowa hydroliza białek roślinnych). Obok związków chemicznych kształtujących te walory sosy sojowe mogą zawierać potencjalnie rakotwórcze i zaburzące układ reprodukcyjny chloropochodne propanolu. W Rozporządzeniu Numer 1881/2006 przyjętym 19 grudnia 2006 roku przez Komisję Kodyfikacyjną UE ustanowiono tzw. Dopuszczalne Dienne Spożycie 3-MCPD w HVP (Hydrolyzed Vegetable Proteins) lub sosie sojowym na poziomie 2 µg/kg masy ciała konsumenta. Podano, że maksymalna dopuszczalna zawartość 3-MCPD w HVP i w sosie sojowym, może wynosić do 20 µg/kg. Określony limit zawartości 3-MCPD został wyznaczony przy założeniu, że ciekły produkt zawiera 40% suchej masy, co odpowiada zawartości w niej 3-MCPD maksymalnie 50 µg/kg (6).

W przepisach krajowych dopuszczalną zawartość 3-MCPD w HVP i sosie sojowym reguluje Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 stycznia 2003 (Dz.U. z dnia 4 marca 2003, Nr 37, poz. 326). Załącznik nr 5 do w/w Rozporządzenia podaje:

„Maksymalne poziomy zanieczyszczeń 3-monochloropropan-1,2-diolem (3-MCPD)

- | | |
|----------------------------------|------------|
| 1) Hydrolizowane białko roślinne | 0,02 mg/kg |
| 2) Sos sojowy | 0,02 mg/kg |

Maksymalny dopuszczalny poziom 3-MCPD podano dla produktów płynnych zawierających 40% suchej masy, co odpowiada maksymalnemu poziomowi 0,05 mg/kg produktu w przeliczeniu na suchą masę. Poziom dopuszczalny należy obliczać w zależności od zawartości suchej masy w rozpatrywanym produkcie”. HVP i sosy sojowe są jak dotąd jedynymi produktami spożywczymi objętymi regulacjami UE dotyczącymi zawartości 3-MCP.

Liczne informacje o obecności chloropropanoli, chloropropanodioli, glicydolu oraz estrów tych związków z kwasami tłuszczowymi w różnych produktach spożywczych doprowadziło do wydania przez Komisję Europejską Zalecenia z dnia 10 września 2014 r. w sprawie monitorowania występowania w żywności 2- i 3-MCPD, ich estrów z kwasami tłuszczowymi oraz glicydolu i jego estrów (7).

Według szacunków z 2015 roku (8) roczna światowa produkcja sosu sojowego wynosi około 10 mld litrów. Konsumpcja sosu sojowego w przeliczeniu na mieszkańca wynosi rocznie w USA 0,8 litra a w Japonii 9 litrów. Szacuje się, że dzienna konsumpcja sosu sojowego w Chinach wynosi 9 mililitrów na osobę.

W 2011 roku głównymi eksporterami sosu sojowego były Chiny (94143 tony) i Holandia (34673 tony), a głównymi importerami USA (59298 ton), Hong Kong (22519 ton) i Wielka Brytania (19576 ton) (8). W ostatnich latach obserwowana jest znacząca ekspansja tego produktu na rynki europejskie w tym także na rynek polski. W tej sytuacji potrzeba monitorowania zawartości 2- i 3-MCPD w handlowych sosach sojowych nabiera znaczenia.

MATERIAŁ I METODY

Sosy sojowe i preparaty HVP

Sosy sojowe kupowano w krajowych sklepach wielkopowierzchniowych. Próbkę HVP otrzymywano z hurtowni i od prywatnych importerów. W specyfikacjach towarowych i etykietach opakowań handlowych podawane są tylko podstawowe informacje jakościowe dotyczące składu (nasiona soi, mąka pszenna, woda) oraz wybrane parametry ilościowe (wartość energetyczna, zawartości białka, węglowodanów, tłuszczu, zawartość soli i wartości pH). Dla żadnego produktu nie podawano zawartości chloropochodnych propanoli i propanodioli oraz kwasu lewulinowego (4-oksowalerianowego, 4-oksopentanowego).

Wzorce, odczynniki i rozpuszczalniki:

2- i 3-MCPD oraz ich estry z kwasem stearynowym, standard wewnętrzny 3-MCPD-d5, 3-bromopropan-1,2-diol (3-MBPD), kwas fenyloborowy PBA, di-

-palmitoilo-3-chloropropano-1,2-diol, kwas 4-oksowalerianowy (lewulinowy), heksan-1,6-diol otrzymano z Sigma-Aldrich, USA. Rozpuszczalniki i sole o czystości analitycznej pochodziły od dostawców zagranicznych (Merck) i krajowych. Roztwory do oznaczeń chloropropanodioli przygotowywano w laboratorium zgodnie z (9, 10), a do oznaczeń kwasu lewulinowego zgodnie z (11).

Oznaczenie 3-MCPD i 2-MCPD

Postępowanie analityczne oparto o metodę *Kuhlmana*. *Kuhlman* opisał i przeprowadził walidację z użyciem di-palmitoilo-3-chloropropano-1,2-diolu metodą równoległego oznaczania w oleju roślinnym wolnych i estrowo związanych 3- i 2-MCPD oraz 2,3-epoksy-1-propanolu (glicydolu) (9). Metoda ta (znana jako metoda *Kuhlmana* lub metoda SGS, a w środowisku analityków żywności nazywana metodą „3 w 1”) polega na ulepszeniu alkalicznego (MeONa/MeOH) sposobu uwalniania wolnego glicydolu i chloropropanodioli z ich estrów, a następnie przekształcania glicydolu w monobromopropanodiol (MBPD). Po derywatywacji z PBA otrzymane pochodne MBPD, 3- i 2-MCPD są oznaczane metodą GC-MS z wykorzystaniem izotopowo znakowanych wzorców analitycznych.

Próbki HVP i sosów sojowych do momentu derywatywacji przygotowywano według (9, 10).

Oznaczenie 3- i 2-MCPD prowadzono metodą chromatografii gazowej (GC/MS) wg. *Kuhlmana* (9). Oznaczenia wykonywano po odłuszczeniu próbek, ekstrakcji MCPD i ich estrów, transestryfikacji katalizowanej CH_3ONa i otrzymaniu pochodnych 3- i 2-monochloropropanodioli w reakcji z kwasem fenylborowym PBA. Stosując deuterowany wzorec analityczny (3-MCPD-d5 standard wewnętrzny) oznaczono dolne granice wykrywalności (LoD; 2,5 mg/kg) i ilościowego oznaczania (LoQ; 3,5 mg/kg) oraz wartości odzysku analitu (96–104%). W niniejszej pracy oznaczano tylko 3- i 2-MCPD, nieznaczne zawartości glicydolu były do pominięcia.

Kwas lewulinowy w HVP i sosach sojowych oznaczano wg. metody opisaną przez *Wanga* i wsp. (11). Mililitr sosu sojowego umieszczano w zamykanej kolbce dodawano 1 ml 0,5% standardu wewnętrznego (0,5% roztwór heksan-1,6-diolu) i rozcieńczano do 10 ml oraz starannie mieszano. 0,1 μl roztworu podawano bezpośrednio na chromatograf Hewlett Packard wyposażony w detektor FID i kolumnę CP-Wax Chrompack, 30 m \times 0,53 mm, grubość filmu 1 μm . Przepływy gazów wynosiły: wodór 30 ml/min, powietrze 300 ml/min, hel 4 ml/min. Program temperatury 150°C przez 2 min \rightarrow 220°C w 8 min \rightarrow 250°C z szybkością 50°C/min.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki oznaczeń 3- i 2-MCPD oraz kwasu lewulinowego w HVP i sosach sojowych pozyskiwanych w okresie czerwiec 2012 – styczeń 2016 zestawiono w tabeli I.

Każda próbka HVP zawierała 3-MCPD w ilościach znacznie przekraczających dopuszczalny limit oraz znaczące ilości 2-MCPD (12,2–96,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i kwasu lewulinowego (9,7–32,6 mg/kg).

Tab e l a 1. 3- i 2-chloro-1,2-propanodiole (3-MCPD i 2-MCPD) i kwas lewulinowy (4-okso-pentanowy) w kwaso-
wo hydrolizowanych białkach roślinnych (HVP) i sosach sojowych.

Tab l e 1. 3- and 2-chloropropane-1,2-diols (3-MCPD and 2-MCPD) and levulinic acid (4-okso-pentanoic acid)
in acid hydrolyzed vegetable proteins (HVP) and soy sauces.

Produkt	n/n*/n**	3-MCPD, μg/kg	2-MCPD, μg/kg	kwas lewulinowy, mg/kg
HVP 2012	3/3/3	438,2 – 1210,0	39,1 – 96,8	27,3 – 32,6
HVP 2013	2/2/2	236,7 – 812,1	18,3 – 79,1	22,4 – 27,9
HVP 2014	3/3/3	168,1 – 418,3	12,2 – 36,4	9,7 – 17,3
HVP 2015	3/3/3	248,7 – 638,9	17,9 – 70,7	22,4 – 25,6
HVP 2016	1/1/1	386,8	22,3	23,0
Sos sojowy 2012	3/3/1	14,6 – 23,0	n.d.	9,0 – 12,1
Sos sojowy 2013	8/8/2	6,3 – 25,6	n.d. – 4,9	8,1 – 12,3
Sos sojowy 2014	8/2/0	< LoQ – 5,8	n.d.	5,1 – 7,2
Sos sojowy 2015	8/8/0	6,1 – 16,2	4,3 – 5,0	8,1 – 9,9
Sos sojowy 2016	2/2/0	5,9 – 7,2	n.d.	7,9 – 8,3

n = liczba próbek/number of samples, n* = próbki zawierające 3-MCPD powyżej granicy wykrywalności (LoD)/
samples containing 3-MCPD above LoD, n** = próbki zawierające powyżej 20 μg/kg 3-MCPD/samples containing
more than 20 μg/kg 3-MCPD, LoQ = 4 μg/kg – dolna granica ilościowego oznaczania 3-MCPD/low limit of 3-MCPD
quantification, n.d. = nie wykryto/not detected.

Wszystkie z 29 próbek sosu sojowego zawierały 3-MCPD, ale tylko 3 z nich (10%) zawierało 3-MCPD w ilości większej niż dopuszczalny przepisami limit (20 μg/kg). Zawartość kwasu lewulinowego w sosach sojowych mieściła się w granicach 5,1–12,3 mg/kg. Stwierdzono 100% zgodność występowania 3-MCPD i kwasu lewulinowego w badanych HVP i sosach sojowych. Ilościowe obecności 3-MCPD w badanych sosach sojowych są zgodne z podawanymi przez *Gawarską* i wsp. (10) i przez *Christową-Bagdasarian* i wsp. (12), które w swoich badaniach zawartości 3-MCPD w sosach sojowych użyły także sosy pozyskane w Polsce.

WNIOSKI

1. Uzyskane wyniki i naukowe informacje literaturowe dotyczące zawartości 3-MCPD i związków pokrewnych w sosach sojowych konfrontowane ze zwyczajami żywieniowymi konsumentów nie powinny powodować obaw bezpośredniego zagrożenia zdrowotnego.

2. Analitycznego nadzoru wymagają sprowadzane kwasowe hydrolizaty białek roślinnych.

D. Kowalska, E. Gruczyńska, M. Kozłowska,
K. Tarnowska, B. Kowalski

3-CHLOROPROPANE-1,2-DIOL AND 2-CHLOROPROPANE-1,3-DIOL IN SOY SAUCES
AND HYDROLYZED VEGETABLE PROTEINS FROM INTERNAL RETAIL MARKET

Summary

3- and 2-MCPD and levulinic acid contents were determined by GC in hydrolyzed vegetable proteins (HVP) and soy sauces from local retail market in the years 2012–2016. The results showed that both 3-MCPD and 2-MCPD were present (168,1–1210 µg/kg and 12,2–96,8 µg/kg) in each sample of HVP and 3-MCPD (5,8–25,6 µg/kg) in 29 samples of soy sauces. Only 3 samples of soy sauces contained more 3-MCPD (23,0–25,6 µg/kg) than it is allowable by law regulations. The 100% agreements between parallel presence of 3-MCPD and levulinic acid in HVP and soy sauces have been found.

PIŚMIENNICTWO

1. *Fukushima D.*: Industrialization of fermented soy sauce production centering about Japanese Shoyu. Chapter 1, pp.1-78. In: *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*. Ed. K.H. Steinkraus; Marcel Dekker Inc., Second Edition, 2004; pp. 1-792. – 2. *Fukutome N.*: Soy sauces of Asia; Korea's use of ganjang. *Food Culture* 2014; 24, 14-25. – 3. *Fukutome N.*: Soy sauces of Asia; Soy sauce usage in the Philippines, Thailand and Vietnam. *Food Culture* 2015; 25, 14-21. – 4. *Shurtleff W., Aoyagi A.*: History of soy sauce (160 CE to 2012). Soyinfo Center, 2012, pp. 1-2523. – 5. *Tachi H.*: Characteristics of Japanese soy sauce. *Food Culture* 2015; 25, 3-4. – 6. Rozporządzenie Komisji UE nr 1881/2006 r. Ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych (Dz.U. L 364 z 20.12.2006 s. 5). – 7. Zalecenie Komisji UE z dnia 10 września 2014 r. W sprawie monitorowania występowania w żywności 2- i 3-monochloropropano-1,2-diolu, estrów kwasów tłuszczowych 2- i 3-MCPD oraz estrów glicydowych kwasów tłuszczowych. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej. L 271/93. (2014/661/UE). – 8. *Lee B.Q., Khor S.M.*: 3-Chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in soy sauce: A Review on the formation, reduction and detection of this potential carcinogen. *Compr. Revs. Food Sci. Food Safety* 2015; 14, 48-66. – 9. *Kuhlman J.*: Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. *Eur.J.Lipid Sci.Technol.* 2011; 113, 335-344. – 10. *Gawarska H., Sawilska-Rautenstrauch D., Karłowski K., Jędra M., Starski A.* Zawartość 3-MCPD w sosach sojowych, hydrolizatach białek roślinnych i produktach spożywczych z ich udziałem. *Bromat. Chem. Toksyko.* 2008; XLI (3), 829-834.

11. *Wang M-L., Lin H-J., Lee M-H., Choong Y-M.*: A rapid method for direct determination of levulinic acid in soy sauce. *J. Food Drug Analysis* 1999; 7 (2), 143-152. – 12. *Christova-Bagdasarian V., Tishkova J.A., Vrabcheva T.M.*: 3-Monochloro-1,2-propandiol (3-MCPD) in soy sauce from the Bulgarian market. *Food Additiv. Contaminants. Part B.* 2013; 6, 163-167.

Adres: 02-787 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159 C.