

Marta Ciecierska, Mieczysław Obiedziński

OZNACZENIE ZAWARTOŚCI WIELOPIERŚCIENIOWYCH WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH W HERBATACH LIŚCIASTYCH METODĄ GC-MS*)

Zakład Oceny Jakości Żywności Wydziału Nauk o Żywności
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. *M. Obiedziński*

Oznaczono zawartość 19 WWA w wybranych popularnych gatunkach handlowych herbaty zielonej, czerwonej i czarnej, za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Zaobserwowano zbliżone profile jakościowe WWA z bardzo wysokim udziałem lekkich WWA w sumarycznej zawartości tych związków. W analizowanych herbatach nie stwierdzono obecności benzo(a)pirenu oraz związków zaliczanych do najbardziej kancerogennych WWA, a więc dibenzopirenow.

Hasła kluczowe: wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), herbaty liściaste, analiza GC-MS.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), leaf teas, GC-MS analysis.

Obecny stan wiedzy wskazujący na genotoksyczne, mutagenne i kancerogenne właściwości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych powoduje, że związki te budzą zainteresowanie szerokiego spektrum nauk. Dotychczas w badaniach żywności podejmowano się oznaczania 16 WWA wg listy EPA (Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska) (1). Jednakże 4 grudnia 2002 r. Komitet Naukowy ds. Zanieczyszczeń Żywności Europejskiej Agencji Bezpieczeństwa Żywności Unii Europejskiej w opinii na temat WWA przedstawił listę 15 WWA – potencjalnie rakotwórczych i toksycznych związków od 16 WWA wg EPA (2). Obecnie zatem wg zalecenia Komisji Europejskiej z dnia 4 lutego 2005 r. (3) istnieje potrzeba badań nad poziomami benzo(a)pirenu oraz pozostałych związków należących do 15 WWA wytypowanych przez Komitet Naukowy ds. Żywności UE w produktach spożywczych.

Od wielu lat liczne doniesienia wskazują na prozdrowotne właściwości herbaty. Dowodzą one, iż regularne picie herbaty zapobiega schorzeniom nowotworowym oraz spowalnia proces starzenia, zmniejsza ryzyko chorób układu krążenia, przeciwdziała nadciśnieniu, jak również obniża poziom cholesterolu. Wykazano także, iż herbata oprócz właściwości przeciwbakteryjnych posiada również właściwości przeciwwirusowe oraz przeciwwrzodowe (4, 5, 6, 7, 8). W surowcach rolno-spożywczych, a więc również w herbatach liściastych mogą jednakże występować

*) Praca finansowana ze środków grantu KBN nr 501 0928 00 29.

substancje niepożądane, w tym wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, które stanowią zagrożenie dla zdrowia człowieka. Związki te, to wszechobecne zanieczyszczenia atmosferyczne pochodzenia przemysłowego i antropogenicznego. Skondensowane na cząsteczkach pyłów unoszących się w powietrzu mogą osadzać się na powierzchni roślin oraz surowców rolnych lub w postaci par wnikać do ich wnętrza podczas respiracji (9, 10). Uważa się, iż cechujące się dużą powierzchnią liście herbaty mogą determinować jej wysoki poziom zanieczyszczenia poliarena-ami, bowiem powierzchnia liści ekspozycyjnych na depozyt WWA istotnie wpływa na efektywność zatrzymywania pyłu przenoszącego te związki. W przypadku herbat powszechnie sądzi się, iż ich zanieczyszczenie poliarena-ami może być zarówno konsekwencją środowiskowego skażenia materiału roślinnego, jak i procesów obróbki surowca, a więc suszenia czy też prażenia niektórych ich rodzajów (11, 12, 13, 14).

Uwzględniając fakt, iż poliareny występują w produktach rolno-spożywczych jako złożone mieszaniny tzw. lekkich oraz ciężkich WWA, celem pracy było oznaczenie zawartości 19 WWA, w tym 4 związków z grupy tzw. lekkich WWA (z listy 16 WWA wg EPA) oraz 15 WWA (wytypowanych do badań przez Komitet Naukowy UE) przy wykorzystaniu metody GC-MS w wybranych rodzajach herbat liściastych dostępnych na rynku.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły popularne gatunki handlowe herbat liściastych: zielonej (Sencha, Nepal, Gunpowder), czerwonej (Oolong, Pu Erh Superior, Pu Erh) oraz czarnej (Golden Yunnan, Assam, Ceylon), jak również herbata czarna wędzona Lapsang, zakupione na rynku warszawskim. Badaniom poddano po trzy próbki każdego rodzaju herbaty. Każdą z trzech próbek tego samego rodzaju analizowano w trzech powtórzeniach.

Metodyka badań obejmowała ekstrakcję WWA z matrycy żywnościowej, następnie oczyszczenie ekstraktu od związków interferujących przy wykorzystaniu chromatografii preparatywnej (GPC) oraz jakościowe i ilościowe oznaczenie związków techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS).

W tym celu naważkę liści herbacianych zalewano 100 cm³ mieszaniny heksan/aceton (60/40, v/v) oraz umieszczano w łaźni ultradźwiękowej (30 min.). Uzyskany ekstrakt po przefiltrowaniu zagęszczano do kropli rozpuszczalnika przy wykorzystaniu wyparki obrotowej Büchi, a następnie rozpuszczano w mieszaninie cykloheksan/octan etylu (50/50, v/v). W celu oddzielenia frakcji WWA od związków interferujących zastosowano kolumnę do chromatografii żelowej TSK Gel G1000HXL, 300 × 7,8 mm, 5 µm. Do rozdzielania wprowadzano 1 cm³ uprzednio przygotowanej mieszaniny. Rozdział prowadzono metodą izokratyczną przy przepływie 0,8 cm³/min., a fazę ruchomą stanowiła mieszanina cykloheksan/octan etylu (50/50, v/v). Zastosowano detektor UV-VIS, dł. fali 254 nm. Zebraną frakcję WWA po zagęszczeniu oraz rozpuszczeniu w 100 mm³ toluenu poddano analizie metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas przy użyciu aparatu GCMS-QP 2010 firmy Shimadzu, składającego się z chromatografu gazowego GC-2010, spektrometru masowego GCMS-QP 2010, autoindżektora AOC-20i oraz programu do zbierania i przetwarzania danych GCMS Solution. Rozdział prowadzono z zastosowaniem

kolumny chromatograficznej ZB-5ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) Zebron, firmy Phenomenex. Temperatura komory nastrzykowej wynosiła 265°C, tryb indzeksji bezdzielnikowy. Temperatura pracy kolumny: początkowa 92°C przez 1,5 min., następnie wzrost temp. z szybkością 15°C/min. do 140°C, utrzymywanie w tej temp. przez 1 min., ponowny wzrost temp. z szybkością 5°C/min. do 315°C i izoterma końcowa przez 5 min. Gazem nośnym był hel, a jego przepływ wynosił 0,74 cm³/min. Stosowano następujące warunki pracy spektrometru masowego: temperatura źródła jonów 230°C, temp. łącza GC-MS (linii transferowej) 270°C, widma masowe przemiatane w zakresie masowym m/z 100–400 przy zastosowaniu energii jonizacji wynoszącej 70 eV, napięcie detektora 1,5 kV. Analiza WWA przebiegała w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM), dobierając selektywne jony charakterystyczne dla poszczególnych WWA.

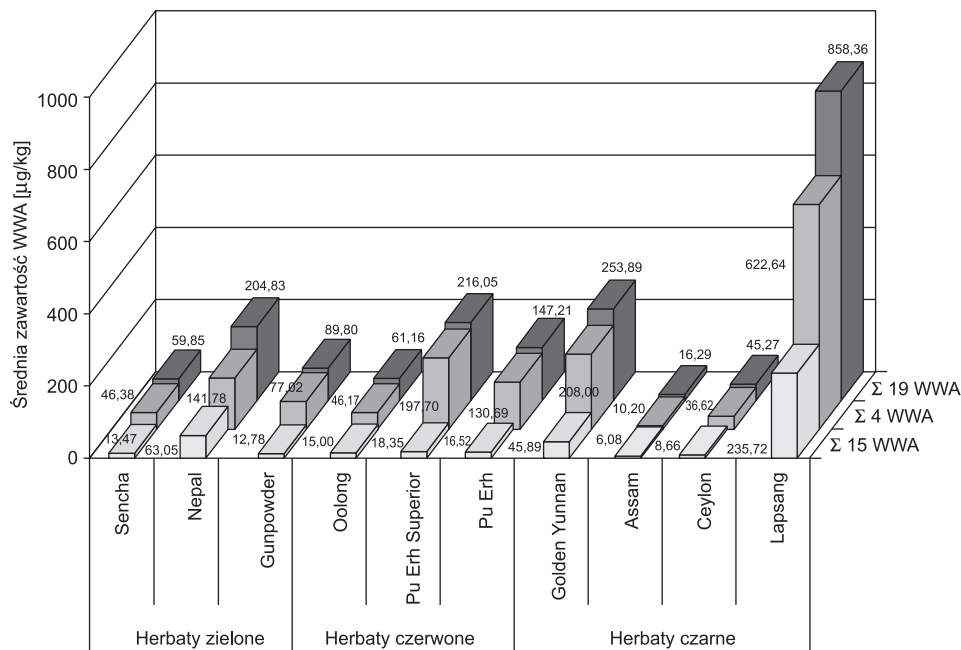
Analizę jakościowo-ilościową wykonano metodą standardów zewnętrznych, które stanowiły mieszaninę 15 WWA wg KN UE (PAH-Mix 183, Dr. Ehrenstorfer) oraz 4 lekkich WWA z listy EPA (PAH-Mix 9, Dr. Ehrenstorfer). Wyznaczone parametry walidacyjne pozwoliły stwierdzić, iż zastosowana metoda oznaczania 19 WWA techniką GC-MS, poza spełnieniem wszystkich wymagań prawa żywnościowego Unii Europejskiej stawianym metodom analitycznym w zakresie oznaczania benzo(a)pirenu w produktach spożywczych, wykazuje także zadowalające wartości parametrów walidacyjnych dla pozostałych 14 WWA z listy KN UE, jak również dla 4 lekkich poliarenow.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy zastosowaniu oprogramowania statystycznego Statistica 7.1. Ocenę istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi sumarycznej zawartości 19 WWA poszczególnych gatunków handlowych herbat w ramach ich trzech analizowanych rodzajów wykonano stosując test porównań wielokrotnych przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Średnie sumaryczne zawartości 19 WWA, w tym 15 WWA (wg listy KN UE, czyli począwszy od cyklopenta[c,d]pirenu do dibenzo[a,h]pirenu) oraz 4 lekkich WWA (fenantrenu, antracenu, fluorantenu oraz pirenu), oznaczone przy wykorzystaniu metody GC-MS, w badanych herbatkach liściastych: zielonych, czerwonych oraz czarnych, przedstawiono na ryc. 1.

Profile jakościowe zawartości WWA w analizowanych herbatkach liściastych: zielonych, czerwonych oraz czarnych odznaczały się obecnością fenantrenu, antracenu, fluorantenu i pirenu, a więc lekkich WWA rekomendowanych do badań przez EPA oraz benzo[a]antracenu, chryzenu, 5-metylochryzenu, benzo[b]- i benzo[k]fluorantenu, należących do grupy poliarenow zalecanych do badań przez Komitet Naukowy ds. Żywności UE. Stwierdzono, iż w puli poliarenow zanieczyszczających herbatki liściaste 4 lekkie WWA stanowiły od ok. 63 do 92% sumarycznej zawartości WWA. W większości analizowanych próbek odnotowano zatem niewielki udział ciężkich węglowodorów w zanieczyszczeniu herbat liściastych. W analizowanych herbatkach nie stwierdzono obecności benzo[a]pirenu, jak również związków zaliczanych do najbardziej kancerogennych WWA, a więc dibenzopirenow.



Ryc. 1. Średnia zawartość WWA w analizowanych herbatach liściastych (μg/kg).

Fig. 1. Mean content of PAHs in the analysed leaf teas (μg/kg).

Pomiędzy poszczególnymi gatunkami handlowymi herbat we wszystkich analizowanych rodzajach herbat liściastych – zielonych, czerwonych i czarnych – zaobserwowano statystycznie istotne zróżnicowanie poziomów sumarycznej zawartości 19 WWA. Spośród herbat zielonych statystycznie najniższym poziomem zanieczyszczenia 19 policyklicznymi węglowodorami aromatycznymi odznaczała się herbata Sencha, dla której średnia sumaryczna zawartość WWA wynosiła 59,85 μg/kg. Najwyższym natomiast poziomem zanieczyszczenia odznaczała się herbata Nepal (204,83 μg/kg). Herbata Gunpowder wykazała istotnie statystycznie niższą zawartość Σ 19 WWA (89,80 μg/kg) w porównaniu z herbatą Nepal, a jednocześnie istotnie wyższą od herbaty Sencha. W grupie herbat czerwonych statystycznie najwyższą sumaryczną zawartość WWA odnotowano w herbacie Pu Erh Superior (216,05 μg/kg), natomiast najniższą w herbacie Oolong (61,16 μg/kg). Poziom zanieczyszczenia herbaty Pu Erh 19 poliarenami osiągnął wartość 147,21 μg/kg. Był zatem istotnie statystycznie wyższy od stwierdzonego w herbacie Oolong, a zarazem istotnie niższy w porównaniu z herbatą Pu Erh Superior. Opisując sumaryczne zanieczyszczenie herbat czarnych, najmniejszą sumaryczną zawartość 19 WWA zaobserwowano w przypadku herbaty Assam (16,29 μg/kg). Statystycznie wyższy poziom zanieczyszczenia charakteryzował herbatę Ceylon, dla której zawartość Σ 19 WWA wynosiła 45,27 μg/kg. W grupie herbat czarnych, pomijając herbatę czarną wędzoną Lapsang, największym skażeniem WWA charakteryzowała się herbata Golden Yunnan (253,89 μg/kg). Z przebadanych w niniejszej pracy rodzajów herbat

liściastych, herbata Golden Yunnan wykazała statystycznie największą zawartość 19 WWA, z wyjątkiem herbaty Lapsang, której poziom zanieczyszczenia poliareniami osiągnął wartość co najmniej kilkakrotnie wyższą od wszystkich pozostałych herbat. Zawartość Σ 19 WWA w herbacie czarnej wędzonej Lapsang kształtowała się bowiem na poziomie 858,36 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ryc. 1).

Według tradycyjnej metody wędzenia herbaty Lapsang, listki herbaty zaraz po zerwaniu osuszane są nad ogniskiem z drewna sosnowego, a po fermentacji przenoszone są do bambusowych koszy, w których ponownie zawieszono są ponad ogniskiem w kłębach dymu z drewna sosnowego. Powszechnie uważa się, iż procesy wędzenia czy prażenia jakiegokolwiek poddawane są niektóre z herbat mogą sprzyjać ich wysokiemu poziomowi skażenia przez WWA (2, 12, 15), co zostało potwierdzone również na podstawie niniejszej pracy.

W badaniach przeprowadzonych przez *Fiedlera* i współpracowników (11) również wykazano istotnie wyższy poziom zanieczyszczenia herbat czarnych w porównaniu do herbat zielonych. To pozwala zatem wnioskować, że herbaty zielone charakteryzują potencjalnie niższy poziom zanieczyszczenia WWA, bowiem powstają one z liści nie poddanych fermentacji, czyli natychmiast po zerwaniu liści przeprowadzany jest proces suszenia. Badania różnych rodzajów herbat przeprowadzone przez *Lin* i współpracowników (14) również potwierdziły, iż najwyższy poziom skażenia poliareniami cechował herbaty czarne. W pracy *Lin* i *Zhu* (13) traktującej o wpływie procesu przetwórczego na zanieczyszczenie czarnej herbaty WWA wykazano, iż jej wysoki poziom skażenia poliareniami jest przede wszystkim konsekwencją procesu suszenia surowca, poprzez spalanie drewna opałowego, podczas którego wytwarzane WWA są następnie absorbowane przez liście herbaty. Ponadto odnotowane w niniejszej pracy bardzo duże zróżnicowanie w poziomach zanieczyszczenia herbat liściastych WWA znajduje potwierdzenie w badaniach *Schlemitz* i *Pfannhausera* (15) oraz *Fiedlera* i współpracowników (11). Stwierdzone sumaryczne zawartości 16 WWA wg listy EPA kształtowały się odpowiednio w granicach od 497 do 1162 $\mu\text{g}/\text{kg}$ oraz od 13,41 do 7536,33 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Badania przeprowadzone przez *Lin* i współpracowników (14) także wykazały szeroki zakres sumarycznej zawartości 16 WWA (w granicach od 323 do 8800 $\mu\text{g}/\text{kg}$) w różnych rodzajach herbat liściastych. Badania herbat liściastych wykonane przez fińskich badaczy również potwierdziły istotne zróżnicowanie sumarycznej zawartości 16 WWA (od 480 do 1400 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (16).

Na podstawie odnotowanych w niniejszych badaniach profili jakościowych i ilościowych zawartości WWA można jednoznacznie wnioskować o środowiskowym charakterze skażenia analizowanych herbat liściastych, z pominięciem wysoce zanieczyszczonej herbaty Lapsang. Można zatem stwierdzić, iż uzyskane wyniki są bardzo zbliżone do tych odnotowanych w pracy *Lin* i współpracowników (14), wg których również dominujący udział w zanieczyszczeniu herbat mają węglowodory lekkie (od 77,7 do 98,7% wszystkich badanych WWA). Badania wykonane przez *Bishnoi* i współpracowników (17) także potwierdziły wysoki udział lekkich WWA, w porównaniu do zawartości ciężkich WWA, w puli wszystkich poliarenowych zanieczyszczających analizowane herbaty.

WNIOSKI

Odnotowano zbliżone profile jakościowe zawartości WWA z wysokim udziałem lekkich WWA w zanieczyszczeniu analizowanych herbat. Stwierdzono bowiem, iż w puli poliarenow zanieczyszczających herbaty liściaste 4 lekkie WWA stanowiły od około 63 do 92% sumarycznej zawartości WWA. W analizowanych herbatach nie wykryto obecności benzo[a]pirenu oraz związków zaliczanych do najbardziej kancerogennych WWA, a więc dibenzopirenow.

Pomiędzy poszczególnymi gatunkami handlowymi we wszystkich analizowanych rodzajach herbat liściastych wykazano istotne zróżnicowanie poziomów sumarycznej zawartości 19 WWA. Badania wykazały jednakże względnie niskie zawartości WWA, zwłaszcza ciężkich poliarenow, w analizowanych herbatach (z wyjątkiem silnie wędzonej herbaty Lapsang), które determinują również niskie poziomy zanieczyszczenia ich naparów, są bowiem pośrednio powiązane z silnie hydrofobowymi własnościami WWA, w konsekwencji czego tylko ok. 5 – 10% WWA przechodzi do ich naparów.

M. Ciecierska, M. Obiedzinski

DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC
HYDROCARBONS CONTENT IN LEAF TEAS BY GC-MS METHOD

Summary

The objective of this research was to determine content of 19 PAHs (including 4 light PAHs listed by EPA and 15 compounds listed by the EU Scientific Committee on Food) in commercially available popular leaf tea brands of green, red and black tea, and in smoked Lapsang tea. The employed methodology comprised PAH isolation from the food matrix, removal of the interfering compounds from the extract by gel permeation chromatography (GPC) and PAH determination using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Similar quality profiles of PAHs with high level of 4 light PAHs (from 63 to 92%) were found in the total content of 19 PAHs for all tested leaf tea brands. Benzo[a]pyrene as well as the most carcinogenic PAHs, the dibenzopyrenes, were not detected in any of the analysed samples. While only about 5-10% of tea PAH content is extracted to the infusion, results of this study clearly show that the levels of PAHs (and of the heavy PAHs in particular) in the analysed tea grades were relatively low, except for the Lapsang smoked tea.

PIŚMIENNICTWO

1. EPA/5401/1-86/013, 1984. – 2. Scientific Committee on Food: Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. CF/CNTM/PAH/29 Final 4 December 2002. – 3. Commission Recommendation 2005/108/EC of 4 February 2005 on the further investigation into the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in certain foods. Official Journal of the European Union, L 34/3. – 4. Gupta S., Saha B., Giri A.K.: Comparative antimutagenic and anticlastrogenic effects of green tea and black tea: a review. *Mutat. Res.*, 2002; 512: 37-65. – 5. Kuroda Y., Hara Y.: Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutat. Res.*, 1999; 436: 69-97. – 6. Liu Z.Q., Ma L.P., Zhou B., Yang L., Liu Z.L.: Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein. *Chem. Physics of Lipids*, 2000; 106: 53-63. – 7. Vinson J.A., Dabbagh Y.A.: Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutrit. Res.*, 1998; 18: 1067-1075. – 8. Wheeler D.S., Wheeler W.J.: The medicinal chemistry of tea. *Drug Dev. Res.*, 2004; 61: 45-65. – 9. Camargo Rojo M.C., Toledo M.C.F.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits.

Food Control, 2003; 14: 49-53. – 10. *Jánská M., Hajslová J., Tomaniová M., Kocourek V., Vávrová M.*: Polycyclic aromatic hydrocarbons in fruits and vegetables grown in the Czech Republic. *Environ. Contam. Toxicol.*, 2006; 77: 492-499.

11. *Fiedler H., Cheung C.K., Wong M.H.*: PCDD/PCDF, chlorinated pesticides and PAH in Chinese teas. *Chemosphere*, 2002; 46: 1429-1433. – 12. *Gomes Zuin V., Montero L., Bauer C., Popp P.*: Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. *J. Chromatogr. A*, 2005; 1091: 2-10. – 13. *Lin D., Zhu L.*: Polycyclic aromatic hydrocarbons: pollution and source analysis of a black tea. *J. Agric. Food Chem.*, 2004; 52: 8268-8271. – 14. *Lin D., Tu Y., Zhu L.*: Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea. *Food Chem. Toxicol.*, 2005; 43: 41-48. – 15. *Schlemitz S., Pfannhauser W.*: Supercritical fluid extraction of mononitrated polycyclic aromatic hydrocarbons from tea—correlation with the PAH concentration. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 1997; 205: 305-310. – 16. *Hietaniemi V., Ovaskainen M.L., Hallikainen A.*: PAH compounds and their intake from foodstuffs on the market. National Food Administration. Research Notes 6. Helsinki, 1999. – 17. *Bishnoi N.R., Mehta U., Sain U., Pandit G.G.*: Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea and coffee samples of Mumbai city (India) by high performance liquid chromatography. *Environ. Monit. Assessm.*, 2005; 107: 399-406.

Adres: 02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159 C.