

*Urszula Błaszczyk, Jolanta Zalejska-Fiolka, Beata Janoszka¹⁾,
Ewa Birkner, Roland Heiduk*

ZAWARTOŚĆ WYBRANYCH WIELOPIERŚCIENIOWYCH WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH W NIEOGRZEWANYCH I OGRZEWANYCH OLEJACH JADALNYCH

Zakład Biochemii Ogólnej Katedry Biochemii Wydziału Lekarskiego w Zabrze
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Kierownik: prof. zw. dr hab. *E. Birkner*

Katedra i Zakład Chemii Wydziału Lekarskiego w Zabrze
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Kierownik: *vacat*

W próbkach wybranych olejów roślinnych świeżych i poddanych ogrzewaniu (bez i z dodatkiem czosnku i frytki ziemniaczanej) oznaczono wartości liczby nadtlenkowej, liczby jodowej i zawartość pięciu prokancerogennych WWA.

Hasła kluczowe: WWA, oleje jadalne, czosnek, SPE, HPLC.

Key words: PAHs, edible oils, garlic, SPE, HPLC.

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), powstające w procesach niecałkowitego spalania materii organicznej są szeroko rozpowszechnione w środowisku (1, 2). Badania prowadzone od wielu lat potwierdzają, że część związków należących do tej grupy wykazuje aktywność mutagenną, kancerogenną i genotoksyczną (3–6). Międzynarodowa Organizacja Zdrowia (WHO) oszacowała, że narażenie człowieka na WWA w 99% ma związek z dietą oraz w 0,1–0,3% z zanieczyszczeniem wody pitnej (7). Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne obecne w żywności mogą pochodzić ze środowiska (z powietrza, wody, gleby) lub tworzyć się w wyniku procesów jej przetwarzania, między innymi podczas wędzenia lub wysokotemperaturowej obróbki i rozkładu termicznego (pirolizy) produktów o dużej zawartości białka i tłuszczu (8).

Istotnym źródłem WWA w diecie człowieka mogą być oleje roślinne, szczególnie te otrzymany z roślin uprawianych w rejonach, w których gleba i atmosfera jest zanieczyszczona. Do skażenia olejów może dochodzić także w czasie suszenia materiału roślinnego dymem lub spalinami oraz podczas ekstrakcji tego materiału rozpuszczalnikami zawierającymi śladowe pozostałości węglowodorów aromatycznych. Badania wykazały, że na etapach zbioru, transportu i składowania może dochodzić do podwyższenia stopnia zanieczyszczenia surowców roślinnych, z których otrzymywany jest olej, o 38% węglowodorami o dwóch i trzech pierścieniach aromatycznych oraz o 64% przez wysokomolekularne WWA (9). W związku z powyższym uzasadniona jest kontrola poziomu tego typu zanieczyszczeń, tak na etapie przygotowania surowców, jak i podczas procesu produkcji oleju jadalnego.

W Polsce obowiązuje Rozporządzenie Komisji Unii Europejskiej nr 208/2005 z dn. 4.02.2005, uznające „benzo[a]piren za marker występowania i rakotwórczego

działania WWA w żywności”. Zgodnie z tym rozporządzeniem dopuszczalny poziom B[a]P w olejach i tłuszczach spożywczych wynosi 2 µg/kg świeżej masy produktu. Przytoczona norma dotyczy produktów dostępnych w handlu oraz używanych w gastronomii. Oleje roślinne mogą być spożywane w stanie naturalnym, między innymi jako dodatek do sałatek, jednakże w kuchni polskiej najczęściej wykorzystywane są do smażenia produktów wysokobiałkowych (mięso, ryby) i węglowodanowych (frytki, placki ziemniaczane, naleśniki, pączki). Podawanie olejów działaniu wysokiej temperatury może prowadzić do utlenienia zawartych w nich kwasów tłuszczowych (10).

MATERIAŁY I METODY

Oleje będące przedmiotem badań (w ilości 1 dm³): olej rzepakowy, oliwa z oliwek, olej z pestek winogron, jak również dodatki stosowane podczas ich ogrzewania: czosnek i ziemniaki, zakupiono w lokalnym sklepie.

Substancje wzorcowe oznaczanych WWA: fluoranten, benzo[a]antracen, benzo[k]fluoranten, benzo[a]piren i benzo[g,h,i]perylene zakupiono w firmie Pro-mochem (Wessel, Niemcy). Nazwy, używane skróty nazw oraz wzory strukturalne tych związków zamieszczono w tab. I.

Do przygotowania faz ruchomych używanych podczas ekstrakcji do fazy stałej (SPE) oraz podczas analizy techniką wysokosprawną chromatografii cieczowej (HPLC) stosowano rozpuszczalniki czystości HPLC-*grade*: acetonitryl, dichlorometan, n-heksan, metanol (J.T.Baker, Groß-Gerau, Niemcy) oraz wodę dejonizowaną (Millipore Wiedeń, Austria). Hydrolizę alkaliczną prowadzono za pomocą NaOH (POCH, Gliwice, Polska).

Próbki olejów zostały przygotowane do analizy zgodnie z Polską Normą PN-60/A-86910 oraz PN-60/A-86914. Badane próbki olejów umieszczono w identycznych szalkach Petry’ego o średnicy 7 cm i wysokości 4 cm i poddano ogrzewaniu w cieplarni firmy Venticell (BMT, Słowacja), bez dodatków oraz w ich obecności, w temp. 180°C ± 0,5 w czasie 60 min. (3 × 20 min.). Pomiedzy kolejnymi ogrzewaniami próbki schładzano do temperatury pokojowej i w próbkach z dodatkami wymieniano je na świeże porcje. Każdą próbę wykonano trzykrotnie.

Próbki będące przedmiotem badań opisano następującymi symbolami:

0. olej nieogrzewany,
1. olej ogrzewany bez dodatków,
2. olej ogrzewany z dodatkiem czosnku (200 mg/20 g oleju),
3. olej ogrzewany z dodatkiem frytki ziemniaczanej (2 g/20 g oleju),
4. olej ogrzewany z dodatkiem czosnku (200 mg) i frytki ziemniaczanej (2 g/20 g oleju).

W wymienionych próbkach olejów: w świeżych (natychmiast po otwarciu butelek) oraz we wszystkich próbkach poddanych ogrzewaniu oznaczono liczbę nadtlenkową (LN PN-ISO 3960/1996) i liczbę jodową (LJ PN-ISO 3961/1998) zgodnie z wytycznymi Polskiego Komitetu Normalizacyjnego (11, 12).

Fracje WWA wyodrębniono z badanych próbek olejów stosując metodę SPE, w połączeniu z reakcją zmydlania kwasów tłuszczowych i z ekstrakcją cieczą (13). Zastosowano kolumnienki SPE SiOH/3 cm³/500 mg (nr kat. 7086-03, J.T.

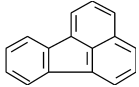
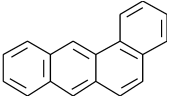
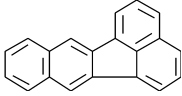
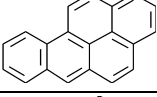
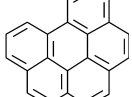
Baker Groß-Gerau, Niemcy) kondycjonowane wstępnie 2 cm³ dichlorometanu i 3 cm³ *n*-heksanu. Próbkę oleju (1 cm³) rozpuszczano w 2 cm³ *n*-heksanu i nanoszono na kondycjonowaną kolumnię SPE. Po przemyciu złożyła 2 cm³ *n*-heksanu, eluowano frakcję wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych za pomocą 5 cm³ mieszaniny zawierającej *n*-heksan i dichlorometan (3:1, v/v). Po zateżeniu do obj. ok. 1 cm³, frakcję zawierającą WWA poddano zmydleniu za pomocą 1 cm³ NaOH o stęż. 2 mol/dm³. Fazę wodną ekstrahowano dwukrotnie 2 cm³ *n*-heksanu. Połączone frakcje *n*-heksanowe odparowano do sucha, po czym rozpuszczono w acetonitrylu i poddano analizie HPLC.

Oznaczenia przeprowadzono za pomocą chromatografu cieczowego firmy Knauer (Knauer, Polska), z zastosowaniem kolumny Nucleosil 100 (250 × 4,6 mm I.D.; 5 μm) (Knauer, Polska) i fazy ruchomej: acetonitryl-woda (84:16, v/v). Rozdziały chromatograficzne prowadzono w systemie izokratycznym przy prędkości przepływu eluentu wynoszącej 2,5 cm³/min. Analizę jakościowo-ilościową przeprowadzono przy użyciu detektora fluorescencyjnego (λ_{Ex} = 360 nm, λ_{Em} = 460 nm).

Identyfikacja WWA polegała na porównaniu wartości współczynników retencji (*k*) wyznaczonych dla związków wzorcowych z wartościami uzyskanymi dla badanych próbek olejów oznaczanych w jednakowych warunkach chromatograficznych.

Analizę ilościową przeprowadzono metodą wzorca zewnętrznego. Współczynniki regresji (*R*²) wyznaczone dla krzywych standardowych wynosiły: 0,9959 dla fluorantenu, 0,9960 dla benzo[*a*]antracenu, 0,9975 dla benzo[*k*]fluorantenu, 0,9953 dla benzo[*a*]pirenu i 0,9864 dla benzo[*g,h,i*]perylenu. Wartości granic detekcji WWA oznaczonych metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną zamieszczono w tab. I.

Table I. Wzory strukturalne i granice detekcji oznaczanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych
Table I. The structures and detection limits of studied polycyclic aromatic hydrocarbons

Związek	Skrót nazwy	Wzór strukturalny	Granica detekcji (ng) ^a
Fluoranten	Fln		0,04
Benzo[<i>a</i>]antracen	B[<i>a</i>]A		0,02
Benzo[<i>k</i>]fluoranten	B[<i>k</i>]Fln		0,04
Benzo[<i>a</i>]piren	B[<i>a</i>]P		0,01
Benzo[<i>g,h,i</i>]perylen	B[<i>g,h,i</i>]P		0,01

^{a)} Granica detekcji (S/N = 3) została wyznaczona przy użyciu mieszaniny standardowej WWA wprowadzonej bezpośrednio na kolumnę HPLC z zastosowaniem pętli 20 mm³.

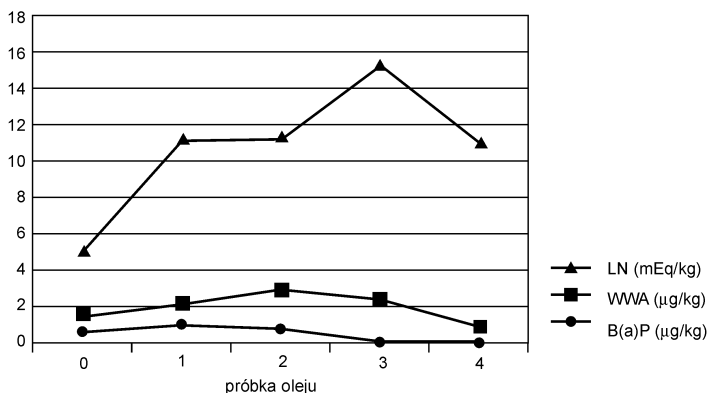
WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Oznaczono zawartość pięciu prokancerogennych wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych w próbkach wybranych trzech olejów jadalnych oraz przeprowadzono badania nad wpływem ogrzewania tych olejów na zmianę stężenia zawartych w nich WWA. Badaniom poddano, powszechnie używane w Polsce: olej rzepakowy, oliwę z oliwek pierwszego tłoczenia i rzadziej stosowany, chociaż dostępny na polskim rynku, olej z pestek winogron. Oleje ogrzewano bez dodatków i w obecności wybranych składników pochodzenia roślinnego. Dla każdej z przygotowanych próbek wykonano oznaczenie liczby jodowej (LJ) i liczby nadtlenkowej (LN).

Oznaczenie liczby jodowej dla próbek olejów świeżych i podgrzewanych w temp. 180°C przez 20 min. i 60 min. wykazało, że ogrzewanie nie ma istotnego wpływu na jej wartość. Brak istotnych różnic LJ pomiędzy poszczególnymi rodzajami olejów może wskazywać na niezmienny stopień „nienasycenia” występujących w nich kwasów tłuszczowych. Nie można jednak na tej podstawie określić, czy w wyniku ogrzewania nie utworzyły się formy izomeryczne tych kwasów.

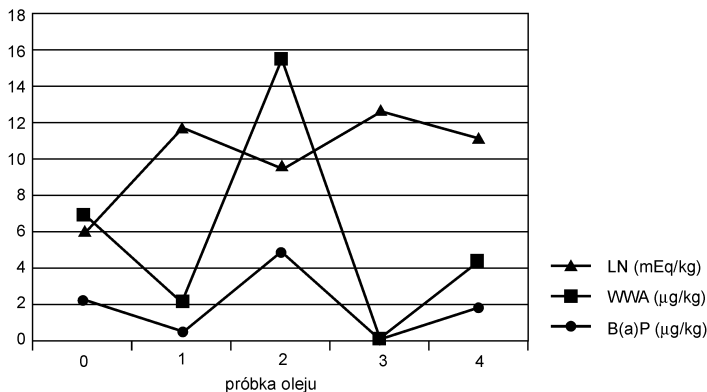
Na ryc. 1, 2 i 3 przedstawiono dane dotyczące zmian oznaczanych wartości liczby nadtlenkowej i sumarycznych stężeń pięciu WWA oraz B[a]P dla wszystkich badanych próbek olejów.

Zaobserwowano, że podgrzewanie olejów w temperaturze smażenia potraw (180°C) spowodowało w każdym przypadku, wzrost wartości liczby nadtlenkowej, co może wskazywać na powstawanie wtórnych produktów oksydacji składników badanych olejów (14). Największy wzrost tej liczby stwierdzono dla olejów smażonych z dodatkiem frytki ziemniaczanej. Dodatek czosnku do oleju z pestek winogron i oliwy z oliwek wpłynął na obniżenie LN w porównaniu do wartości oznaczonych dla próbek tych olejów ogrzewanych bez dodatków.



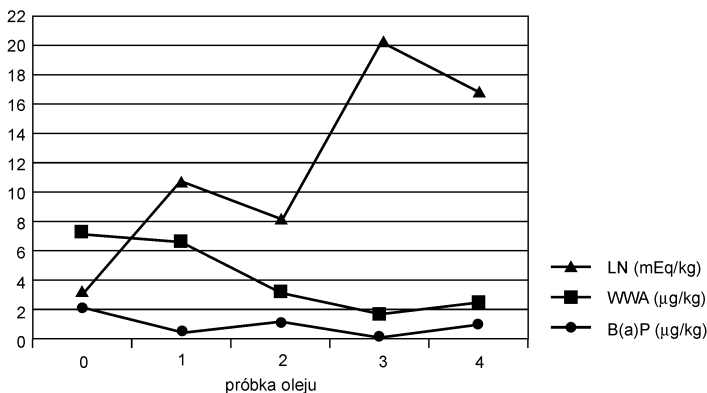
Ryc. 1. Zmiany liczby nadtlenkowej (milorównoważnik/kg) i zawartości sumy oznaczanych WWA oraz B[a]P (µg/kg) w próbkach oleju rzepakowego: nieogrzewanych (0), ogrzewanych w temp. 180°C w czasie 60 min. (1), ogrzewanych z dodatkiem czosnku (2), ogrzewanych z dodatkiem ziemniaka (3), ogrzewanych z dodatkiem czosnku i ziemniaka (4).

Fig. 1. Changes of peroxide value (LN) (miliequivalent/kg), total PAH and B[a]P concentration (µg/kg) in rape seed oil samples: non-treated (0), heat-treated at 180°C (1), heat-treated with garlic (2), heat-treated with potato (3), heat-treated with garlic and potato (4).



Ryc. 2. Zmiany liczby nadtlenkowej (milirownoważnik/kg) i zawartości sumy oznaczanych WWA oraz B[a]P (µg/kg) w próbkach oliwy z oliwek. Próbki oznaczone tak jak w ryc. 1.

Fig. 2. Changes of peroxide value (LN) (miliequivalent/kg), PAH and B[a]P concentration (µg/kg) in olive oil samples.

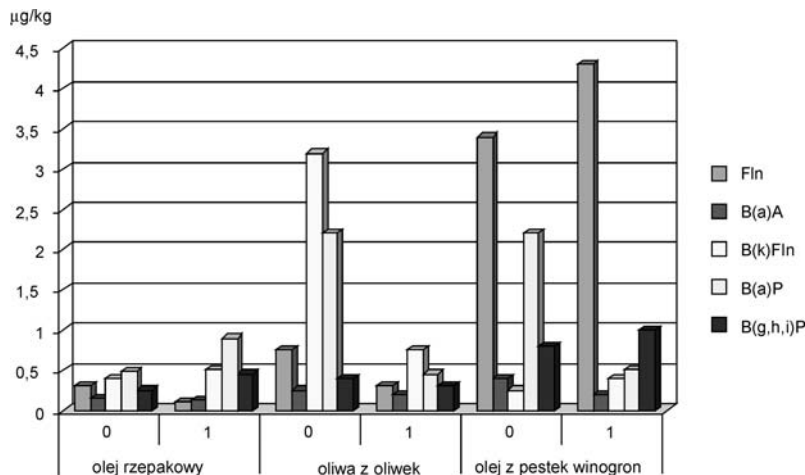


Ryc. 3. Zmiany liczby nadtlenkowej (milirownoważnik/kg) i zawartości sumy oznaczanych WWA oraz B[a]P (µg/kg) w próbkach oleju z pestek winogron.

Fig. 3. Changes of peroxide value (LN) (miliequivalent/kg), total PAH and B[a]P concentration (µg/kg) in grape seed oil samples.

Rycina 4 przedstawia zmiany stężeń WWA w próbkach olejów „świeżych” i poddanych ogrzewaniu w temp. 180°C w czasie 60 min. W próbkach tych oznaczono stężenia pięciu WWA o czterech do sześciu pierścieniach aromatycznych (tab. I). Polska norma (zgodna z rozporządzeniem UE) przewiduje oznaczanie w wybranych produktach spożywczych wyłącznie kancerogennego B[a]P, uznawanego za marker występowania i rakotwórczego działania tej grupy związków. Należy podkreślić, że zawartość tego węglowodoru w próbkach środowiskowych stanowi zaledwie 5–10% sumarycznego stężenia WWA, przy czym inne związki z tej grupy również mogą wykazywać właściwości muta- i kancerogenne.

Oznaczone sumaryczne stężenia WWA w badanych próbkach olejów wynosiły od 1,51 do 7,17 µg/kg. Wartości te są porównywalne (tego samego rzędu) ze



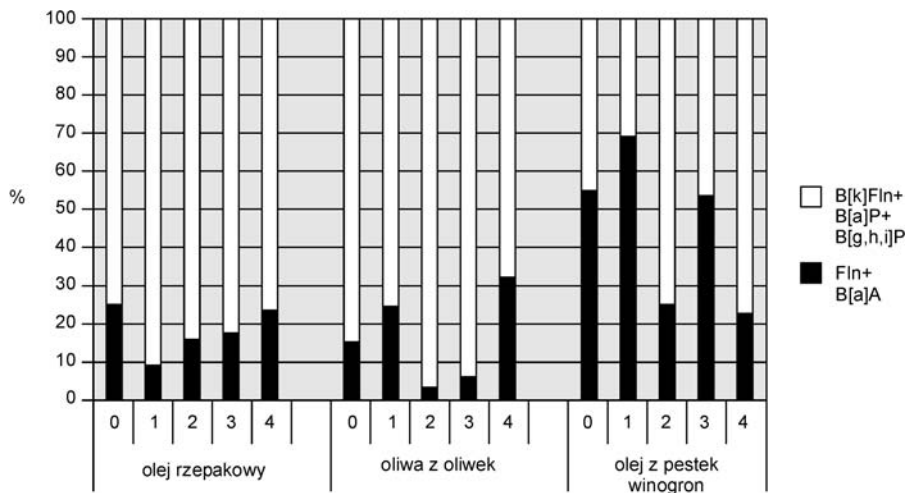
Ryc. 4. Zawartość poszczególnych oznaczanych WWA w próbkach badanych olejów: nieogrzewanych (0), ogrzewanych w temp. 180°C w czasie 60 min. (1).

Fig. 4. PAH concentration of studied oil samples: non-treated (0) and heat-treated at 180°C (1).

stężeniami WWA oznaczonymi przez innych autorów (15–18). Zanotowana wysoka zawartość WWA (ryc. 4), w tym B[a]P, w oleju oliwkowym oraz z pestek winogron, w porównaniu do oleju rzepakowego może wynikać z usunięcia części występujących w nim WWA podczas procesu rafinacji oleju. Procentowa zawartość B[a]P w sumie pięciu oznaczanych związków jest porównywalna i wynosi 29% (oliwa z oliwek), 33% (olej rzepakowy) i 32% (olej z pestek winogron). Stężenie B[a]P w świeżym, nieogrzewanym oleju rzepakowym jest niższe od 1 µg/kg, natomiast w oleju z pestek winogron i w oliwie z oliwek nieznacznie przekracza wartość 2 µg/kg tj. wartość obowiązującej polskiej normy dla olejów i tłuszczów jadalnych.

Sumaryczna zawartość pięciu WWA w oleju z oliwek i z pestek winogron poddanych działaniu wysokiej temperatury była niższa niż w olejach nieogrzewanych. W przypadku oleju rzepakowego wartość ta była nieznacznie wyższa w porównaniu do oleju świeżego (ryc. 1). Wyraźny wzrost stężenia WWA zanotowano dla oliwy z oliwek podgrzewanej z dodatkiem czosnku.

Rycina 5 przedstawia procentowy udział czteropierścieniowych WWA (Fln + B[a]A) we frakcjach wyodrębnionych z próbek olejowych. Zaobserwowano znaczne różnice w udziale procentowym WWA o czterech i pięciu pierścieniami aromatycznymi w olejach „świeżo” tłoczonych (oliwa z oliwek, olej z pestek winogron). Oleje te mogą zawierać, nieobecne w rafinowanym oleju rzepakowym, naturalne składniki pochodzenia roślinnego (antyoksydanty, barwniki), których produkty wysokotemperaturowych przemian mogły mieć wpływ na zaobserwowany profil zmian stężeń WWA. Obniżenie zawartości czteropierścieniowych WWA, które są mniej stabilne od związków bardziej skondensowanych, może wynikać z tego, że w wysokiej temperaturze uległy one rozkładowi bądź utlenieniu do bardziej polarnych pochodnych, nieoznaczonych w tej pracy. Należy podkreślić, że pochodne takie mogą być bardziej aktywne biologicznie (kancerogenne, mutagenne) niż węglowodory, z których powstały (7).



Ryc. 5. Procentowy udział czteropierścieniowych WWA (Fln+B[a]P) we frakcjach wyodrębnionych z próbek olejowych: nieogrzewanych (0), ogrzewanych w temp. 180°C w czasie 60 min. (1), ogrzewanych z dodatkiem czosnku (2), ogrzewanych z dodatkiem ziemniaka (3), ogrzewanych z dodatkiem czosnku i ziemniaka (4).

Fig. 5. Percentage of four-rings PAHs (Fln+B[a]P) in PAH fractions of analysed oil samples: non-treated (0), heat-treated at 180°C (1), heat-treated with garlic (2), heat-treated with potato (3), heat-treated with garlic and potato (4).

WNIOSKI

Ogrzewanie olejów roślinnych w temperaturze smażenia potraw przyczynia się do ich utlenienia, co wykazano poprzez oznaczenie liczby nadtlenkowej dla olejów świeżych i poddanych działaniu wysokiej temperatury. Największy wzrost liczby nadtlenkowej zanotowano dla próbek olejów ogrzewanych z dodatkiem frytki ziemniaczanej. Wprowadzenie czosnku do ogrzewanego oleju z pestek winogron i oliwy z oliwek spowodowało obniżenie LN.

Sumaryczne stężenie pięciu prokancerogennych WWA oznaczone w próbkach olejów świeżych i ogrzewanych wynosiło od 1,51 do 7,17 µg/kg. Zawartość WWA w próbkach oleju z oliwek i z pestek winogron poddanych ogrzewaniu (bez dodatków i w ich obecności) była niższa niż w olejach nieogrzewanych. W przypadku oleju rzepakowego zawartość ta nieznacznie wzrosła w porównaniu do stężenia WWA w oleju świeżym.

Stężenie B[a]P oznaczone w świeżym oleju rzepakowym było niższe od 1 µg/kg. W próbkach oliwy z oliwek i oleju z pestek winogron stężenie tego kancerogenu nieznacznie przekraczało wartość 2 µg/kg tj. obowiązującą w Polsce normę dla olejów i tłuszczów jadalnych.

U. Błaszczyk, J. Zalejska-Fiolka, B. Janoszka, E. Birkner, R. Heiduk

CONTENT OF SELECTED POLICYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS
IN NON-TREATED AND HEAT-TREATED EDIBLE OIL SAMPLES

Summary

Peroxide value, iodine value, and concentration of five procarcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) were determined in the following edible oil samples: rape seed, grape seed and olive oil (with and without addition of garlic and potato chips). Heat-treatment of the samples at the temperature corresponding to the normal frying temperature (180°C) for 60 minutes resulted in their oxidation, as evidenced by determinations of their peroxide value. Total concentration of the five procarcinogenic PAH determined in the non-treated and heat-treated oil samples was from 1.51 to 7.17 µg/kg. PAH content in olive and grape seed oil samples (with and without the additives) was lower than in the non-treated ones. In the heat-treated rape seed oil samples, PAH concentration was slightly higher than in the non-treated ones. B[a]P concentration in the non-treated rape seed oil samples was lower than 1 µg/kg and in grape seed and olive oil samples it was slightly higher than 2 µg/kg, the latter being the admissible value specified by the relevant Polish standard for B[a]P concentration in edible oils and fats.

PIŚMIENNICTWO

1. *Zakrzewski S.*: Podstawy toksykologii środowiska. PWN, Warszawa, 2000. – 2. *Bąkowski W., Bodzek D.*: WWA w naturalnym środowisku człowieka, pochodzenie, występowanie, toksyczność, oszacowanie emisji w Polsce. Arch. Ochr. Środ. 1988; 3-4. – 3. *Schoket B.*: DNA damage in humans exposed to environmental and dietary polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutat. Res., 1999; 424: 143-53. – 4. *Lightfoot T.J., Coxhead J.M., Cupid B.C., Nicholson S., Garner R.C.*: Analysis of DNA adducts by accelerator mass spectrometry in human breast tissue after administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and benzo[a]pyrene. Mutat. Res., 2000; 472: 119-127. – 5. *Phillips D.H.*: Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. Mutat. Res. 1999; 443: 139-147. – 6. *Booker C.D., White Jr K.L.*: Benzo[a]pyrene-induced anemia and splenomegaly in NZB/WZ1 mice. Food Chem. Toxicol., 2005; 43: 1423-1431. – 7. *Sikorski Z.E.*: Chemia Żywności, WNT, Warszawa 2002. – 8. *Michalski R., Germuska R.*: The Content of Benzo[a]pyrene in Slovakian Smoked Cheese. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2003; 12/53: 31-35. – 9. *Cejpek K., Hajslova J., Kocourek V., Tomaniova M., Cmolik J.*: Changes in PAH levels during production of rapeseed oil. Food Addit. Contam., 1998; 15(5): 563-574. – 10. *Romero A., Bastysda S., Sanchez-Muniz F.J.*: Cyclic fatty acid monomer formation in domestic frying of frozen foods in sunflower oil and high oleic acid sunflower oil without oil replenishment. Food Chem. Toxicol., 2006; 44: 1674-81.

11. *Polski Komitet Normalizacyjny – Oleje roślinne i tłuszcze zwierzęce-oznaczanie liczby nadtlenkowej.* Norm. Alfa – Wero, Warszawa 1996; 3-7. – 12. *Polski Komitet Normalizacyjny – Oleje roślinne i tłuszcze zwierzęce – oznaczanie liczby jodowej.* Norm. Alfa – Wero, Warszawa 1998; 3-7. – 13. *Macherey Nagel: SPE applications.* 1998; 129. – 14. *Hazuka Z.*: Oznaczanie monomerów cyklicznych nienasyconych kwasów tłuszczowych w tłuszczach posmażalniczych. Bromat. Chem. Toksykol., supl., 2003; 405-410. – 15. *Barranco A., Alonso-Salces R.M., Crespo I., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F., Sarobe M.*: Polycyclic aromatic hydrocarbon content in commercial Spanish fatty foods. J. Food Prot., 2004; 67(12): 2786-91. – 16. *Abdulkadar A.H., Kunhi A.A., Jassim A.J., Abdulla A.A.*: Determination of benzo[a]pyrene by GC/MS/MS in retail olive oil samples available in Qatar. Food Addit. Contam. 2003; 20(12): 1164-9. – 17. *Purcaro G., Navas J.A., Guardiola F., Conte L.S., Moret S.*: Polycyclic aromatic hydrocarbons in frying oils and snacks. J Food Prot., 2006; 69(1): 199-204. – 18. *Pandey M.K., Mishra K.K., Khanna S.K., Das M.*: Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in commonly consumed edible oils and their likely intake in the Indian population. J. Am. Oil Chem. Soc., 2004; 81(12): 1131-1136.

Adres: 41-808 Zabrze, ul. Jordana 19.