

Marta Ciecierska, Mieczysław Obiedziński

OZNACZENIE ZAWARTOŚCI WIELOPIERŚCIENIOWYCH WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH METODĄ GC-MS W KAWACH NATURALNYCH PALONYCH*

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

Oznaczono zawartość 19 WWA przy użyciu chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) w wybranych kawach naturalnych palonych. Zaobserwowano, iż w zanieczyszczeniu kaw dominujący udział mają węglowodory lekkie. Profile jakościowe zanieczyszczenia kaw charakteryzowały się wysokim udziałem 15 WWA zalecanych do badań przez Komitet Naukowy ds. Żywności UE.

Hasła kluczowe: WWA, kawy naturalne palone, analiza GC-MS.

Key words: PAHs, roasted natural coffee, GC-MS analysis.

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) stanowią wszechobecną w środowisku grupę zanieczyszczeń chemicznych. Ze względu na genotoksyczne, mutagenne i kancerogenne właściwości związki te budzą zainteresowanie szerokiego spektrum nauk (1). Obecnie według zalecenia Komisji Europejskiej z dnia 4 lutego 2005 (2) 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.

Szczególnie podatnymi na zanieczyszczenie WWA są produkty o dużej zawartości tłuszczu, który stanowi nośnik hydrofobowych poliarenów. Przez wzgląd na fakt, iż kawa zawiera od 10 do 17% tłuszczu, a ponadto poddawana jest procesowi prażenia, może być zanieczyszczona przez WWA (3, 4, 5).

Celem pracy było zatem zbadanie stopnia zanieczyszczenia WWA wybranych kaw naturalnych palonych, w tym przez 4 związki z listy rekomendowanej do badań przez EPA oraz 15 WWA wg Komitetu Naukowego UE, przy zastosowaniu metody GC-MS.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły kawy dwóch gatunków: Arabika – pochodząca z Brazylii, Peru, Etiopii, Indonezji, Tanzanii oraz Robusta – z Wybrzeża Kości Słoniowej, Indonezji, Indii, Ugandy, Wietnamu. Kawy zostały poddane prażeniu

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

w temperaturze 125–135°C przy zastosowaniu ogrzewania bezprzeponowego (piece elektryczne). Badaniom poddano po trzy próbki każdej z kaw, a każdą z trzech próbek tego samego asortymentu analizowano w trzech powtórzeniach.

Metodyka badań obejmowała ekstrakcję tłuszczu, oczyszczenie ekstraktu na kolumnie z żelazem krzemionkowym, izolację WWA z matrycy tłuszczowej przy wykorzystaniu chromatografii preparatywnej (GPC) oraz jakościowe i ilościowe oznaczenie związków techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS).

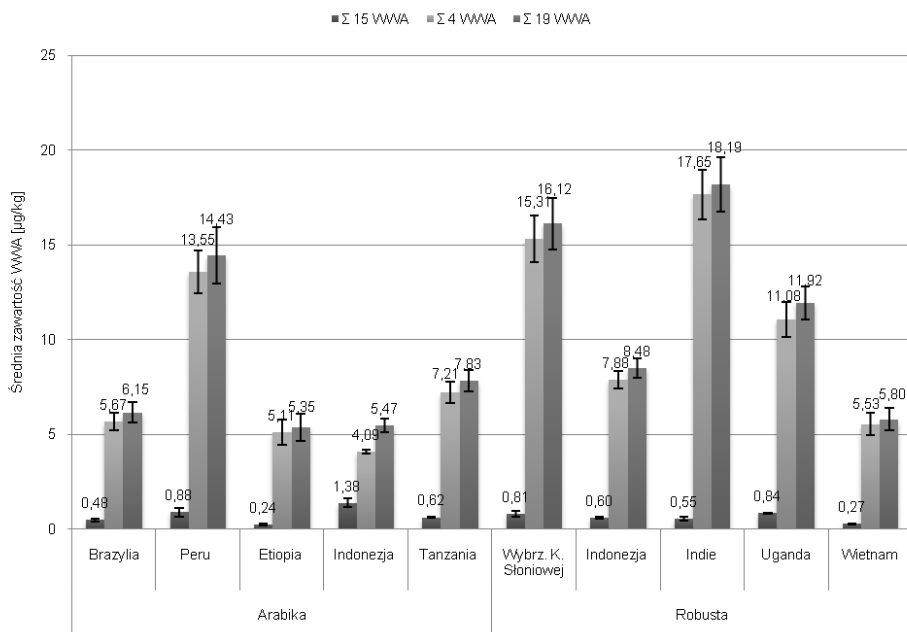
W tym celu naważkę kawy zalewano 50 cm³ mieszaniny heksan/ aceton (60/40, v/v) oraz umieszczano w łaźni ultradźwiękowej (30 min). Uzyskany ekstrakt po przefiltrowaniu zagęszczano do około 50 µl rozpuszczalnika przy wykorzystaniu wyparki obrotowej Büchi. Skoncentrowany ekstrakt przenoszono na szczyt kolumny wypełnionej Silica żelazem (Fluka) i wymywano cykloheksanem. Pierwsze 10 cm³ przesącza odrzucano, a kolejne zebrane 75 cm³ zateżano oraz rozpuszczano w 5 cm³ cykloheksanu. W celu oddzielenia WWA od frakcji tłuszczowej 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, długość fali 254 nm. Zebraną frakcję WWA po zagęszczeniu oraz rozpuszczeniu w 0,5 cm³ acetonitrylu poddano analizie metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas przy użyciu aparatu GCMS–QP 2010 firmy Shimadzu. Rozdział prowadzono z zastosowaniem kolumny chromatograficznej ZB–5ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) Zebron, firmy Phenomenex. Analiza WWA przebiegała w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM), dobierając selektywne jony charakterystyczne dla poszczególnych WWA.

Analizę jakościowo-ilościową wykonano metodą standardów zewnętrznych. Wyznaczone parametry walidacyjne pozwoliły stwierdzić, iż zastosowana metoda oznaczania 19 WWA techniką GC-MS, oprócz spełnienia wymagań prawa żywnościowego Unii Europejskiej stawianych metodom analitycznym w zakresie oznaczania benzo[a]pirenu, wykazuje 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 programu Statistica 7.1. Ocenę istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi sumarycznej zawartości 19 WWA dla poszczególnych kaw, w ramach ich dwóch analizowanych gatunków, 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, począwszy od cyklopenta[c,d]pirenu do dibenzo[a,h]pirenu) oraz 4 lekkich WWA (fenantrenu, antracenu, fluorantenu oraz pirenu) w badanych kawach naturalnych palonych, oznaczone przy wykorzystaniu metody GC-MS, przedstawiono na rycinie 1.



Ryc. 1. Średnia zawartość WWA w analizowanych kawach naturalnych palonych (µg/kg).

Fig. 1. Mean content of PAHs in the analysed roasted natural coffee (µg/kg).

Profil jakościowe zawartości WWA zarówno w kawach palonych Arabika, jak i Robusta charakteryzowały się przede wszystkim obecnością fenantrenu, antracenu, fluorantenu i pirenu, a więc lekkich WWA rekomendowanych do badań przez EPA. Z grupy WWA zalecanych do badań ich zawartości przez Komitet Naukowy ds. Żywności UE stwierdzono jedynie występowanie benzo[a]antracenu i chryzenu, a dodatkowo tylko w przypadku niektórych próbek 5-metylochryzenu, benzo[b]-i benzo[k]fluorantenu. Stwierdzono zatem, iż w zanieczyszczeniu kaw dominujący udział mają 4 lekkie poliareny, które stanowiły średnio ponad 92% sumarycznej zawartości WWA. Potwierdzono więc niewielki udział ciężkich WWA w zanieczyszczeniu analizowanych kaw naturalnych palonych. W żadnej z badanych próbek nie wykryto obecności benzo[a]pirenu oraz związków z grupy najbardziej kancerogennych WWA, a więc dibenzopirenów.

Pomiędzy poszczególnymi kawami w ramach dwóch analizowanych gatunków (Arabika oraz Robusta) zaobserwowano statystycznie istotne różnicowanie poziomów średniej sumarycznej zawartości 19 WWA. Spośród kaw palonych Arabika statystycznie najwyższą zawartością 19 poliarenow (14,43 µg/kg) charakteryzowała się kawa pochodząca z Peru. Średnia zawartość 19 poliarenow w kawie z Tanzanii osiągnęła poziom 7,83 µg/kg, podczas gdy w kawie pochodzącej z Brazylii wynosiła odpowiednio 6,15 µg/kg. W przypadku kaw Arabika z Etiopii oraz Indonezji oznaczone zawartości 19 WWA kształtowały się odpowiednio na poziomie 5,35 µg/kg i 5,47 µg/kg. Z grupy kaw palonych Robusta statystycznie najwyższą zawartością Σ 19 WWA cechowała się kawa pochodząca z Indii (18,19 µg/kg), podczas gdy

nieistotnie niższym poziomem kontaminacji odznaczała się kawa z Wybrzeża Kości Słoniowej (16,12 µg/kg). Sumaryczna zawartość poliarenowa w kawach z Ugandy, Indonezji oraz Wietnamu kształtowała się natomiast odpowiednio na poziomie 11,92 µg/kg, 8,48 µg/kg i 5,80 µg/kg (ryc. 1).

W badaniach kaw palonych przeprowadzonych przez *de Kruij'a* (3) benzo[a]piren został oznaczony na poziomie od 0,1 do 0,5 µg/kg produktu, a jego zawartość była uwarunkowana stopniem prażenia kawy. Według innych badań poziom zanieczyszczenia kaw mielonych oraz instant benzo[a]pirenem wahał się w zakresie od poniżej 0,01 µg/kg do 1,2 µg/kg, podczas gdy w kawach silnie palonych jego zawartość osiągnęła nawet 22,7 µg/kg (6, 7). Badania kaw palonych z rynku francuskiego wykazały ponadto, iż w puli wszystkich 11 oznaczonych WWA dominujący udział stanowią fenantren, piren oraz fluoranten, a poziom ich występowania osiągnął wartość od 10,0 do 25,0 µg/kg. Oznaczona natomiast zawartość 11 WWA (w tym 4 lekkich WWA i 7 kolejnych WWA z listy Komitetu Naukowego UE – od benzo[a]antracenu do benzo[g,h,i]perylenu) kształtowała się w zakresie od 21,8 do 64,7 µg/kg (6). Opisane w niniejszej pracy wyniki nie wykazują zatem istotnych różnic w odniesieniu do nadmienionych powyżej prac badawczych.

Opisane wyniki badań wskazują na bardzo duże zróżnicowanie poziomu zanieczyszczenia kaw w ramach ich dwóch analizowanych gatunków. Zróżnicowanie zawartości WWA w kawach naturalnych może wynikać z różnego stopnia zanieczyszczenia środowiska, jak również ze sposobu suszenia kawy po zbiorach. Badania przeprowadzone przez innych badaczy również wskazują na powyższe przyczyny dywersyfikacji zawartości WWA w kawach (4, 5, 8). Parametry prażenia kaw, a więc temperatura i czas oraz jego technika mogą przyczyniać się ponadto do istotnie różnych poziomów zawartości poliarenowa. Prażenie kaw zazwyczaj stosowane w przemyśle zachodzi przy temperaturze 185–190°C. Typowy proces prażenia można podzielić na trzy etapy. Pierwszy z nich stanowi etap suszenia, w temperaturze około 100°C, mający na celu obniżenie zawartości wody w ziarnie do kilku procent z 10–12% (charakterystycznych dla ziaren niepalonych). Następnie począwszy od około 170°C rozpoczyna się właściwy proces prażenia, podczas którego zachodzą reakcje pirolityczne, z którymi utożsamiany jest proces tworzenia WWA. W zależności od pożądanego efektu uprażenia, proces zakończony jest schłodzeniem ziaren (9, 10, 11, 12). Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, iż względnie niski poziom zanieczyszczenia analizowanych kaw palonych wynikał z zastosowania bardzo łagodnych warunków palenia. Można ponadto sądzić, iż zastosowanie temperatur rzędu 170°C–240°C, mogłoby skutkować zupełnie odmienną zależnością, a więc wzrostem poziomu zanieczyszczenia kaw palonych poliarenamami. Kawy prażone długo i w wysokiej temperaturze przybierają bowiem barwę prawie czarną, a oznaką silnego prażenia jest pęknięcie ziaren oraz występowanie tłuszczu na ich powierzchni, a w konsekwencji zapewne wyższej zawartości lipofilnych WWA (11, 13).

WNIOSKI

Uzyskane profile jakościowe i ilościowe zawartości WWA wskazują na środowiskowy charakter skażenia analizowanych kaw palonych. Zastosowanie łagodnych

warunków prażenia ziarna przy użyciu elektrycznego systemu grzewczego skutkuje względnie niskim poziomem kontaminacji kaw, co więcej nie stwarza warunków do tworzenia się WWA, w szczególności ciężkich poliarenow. Niskie sumaryczne zawartości WWA w analizowanych kawach palonych determinują również niskie poziomy zanieczyszczenia ich naparów.

M. Ciecierska, M. Obiedziński

DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS CONTENT
IN ROASTED NATURAL COFFEE BY GC-MS METHOD

Summary

The objective of this research was to determine the level of selected roasted natural coffee contamination by 19 PAHs (including 4 light PAHs listed by EPA and 15 PAHs listed by The Scientific Committee on Food UE). Methodology applied for this study consisted of fat extraction, extract's clean up using silica gel column, PAHs isolation from fat matrix by gel permeation chromatography (GPC) and their determination using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS).

In the quality profiles of coffee contamination predominant were light PAHs. Summary content of 19 PAHs in investigated coffee ranged from 5.35 to 18.19 µg/kg. The obtained quality and quantity profiles of PAHs indicate the environmental nature of coffee contamination. Furthermore, the use of mild parameters of roasting coffee beans by using the electrical heating system results in a relatively low level of contamination, and indeed does not create conditions for the formation of PAHs, particularly heavy polyarenes.

PIŚMIENNICTWO

1. 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. – 2. 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. – 3. *De Kruif N., Schouten T., Gerrit H., Van der Stegen D.*: Rapid determination of benzo(a)pyrene in roasted coffee and coffee brew by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.*, 1987; 35: 545-549. – 4. *Camargo M.C.R., Toledo M.C.F.*: Coffee and mate tea as a dietary source of polycyclic aromatic hydrocarbons in campinas. *Ciênc. Technol. Aliment.*, 2002; 22: 48-53. – 5. *Houessou J.K., Goujot D., Heyd B., Camel V.*: Modeling the formation of some polycyclic aromatic hydrocarbons during the roasting of Arabica coffee samples. *J. Agric. Food Chem.*, 2008; 56: 3648-3656. – 6. *Houessou J.K., Delteil C., Camel V.*: Investigation of sample treatment steps for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in ground coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 2006; 54: 7413-7421. – 7. *Lai J.P., Niessner R., Knopp D.*: Benz[a]pyrene imprinted polymers: synthesis, characterization and SPE application in water and coffee samples. *Analyt. Chim. Acta*, 2004; 522: 137-144. – 8. *Garcia-Falcón M.E., Cancho-Grande B., Simal-Gandara J.*: Minimal clean-up and rapid determination of PAHs in instant coffee. *Food Chem.*, 2005; 90: 643-647. – 9. *Franca A.S., Mendonca J.C.F., Oliveira S.D.*: Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT*, 2005; 38: 709-715. – 10. *Houessou J.K., Benac C., Delteil C., Camel V.*: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee brew using solid-phase extraction. *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53: 871-879.
11. *Yeretzian Ch., Jordan A., Badoud R.*: From the green bean to the cup of coffee: investigating coffee roasting by on-line monitoring of volatiles. *Eur. Food Res. Technol.*, 2002; 214: 92-104. – 12. *Rum L.*: Ilustrowany leksykon kawy. Wyd. Krupisz Poznań, 2004. – 13. *Matajszczyk E.*: Czynniki kształtujące jakość kawy mielonej. *Przem. Spoż.*, 2001; 55(1): 26-28.