

MARTA CIECIERSKA, MIECZYŚLAW OBIEDZIŃSKI

ZANIECZYSZCZENIE OLEJÓW ROŚLINNYCH WIELOPIERŚCIENIOWYMI WĘGLOWODORAMI AROMATYCZNYMI

Streszczenie

Celem pracy było określenie zanieczyszczenia wybranych olejów roślinnych przez 15 WWA wyszczególnionych na liście Komitetu Naukowego UE.

Materiał badawczy stanowiły: oliwa z oliwek extra virgin, oliwa z wyłoków oliwnych Pomace oraz oleje: rzepakowy i słonecznikowy (tłoczone i rafinowane). Metodyka badań obejmowała izolację WWA z matrycy tłuszczowej przy zastosowaniu techniki chromatografii żelowej oraz jakościowe i ilościowe oznaczenie związków przy użyciu chromatografii cieczowej z selektywnymi detektorami (HPLC–FLD/DAD).

Spośród przebadanych olejów najwyższą zawartość WWA stwierdzono w oleju z oliwek typu Pomace. Zanieczyszczenie tego oleju benzo[a]pirenem osiągnęło wartość ponad 30-krotnie wyższą od dopuszczalnego maksymalnego poziomu ustanowionego w Rozporządzeniu Komisji UE nr 208/2005 (2 µg/kg). W przypadku pozostałych olejów stwierdzona zawartość benzo[a]pirenu nie przekroczyła limitu 2 µg/kg. Wykazano, że zanieczyszczenie WWA oliwy typu Pomace była statystycznie istotnie wyższe od skażenia oliwy z oliwek extra virgin. W wyniku porównania zanieczyszczenia WWA tłoczonych olejów: rzepakowego i słonecznikowego oraz ich rafinowanych odpowiedników wykazano, iż oleje tłoczone charakteryzują się statystycznie istotnie wyższą zawartością WWA od olejów rafinowanych.

Słowa kluczowe: wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), oleje roślinne, zanieczyszczenia żywności

Wprowadzenie

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) stanowią bardzo zróżnicowaną i wszechobecną grupę zanieczyszczeń chemicznych występujących w środowisku człowieka. Mogą zanieczyszczać żywność nie tylko poprzez depozycję środowiskową, ale również w trakcie procesów obróbki termicznej, podczas których produkty termicznego rozkładu wchodzą w bezpośredni kontakt z produktem. Dowiedziono, że najważniejszą drogą ekspozycji człowieka na WWA jest żywność,

pośród której oleje i tłuszcze jadalne stanowią istotne źródło pobrania tych związków [1, 2, 6, 12, 13]. W licznych pracach badawczych wykazano, że ze względu na wszechobecność WWA w środowisku oraz ich lipofilny charakter, oleje i tłuszcze jadalne mogą zawierać znaczne ilości WWA [7]. Skażenie olejów roślinnych tą grupą kontaminantów jest głównie konsekwencją procesów przetwarzania roślin oleistych (suszenia surowców roślinnych przed właściwą ekstrakcją oraz użycia zanieczyszczonych rozpuszczalników ekstrakcyjnych), a w mniejszym stopniu skutkiem ich środowiskowego zanieczyszczenia [4, 5, 9].

Świadomość oddziaływania mutagennego, kancerogennego i genotoksycznego znacznej grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych spowodowała zainteresowanie wielu dziedzin naukowych tymi związkami, w tym nauki o żywności i żywieniu człowieka. Dotychczas w badaniach żywności podejmowano się oznaczania 16 WWA wg EPA (United States Environmental Protection Agency; EPA/540/1 – 86/013,1984). Stan wiedzy dotyczący występowania grupy związków określanych jako potencjalnie rakotwórcze i toksyczne jest jednak ograniczony. Odnosi się to w szczególności do takich związków, jak: cyklopenta[c,d]piren, dibenzo[a,e]piren, dibenzo[a,h]piren, dibenzo[a,i]piren, dibenzo[a,l]piren i 5-metylochryzen, a więc do znacznej grupy z 15 związków wytypowanych przez Komitet Naukowy ds. Żywności Komisji Europejskiej UE [3]. Zgodnie z zaleceniem Komisji Europejskiej 2005/108/EC z 4 lutego 2005 [11] niezbędne są we wszystkich krajach członkowskich dalsze badania poziomów benzo[a]pirenu i pozostałych związków należących do 15 WWA wymienionych w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 208/2005 [10] UE. Jedną z grup produktów spożywczych wykazujących skażenie WWA, wobec której ww. rozporządzenie ustanawia maksymalny poziom benzo[a]pirenu stanowią oleje i tłuszcze przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi.

Celem pracy było określenie zanieczyszczenia wybranych olejów roślinnych dostępnych na rynku przez 15 WWA, zgodnie z zaleceniem Komisji Europejskiej [11].

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły następujące oleje zakupione na lokalnym rynku: oliwa z oliwek extra virgin, oliwa z wytlóków oliwnych Pomace, oleje: rzepakowy i słonecznikowy (tłoczone oraz rafinowane). Badaniom poddano po 3 próbki każdego sortymentu. Każdą z 3 próbek tego samego oleju analizowano w 3 powtórzeniach.

Zastosowana metodyka badań obejmowała izolację WWA z matrycy tłuszczowej przy wykorzystaniu chromatografii preparatywnej oraz ilościowe i jakościowe oznaczenie związków przy użyciu chromatografii cieczowej z selektywnymi detektorami (HPLC–FLD/DAD).

W celu oddzielenia frakcji WWA od frakcji tłuszczowej ściśle określoną naważkę oleju roślinnego rozpuszczonego w cykloheksanie poddawano rozdzielowi, stosując kolumnę do chromatografii żelowej Bio-Beads S–X3 330x10 mm. Do rozdzielu wprowadzano 1 cm³ roztworu oleju w cykloheksanie (100 mg/cm³). Rozdziel

prowadzono metodą izokratyczną przy przepływie 0,8 ml/min, a fazę ruchomą stanowiła mieszanina cykloheksan : octan etylu (50 : 50, v/v).

Zebraną frakcję WWA po zateżeniu do objętości 1 cm³ poddawano analizie metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej przy użyciu aparatu HPLC Shimadzu 2010, składającego się z pompy LC-10AT_{VP}, detektora diodowego SPD-M10A_{VP}, detektora fluorescencyjnego RF-10A_{XL}, degazera DGU-14A, autosamplera SIL-10AD_{VP} oraz kontrolera SCL-10A_{VP}, współpracującego z systemem do zbierania i przetwarzania danych LabSolution 2.1. Rozdział prowadzono z zastosowaniem kolumny chromatograficznej Supelcosil LC-PAH 250 x 4,6 mm, 5 μm firmy Supelco-Sigma. Temp. termostataowania kolumny wynosiła 30°C. Analizy wykonywano metodą gradientową przy przepływie 1,2 ml/min, stosując mieszaninę acetonitryl : woda, 80 : 20 (A) oraz acetonitryl (B). Zastosowano następujący program elucji gradientowej: 0 – 5 min 0%B, 5 – 28 min 0%B do 100%B, 28 – 70 min 100%B.

Warunki detekcji: detektor diodowy – 254 nm; detektor fluorescencyjny – zmienne nastawienia wzbudzenia i emisji (Ex/Em): 270/420, 270/500, 270/470 nm. Analizę jakościowo-ilościową wykonano metodą standardów zewnętrznych, które stanowiły mieszaninę 15 WWA.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu komputerowego Statgraphics Plus 4.1. Ocenę istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi wykonano stosując test Tukey'a, przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$, gdzie $n = 9$.

Wyniki i dyskusja

Średnie zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w badanych olejach roślinnych przedstawiono w tab. 1.

Spośród wszystkich olejów roślinnych, oliwa z oliwek jest wysoce ceniona nie tylko ze względu na jej walory sensoryczne, ale również właściwości odżywcze oraz prozdrowotne. Jednakże może stanowić istotne źródło pobrania WWA z żywnością. Z przebadanych w niniejszej pracy olejów, oliwa z wyłoków oliwnych typu Pomace wykazała największą zawartość WWA (233,59 μg/kg). Zanieczyszczenie tego oleju benzo[a]pirenem osiągnęło wartość ponad 30-krotnie wyższą od dopuszczalnego maksymalnego poziomu ustanowionego w Rozporządzeniu Komisji UE (2 μg/kg). Zawartość dibenzo[a,l]pirenu – najbardziej kancerogennego ze wszystkich dotychczas poznanych WWA wyniosła ok. 1,92 μg/kg. Guillen i wsp. w badaniach oliwy z wyłoków oliwnych typu Pomace pobranych z rynku hiszpańskiego stwierdzili występowanie benzo[a]pirenu w granicach od 0,35 do 92,71 μg/kg [4]. Według badaczy wysoka zawartość policyklicznych węglowodorów w oliwie typu Pomace

Tabela 1

Średnia zawartość 15 wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w badanych olejach roślinnych [$\mu\text{g}/\text{kg}$].
 Mean content of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plant oils under investigation [$\mu\text{g}/\text{kg}$].

WWA PAH	Oliwa z oliwek extra virgin Extra virgin olive oil	Oliwa z wyłoków oliwnych Olive Pomace oil	Olej rzepakowy tłoczony Pressed rapeseed oil	Olej rzepakowy rafinowany Refined rapeseed oil	Olej słonecznikowy tłoczony Pressed sunflower oil	Olej słonecznikowy rafinowany Refined sunflower oil
Cyklopenta[c,d]piren Cyclopenta[c,d]pyrene	n.w./ n.d.	59,53 \pm 6,75	23,31 \pm 2,00	n.w./ n.d.	27,76 \pm 2,34 ^{a3}	17,30 \pm 0,91 ^{A3}
Benzo[a]antracen Benzo[a]anthracene	1,07 \pm 0,08 ^{a1}	8,07 \pm 0,18 ^{A1}	1,51 \pm 0,19 ^{a2}	0,77 \pm 0,07 ^{A2}	3,30 \pm 0,31 ^{b3}	1,06 \pm 0,12 ^{B3}
Chryzen / Chrysene	1,09 \pm 0,08 ^{b1}	8,61 \pm 0,18 ^{B1}	1,73 \pm 0,21 ^{b2}	0,91 \pm 0,04 ^{B2}	4,32 \pm 0,38 ^{c3}	1,25 \pm 0,14 ^{C3}
5-Metylochryzen 5-Metylchrysene	0,43 \pm 0,02 ^{c1}	8,69 \pm 0,96 ^{C1}	0,57 \pm 0,08 ^{c2}	0,41 \pm 0,06 ^{C2}	0,59 \pm 0,05 ^{d3}	0,51 \pm 0,09 ^{D3}
Benzo[j]fluoranten Benzo[j]fluoranthene	1,04 \pm 0,13 ^{d1}	13,30 \pm 0,69 ^{D1}	1,75 \pm 0,10 ^{d2}	1,04 \pm 0,11 ^{D2}	4,12 \pm 0,38 ^{e3}	1,00 \pm 0,15 ^{E3}
Benzo[b]fluoranten Benzo[b]fluoranthene	0,74 \pm 0,03 ^{e1}	18,52 \pm 1,97 ^{E1}	1,41 \pm 0,14 ^{e2}	0,68 \pm 0,07 ^{E2}	3,67 \pm 0,32 ^{f3}	1,05 \pm 0,11 ^{F3}
Benzo[k]fluoranten Benzo[k]fluoranthene	0,46 \pm 0,05 ^{f1}	13,17 \pm 0,68 ^{F1}	0,78 \pm 0,04 ^{f2}	0,43 \pm 0,03 ^{F2}	1,89 \pm 0,21 ^{g3}	0,41 \pm 0,02 ^{G3}
Benzo[a]piren Benzo[a]pyrene	0,34 \pm 0,05 ^{g1}	61,08 \pm 0,95 ^{G1}	0,60 \pm 0,04 ^{g2}	0,35 \pm 0,06 ^{G2}	1,61 \pm 0,22 ^{h3}	0,44 \pm 0,04 ^{H3}
Dibenzo[a,h]antracen Dibenzo[a,h]anthracene	n.w./ n.d.	6,29 \pm 0,62	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.
Dibenzo[a,l]piren Dibenzo[a,l]pyrene	n.w./ n.d.	1,92 \pm 0,23	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.

c.d. tab. 1

Benzo[g,h,i]perylene Benzo[g,h,i]perylene	0,52 ± 0,03 ^{h1}	12,94 ± 0,23 ^{H1}	0,93 ± 0,10 ^{h2}	0,45 ± 0,02 ^{H2}	0,79 ± 0,12 ⁱ³	0,43 ± 0,02 ^{I3}
Indeno[c,d]piren Indeno[c,d]pyrene	1,00 ± 0,10 ⁱ¹	15,90 ± 1,58 ^{I1}	1,05 ± 0,11	n.w./ n.d.	1,56 ± 0,17	n.w./ n.d.
Dibenzo[a,e]piren Dibenzo[a,e]pyrene	n.w./ n.d.	5,58 ± 0,19	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	0,48 ± 0,08	n.w./ n.d.
Dibenzo[a,i]piren Dibenzo[a,i]pyrene	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.
Dibenzo[a,h]piren Dibenzo[a,h]pyrene	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.
Σ 15WWA/ Σ 15PAHs	6,69 ± 0,20 ^{j1}	233,59 ± 9,23 ^{J1}	33,64 ± 2,18 ⁱ²	5,04 ± 0,34 ^{I2}	50,09 ± 2,03 ⁱ³	23,45 ± 1,32 ^{I3}

Objaśnienia:/ Explanatory notes:

- wartość średnia/ mean value; SD – odchylenie standardowe/ standard deviation;

n.w./ n.d. – nie wykryto/ not detected;

a1, A1; b2, B2; c3, C3 – ta sama mała oraz duża litera przy tej samej cyfrze (czyli w ramach jednego z 3 porównań) w indeksach dwóch wartości średnich oznaczają statystycznie istotną różnicę między średnimi na poziomie $\alpha = 0,5$ / the same small and capital letters by the same number (within one from 3 comparisons) in indices of two mean values denote statistically significant difference between means at $\alpha = 0.05$ level.

jest przede wszystkim wynikiem procesu produkcji, który wymaga zredukowania zawartości wody w miazdze przed procesem ekstrakcji oleju, a więc jest wynikiem stosowania zabiegów bezprzeponowego suszenia miazgi jako zabiegu wstępnego do pozyskania pozostałej oliwy [3, 4, 10].

Zarówno zawartość każdego z 15 WWA, jak i ich sumaryczna zawartość w oliwie z oliwek extra virgin (uzyskanej bezpośrednio z oliwek wyłącznie za pomocą tłoczenia) okazała się statystycznie istotnie mniejsza odpowiednio od zawartości tych samych związków i sumarycznych ich zawartości w oliwie z wyłoków oliwnych Pomace. Stwierdzenie to znajduje potwierdzenie w badaniach Guillen i wsp. [4], którzy wykazali zdecydowanie wyższe zawartości WWA w oliwie Pomace w porównaniu z innymi olejami pochodzącymi z oliwek, co było zdeterminowane technologią pozyskiwania tego typu oliwy.

Stwierdzono, że zawartość benzo[a]pirenu we wszystkich badanych olejach z wyjątkiem oliwy typu Pomace nie przekroczyła limitu 2 µg/kg. Porównanie sumarycznego skażenia policyklicznymi węglowodorami aromatycznymi pozwoliło uszeregować badane oleje w kolejności od najwyższej do najniższej ich zawartości: oliwa z wyłoków oliwnych typu Pomace – 233,59 µg/kg, olej słonecznikowy tłoczony – 50,09 µg/kg, olej rzepakowy tłoczony – 33,64 µg/kg, olej słonecznikowy rafinowany – 23,45 µg/kg, oliwa z oliwek extra virgin – 6,69 µg/kg oraz olej rzepakowy rafinowany – 5,04 µg/kg.

Analiza statystyczna tłoczonych olejów: rzepakowego, słonecznikowego i ich rafinowanych odpowiedników wykazała, że zawartość poszczególnych WWA, a także ich suma w oleju rzepakowym i słonecznikowym tłoczonym była statystycznie istotnie wyższa od zawartości poszczególnych WWA, jak i od ich sumarycznej zawartości w odpowiadającym im olejach rafinowanych. Zatem badania potwierdziły, że w technologii przetwórstwa roślin oleistych proces rafinacji powoduje znaczące zredukowanie zawartości WWA. W licznych pracach naukowych wykazano, że zabieg dezodoryzacji redukuje ilość tzw. lekkich WWA (składających się maksymalnie z 4 pierścieni aromatycznych i przede wszystkim należących do grupy 16 WWA wg EPA), natomiast zawartość tzw. ciężkich WWA (stanowiących większość z 15 związków wytypowanych przez Komitet Naukowy UE) ulega redukcji na skutek bielenia za pomocą węgla aktywnego [2, 5, 7, 8, 9, 13].

Wnioski

1. Największe zanieczyszczenie WWA stwierdzono w oleju z wyłoków oliwnych typu Pomace. Zawartość benzo[a]pirenu przekroczyła ponad 30-krotnie dopuszczalny maksymalny poziom tego związku ustanowiony w Rozporządzeniu Komisji UE (2µg/kg).

2. Zanieczyszczenie WWA oliwy z wyłóków oliwnych Pomace było statystycznie istotnie wyższe od skażenia oliwy z oliwek extra virgin.
3. Zawartość benzo[a]pirenu w pozostałych badanych olejach nie przekroczyła limitu 2 µg/kg.
4. Oleje tłoczone (słonecznikowy oraz rzepakowy) charakteryzowały się statystycznie istotnie wyższą zawartością WWA od ich rafinowanych odpowiedników.

Literatura

- [1] Barranco A., Alonso-Salces R.M., Bakkali A., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F., Sarobe M.: Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. *J. Chromatogr. A*, 2003, **988**, 33-40.
- [2] Cejpek K., Hajslova J., Kocourek V., Tomaniova M., Cmolik J.: Changes in PAH levels during production of rapeseed oil. *Food Add. Contam.*, 1998, **15**, 563-574.
- [3] European Commission: Opinion of the Scientific Committee on food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons in food (expressed on 4 December 2002).
- [4] Guillen M., Sopolana P., Palencia G.: Polycyclic aromatic hydrocarbons and olive Pomace oil. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 2123-2132.
- [5] Lage Yusty M.A., Cortizo Daviña J.L.: Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for PAHs investigation in vegetable oils. *Food Cont.*, 2005, **16**, 59-64.
- [6] Matter L. (ed.): *Food and Environmental Analysis by Capillary Gas Chromatography*. Huthig, Heidelberg 1997, pp. 75-79.
- [7] Moret S., Conte L. S.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. *J. Chromatogr. A*, 2000, **882**, 245-253.
- [8] Moret S., Dudine A., Monte L.S.: Processing effects on the polyaromatic hydrocarbons content of grapeseed oil. *J. Americ. Oil Chem. Society*, 2000, **77/12**, 1289-1292.
- [9] Moret S., Purcaro G., Conte L. S.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils from canned foods. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2005, **107**, 488-496.
- [10] Official Journal of the European Union, L 34/3, Commission Regulation (EC) No. 208/2005 of 4 February 2005.
- [11] Official Journal of the European Union, L 34/3, Commission Recommendation 2005/108/EC of 4 February 2005.
- [12] Philips D.H.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research*, 1999, **443**, 139-147.
- [13] Vazquez Troche S., Garcia Falcon M.S., Gonzales Amigo S., Lage Yusty M.A., Simal Lozano J.: Enrichment of benzo[a]pyrene in vegetable oils and determination by HPLC-FL. *Talanta*, 2000, **51**, 1069-1076.

VEGETABLE OILS CONTAMINATION BY POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS**S u m m a r y**

The objective of this study was evaluation of contamination of vegetable oils by 15 PAHs, listed by The Scientific Committee on Food UE.

The material investigated were extra virgin olive oil, olive Pomace oil and rapeseed and sunflower oils (both pressed and refined). Methodology applied for the study consisted of PAHs isolation from the oil samples using GPC – gel permeation chromatography and qualitative-quantitative compound's determination by high pressure liquid chromatography with selective detectors (HPLC–FLD/DAD).

Among all oils under investigation olive Pomace oil showed the highest content of PAHs. Contamination of this oil by benzo[a]pirene was over 30-times higher than maximum tolerable limit stated in Commission Regulation (EC) No. 208/2005 (2 µg/kg). In case of others oils benzo[a]pirene's content didn't exceed the limit of 2 µg/kg. It was shown that olive Pomace oil's contamination was statistically significant higher than extra virgin olive oil's contamination. Moreover comparison of pressed oils: rapeseed and sunflower and their refined equivalents proved that pressed oils had statistically significant higher content of PAHs than refined ones.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), vegetable oils, food contaminants ☒