

MARTA CIECIERSKA, MIECZYŚLAW OBIEDZIŃSKI, MARTA ALBIN

ZANIECZYSZCZENIE HERBATEK OWOCOWYCH I ZIOŁOWYCH WIELOPIERŚCIENIOWYMI WĘGLOWODORAMI AROMATYCZNYMI

Streszczenie

Celem pracy było określenie zanieczyszczenia wybranych rodzajów herbatek owocowych i ziołowych przez WWA, w tym 4 związki z grupy tzw. lekkich WWA wg EPA oraz 15 związków wytypowanych do badań przez Komitet Naukowy UE.

Materiał badawczy stanowiły popularne gatunki handlowe herbatek owocowych i ziołowych. Metodyka badań obejmowała wyizolowanie WWA z matrycy żywnościowej, oczyszczenie ekstraktu ze związków interferujących poprzez zastosowanie chromatografii żelowej (GPC) oraz jakościowe i ilościowe oznaczenie WWA przy użyciu chromatografii cieczowej z selektywnymi detektorami (HPLC–FLD/DAD).

Stwierdzono istotne zróżnicowanie poziomów zanieczyszczenia poszczególnych gatunków handlowych w grupie herbatek owocowych, jak również ziołowych. Zaobserwowano natomiast zbliżone profile jakościowe zawartości WWA z bardzo wysokim udziałem lekkich WWA w sumarycznej zawartości tych związków.

W analizowanych herbatkach nie wykryto obecności benzo[a]pirenu oraz najbardziej kancerogennych węglowodorów, a więc dibenzopirenów.

Słowa kluczowe: WWA, herbatki owocowe, herbatki ziołowe, zanieczyszczenia żywności

Wprowadzenie

Wiele prac naukowych poświęca się badaniom właściwości zarówno herbat, jak i tzw. herbatek owocowych oraz ziołowych. Dowiedziono prozdrowotnych właściwości składników w nich zawartych, a w szczególności ich oddziaływania przeciwutleniającego [2, 7, 9, 11, 14]. W surowcach rolno-spożywczych, także tych, z których produkuje się herbatki owocowe i ziołowe, mogą jednak występować substancje niepożądane, stanowiące zagrożenie dla zdrowia człowieka. Przede wszystkim są to zanieczysz-

Mgr inż. M. Ciecierska, prof. dr hab. M. Obiedziński, M. Albin, Katedra Mikrobiologii, Biotechnologii i Oceny Żywności, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

czenia atmosferyczne pochodzenia przemysłowego i antropogenicznego, w tym wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA). Związki te skondensowane na cząsteczkach pyłów unoszących się w powietrzu mogą osadzać się na powierzchni roślin i owoców rolnych lub w postaci par wnikać do ich wnętrza podczas respiracji [6]. Ponadto rozpowszechnione w świecie roślinnym związki o charakterze lipidowym, a więc lotne olejki eteryczne, występujące w znaczących ilościach w herbatkach owocowych i ziołowych, mogą przyczyniać się do kumulacji hydrofobowych WWA [12]. W przypadku herbat powszechnie sądzi się, że ich zanieczyszczenie poliarenamami może być zarówno konsekwencją środowiskowego skażenia materiału roślinnego, jak i procesu suszenia surowca [8]. Powyższe czynniki mogą również w sposób analogiczny różnicować poziom zanieczyszczenia herbatki owocowych i ziołowych. Obecny stan wiedzy dowodzący genotoksycznego, mutagennego i kancerogennego działania WWA [4] powoduje, że zgodnie z zaleceniem Komisji Europejskiej 2006/108/EC z 4 lutego 2005 [10] 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.

Celem pracy było zatem określenie zanieczyszczenia wybranych gatunków handlowych herbatki owocowych oraz ziołowych dostępnych na rynku przez WWA, w tym 4 związki z grupy tzw. lekkich WWA (należących do listy 16 WWA rekomendowanych do badań przez EPA) oraz 15 WWA wytypowanych przez Komitet Naukowy UE zgodnie z zaleceniem Komisji Europejskiej.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły herbatki owocowe i ziołowe polskiego producenta zakupione na lokalnym rynku. Analizowano następujące herbatki owocowe: z dzikiej róży (*Rosa canina*), żurawinową (*Oxycoccus palustris*), jagodową (borówka czernica - *Vaccinium myrtillus*), malinową (*Rubus idaeus*) oraz ziołowe: lipową (*Tilia mordata*), miętową (*Mentha longifolia*), z bratka (*Viola wittrockiana*) i z melisy (*Melissa officinalis*). Badaniom poddano po 3 próbki każdego rodzaju herbatki. Każdą z 3 próbek tego samego rodzaju analizowano w 3 powtórzeniach.

Zastosowana metodyka badań obejmowała ekstrakcję WWA z matrycy żywnościowej, następnie oczyszczenie ekstraktu ze związków interferujących przy wykorzystaniu chromatografii preparatywnej (GPC) oraz jakościowe i ilościowe oznaczenie związków techniką chromatografii cieczowej z selektywnymi detektorami (HPLC-FLD/DAD).

Naważkę herbatki owocowej lub ziołowej zalewano 100 ml mieszaniny heksan/aceton (60 : 40, v/v) i umieszczano w łaźni ultradźwiękowej (30 min). Uzyskany ekstrakt po przefiltrowaniu zagęszczano do kropli rozpuszczalnika, 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 x 7,8 mm, 5 μ m. Do rozdziału wprowadzano 1 ml uprzednio przygotowanej mieszaniny. Rozdział 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 zagęszczeniu oraz rozpuszczeniu w 1 ml acetonitrylu poddawano analizie metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej przy użyciu aparatu HPLC Shimadzu 2010, składającego się z pompy LC-10ATVP, detektora diodowego SPD-M10AVP, detektora fluorescencyjnego RF-10AXL, degazera DGU-14A, autosamplera SIL-10ADVP oraz kontrolera SCL-10AVP, współpracującego z systemem do zbierania i przetwarzania danych LabSolution 2.1. Rozdział prowadzono z zastosowaniem kolumny chromatograficznej BAKERBOND PAH-16Plus 250 x 3 mm, 5 μ m firmy WITKO – Baker. Temp. termostataowania kolumny wynosiła 30 °C. Analizy wykonywano metodą gradientową przy przepływie 0,5 ml/min, stosując mieszaninę acetonitryl : woda, 50 : 50 (A) oraz acetonitryl (B). Zastosowano następujący program elucji gradientowej: 0 - 25 min 30 % B, 25 - 50 min 30 % B do 100 % B, 50 - 68,5 min 100 % B.

Warunki detekcji: detektor diodowy – 254 nm; detektor fluorescencyjny – zmienne nastawienia wzbudzenia i emisji (Ex/Em): 256/370, 270/420, 270/500, 270/470 nm. Analizę jakościowo-ilościową wykonywano metodą standardów zewnętrznych, które stanowiły mieszaninę 15 WWA wg KN UE oraz 4 lekkich WWA z listy EPA.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu komputerowego Statgraphics Plus 4.1. Ocenę istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi sumarycznej zawartości WWA w grupie herbatek owocowych oraz ziołowych wykonano stosując test Tukey'a, przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Pomiędzy poszczególnymi gatunkami handlowymi w grupie herbatek owocowych, jak również ziołowych, stwierdzono statystycznie istotne zróżnicowanie poziomów sumarycznej zawartości WWA (tab. 1). Spośród herbatek owocowych statystycznie najniższy poziom zanieczyszczenia WWA odnotowano w herbatce malinowej (9,17 μ g/kg), natomiast najwyższy w herbatce żurawinowej (89,88 μ g/kg). Surowcem do produkcji tej herbatki jest owoc żurawiny, będący kulistą czerwoną jagodą ze skórką, pokrytą warstwą wosku. Naturalne jest, że związki lipidowe podnoszą rozpuszczalność zanieczyszczeń hydrofobowych w badanym materiale, co może mieć wpływ na jego większe zanieczyszczenie przez WWA, w porównaniu z innymi herbatkami owocowymi. Poziom sumarycznego skażenia herbatki jagodowej nie różnił się statystycznie istotnie od poziomu skażenia herbatki z dzikiej róży. W grupie herbatek ziołowych najmniejszą sumaryczną zawartość WWA wykazała herbatka miętowa (57,00 μ g/kg).

Tabela 1

Średnia zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w herbatkach owocowych i ziołowych [$\mu\text{g}/\text{kg}$].
Mean content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fruit and herbal teas [$\mu\text{g}/\text{kg}$].

WWA PAHs	Herbatki owocowe / Fruit teas					Herbatki ziołowe / Herbal teas				
	Dzika róża Rosehip	Żurawina Cranberry	Jagoda Bilberry	Malina Raspberry	Lipa Lime	Bratek Pansy	Mięta Mint	Melisa Lemon balm		
Fen	6,76 ± 0,58	36,34 ± 10,07	8,72 ± 0,87	2,77 ± 0,45	26,41 ± 1,00	43,49 ± 0,93	26,96 ± 4,42	31,86 ± 1,88		
Antr	0,52 ± 0,06	4,26 ± 1,16	3,77 ± 0,38	0,29 ± 0,01	5,06 ± 0,23	6,78 ± 0,39	2,62 ± 0,72	5,52 ± 0,42		
Flu	6,91 ± 1,04	30,63 ± 8,94	5,65 ± 0,53	2,77 ± 0,15	43,01 ± 1,54	39,43 ± 2,47	11,68 ± 1,60	30,54 ± 1,61		
Pir	2,54 ± 0,28	4,06 ± 0,19	2,31 ± 0,22	1,54 ± 0,10	21,45 ± 0,47	2,30 ± 0,06	6,73 ± 1,25	14,48 ± 0,99		
C[cd]p	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.	n.w./ n.d.		
B[a]a	0,36 ± 0,07	4,08 ± 0,77	0,56 ± 0,05	0,30 ± 0,01	4,55 ± 0,14	4,17 ± 0,20	2,17 ± 0,38	2,64 ± 0,15		
Chr	1,01 ± 0,12	6,29 ± 1,46	0,84 ± 0,06	0,35 ± 0,02	7,74 ± 0,33	8,22 ± 0,33	4,00 ± 0,61	3,57 ± 0,33		
5-MChr	0,46 ± 0,04	2,91 ± 0,64	0,27 ± 0,02	1,16 ± 0,05	0,82 ± 0,04	1,96 ± 0,01	1,62 ± 0,04	0,90 ± 0,07		
B[b]f	0,25 ± 0,10	n.w./ n.d.	0,24 ± 0,01	n.w./ n.d.	1,51 ± 0,16	0,97 ± 0,51	0,69 ± 0,06	n.w./ n.d.		
B[k]f	0,22 ± 0,02	1,32 ± 0,48	0,30 ± 0,02	n.w./ n.d.	1,94 ± 0,71	1,60 ± 0,49	0,52 ± 0,10	0,97 ± 0,50		
ΣWWA ΣPAHs	19,02 ± 2,20 ^{b1}	89,88 ± 18,90 ^{c1}	22,67 ± 2,12 ^{b1}	9,17 ± 0,69 ^{a1}	112,48 ± 3,35 ^{c2}	108,93 ± 4,37 ^{c2}	57,00 ± 8,85 ^{a2}	90,49 ± 5,49 ^{b2}		

Objaśnienia: / Explanatory notes:

Fen - Fenantren / Phenantrene; Antr - Antracen / Anthracene; Flu - Fluoranten / Fluoranthene; Pir - Pirene / Pyrene; C[cd]p - Cyklopenta[c,d]piren / Cyclopenta[c,d]pyrene; B[a]a - Benzo[a]antracen / Benzo[a]anthracene; Chr - Chryzen / Chrysene; 5-MChr - 5-Metylochryzen / 5-Methylchrysene; B[b]f - Benzo[b]fluoranten / Benzo[b]fluoranthene; B[k]f - Benzo[k]fluoranten / Benzo[k]fluoranthene.

W badanych herbatkach owocowych i ziołowych nie wykryto następujących WWA: / In the fruit and herbal teas, the following PAHs were not detected:
B[j]f - Benzo[j]fluoranten / Benzo[j]fluoranthene; B[a]p - Benzo[a]piren / Benzo[a]pyrene; D[ah]a - Dibenzo[a,h]antracen / Dibenzo[a,h]anthracene;
D[al]p - Dibenzo[a,l]piren / Dibenzo[a,l]pyrene; B[ghi]p - Benzo[g,h,i]perylen / Benzo[g,h,i]perylene; I[cd]p - Indeno[1,2,3-c,d]piren / Indeno[1,2,3-c,d]pyrene;
D[la]p - Dibenzo[a,l]piren / Dibenzo[a,l]pyrene; D[ah]p - Dibenzo[a,h]piren / Dibenzo[a,h]pyrene;

n.w./ n.d. – nie wykryto/ not detected; a1, b1, c1; a2, b2, c2 – wartości średnie oznaczone różnymi literami przy tej samej liczbie (czyli w ramach jednego z 2 porównań sumarycznej zawartości WWA) oznaczają statystycznie istotną różnicę między średnimi na poziomie $\alpha = 0,5$ / the mean values marked with different letters at the same figure (i.e. within the one of 2 comparisons of the total PAHs content) represent a statistically significant difference between them at $\alpha = 0,05$ level.

Najwyższym poziomem skażenia poliarenammi odznaczała się herbatka lipowa (112,48 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Po przeprowadzeniu analizy statystycznej stwierdzono, że herbatka z bratka wykazała statystycznie nieistotnie mniejszą zawartość WWA w porównaniu z herbatką lipową. Zaobserwowano ponadto, że średnie sumaryczne skażenie herbatek ziołowych (92,23 $\mu\text{g}/\text{kg}$) było ponad dwukrotnie wyższe niż herbatek owocowych. Duży wpływ na wielkość skażenia poliarenammi może mieć morfologia i właściwości fizjologiczne liści oraz bliskość źródeł środowiskowego skażenia [5]. Liście mięty, ogonkowe i podłużnie jajowate, zawierają szczególnie duże ilości olejków eterycznych (1,5 - 3,5 %). Są też nieznacznie owłosione i zawierają szparki respiracyjne. Liść melisy zawiera mniej olejku eterycznego (ok. 0,1 %, głównie cytralu), natomiast ma większą powierzchnię z uwagi na sercowaty lub szeroko jajowaty kształt oraz ma więcej włosków, co może sprzyjać skażeniu WWA. Duży poziom zanieczyszczenia herbatki bratkowej może także wynikać ze specyfiki surowca wykorzystywanego do jej produkcji. Są to długo ogonkowe różnokształtne liście, pokryte stożkowymi włoskami z prążkowaną kutykulą, niektóre wypełnione śluzem [13], co również wpływa na stopień kumulacji hydrofobowych WWA. W przeciwieństwie do mięty i melisy, kwiatostan lipy pozyskiwany jest wyłącznie ze stanowisk naturalnych. Lipa drobnolistna jest bowiem pospolitym drzewem, rosnącym wzdłuż ulic i dróg, zatem poziom skażenia herbatki lipowej może wynikać przede wszystkim ze środowiskowego skażenia surowca.

Stwierdzone w niniejszej pracy bardzo duże zróżnicowanie poziomów skażenia herbatek poliarenammi znajduje potwierdzenie w badaniach Lin i wsp. [8]. Wykazali oni, że w różnych rodzajach herbat, w tym herbatkach ziołowych sumaryczna zawartość 16 WWA (wg listy EPA) zawierała się w granicach od 323 do 8800 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Badania wykonane przez Schlemitz i Pfannhausera [12] również potwierdziły zróżnicowany zakres poziomów zanieczyszczenia różnych rodzajów herbatek ziołowych i owocowych przez WWA. Najmniej zanieczyszczoną 16 WWA wg listy EPA była herbata koperkowa (13,41 $\mu\text{g}/\text{kg}$) oraz wieloowocowa (17,53 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Z kolei Ciemniak [3] wykazał najmniejszą sumaryczną zawartość 16 WWA (wg listy EPA) w herbatkach z hibiskusa (48,23 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Analogicznie do wyników uzyskanych w niniejszej pracy, najbardziej zanieczyszczoną okazała się herbatka lipowa, w której sumaryczna zawartość 16 WWA wynosiła 1040,47 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a dominujący udział miały lekkie węglowodory [3].

Profile jakościowe zawartości WWA w analizowanych herbatkach charakteryzowały się obecnością fenantrenu, antracenu, fluorantenu i pirenu, a więc lekkich WWA rekomendowanych do badań przez EPA oraz benzo[a]antracenu, chryzenu, 5-metylchryzenu, benzo[b]fluorantenu, benzo[k]fluorantenu, należących do grupy poliarenow zalecanych do badań przez Komitet Naukowy ds. Żywności UE. W analizowanych herbatkach nie wykryto obecności benzo[a]pirenu oraz najbardziej kancerogennych WWA, a więc dibenzopirenów. Stwierdzono, że lekkie WWA, a więc węglo-

wodory dwu-, trzy- i czteropierścieniowe, miały dominujący udział w całkowitej puli WWA (od ok. 96,9 do 100 %). Wykazano więc bardzo niewielki udział ciężkich węglowodorów, wykazujących właściwości kancerogenne w zanieczyszczeniu analizowanych herbatek. Znajduje to potwierdzenie w innych badaniach naukowych [1, 3, 8]. Uzyskane profile jakościowe i ilościowe WWA jednoznacznie wskazują na środowiskowy charakter skażenia herbatek.

Wnioski

1. Stwierdzono istotne zróżnicowanie poziomów sumarycznej zawartości WWA pomiędzy poszczególnymi herbatkami w grupie herbatek owocowych, jak i ziołowych.
2. Uzyskano zbliżone profile jakościowe zawartości WWA z bardzo wysokim udziałem lekkich WWA. Stanowiły one od ok. 96,9 do 100 % sumarycznej zawartości WWA.
3. W analizowanych herbatkach nie wykryto obecności benzo[a]pirenu oraz związków zaliczanych do najbardziej kancerogennych WWA, a więc dibenzopirenow.

Praca, realizowana w ramach grantu KBN nr 501 0928 00 29, była prezentowana podczas VI Konferencji Naukowej nt. „Nowoczesne metody analityczne w zapewnieniu jakości i bezpieczeństwa żywności”, Warszawa, 6 - 7 grudnia 2007 r.

Literatura

- [1] 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. *Environm Monit and Assesm*, 2005, **107**, 399-406.
- [2] Bylka W., Witkowska-Banaszczak E.: Zawartość flawonoidów w owocach żurawiny błotnej I wielkoowocowej. *Herba Polonica*, 2007, **53 (2)**, 122.
- [3] Ciemniak A.: Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne w herbatach ziołowych i owocowych. *Roczn. PZH*, 2005, **56 (4)**, 317-322.
- [4] 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), http://ec.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html
- [5] Franzaring J., Eerden L.J.: Accumulation of airborne persistent organic pollutants (POPs) in plant. *Basic Appl. Ecol.*, 2000, **1**, 25-30.
- [6] Jánková M., Hajslová J., Tomaniová M., Kocourek V., Vávrová M.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in fruits and vegetables grown in the Czech Republic. *Environm Contam and Toxicol.*, 2006, **77**, 492-499.
- [7] Kuroda Y., Hara Y.: Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutat. Research*, 1999, **436**, 69-97.
- [8] Lin D., Tu Y., Zhu L.: Concentrations and health risk of PAHs in tea. *Food Chem Toxicol.*, 2005, **43**, 41-48.

- [9] Mojska H., Nalewczyńska M., Orłowska K., Szponar L.: Rośliny lecznicze jako składniki żywności. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2003, **36 (Supl.)**, 5-12.
- [10] Commission Recommendation 2005/108/EC of 4 February 2005 on the further investigation into the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in certain foods. *O.J. EU*, L 34/3.
- [11] Pittler M.H.: Evidence of effectiveness for popular herbal medicines. *Herba Polonica*, 2005, **51 (1/2)**, 60-65.
- [12] 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.
- [13] Senderski M.E.: *Prawie wszystko o ziołach*. Wyd. Senderski, Podkowa Leśna 2004.
- [14] Vinson J.A., Dabbagh Y.A.: Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutrit Research*, 1998, **18**, 1067-1075.

CONTAMINATION OF FRUIT AND HERBAL TEAS WITH POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS

S u m m a r y

The objective of this research was to determine the contamination of fruit and herbal teas with PAHs, among other things with 4 compounds from the group of light PAHs listed by EPA, and 15 compounds listed by The EU Scientific Committee on Food.

The material investigated were popular brands of fruit and herbal teas. The methodology applied to the study consisted of the following: isolation of PAHs from a food matrix, purification of the extract in order to remove interfering compounds by a gel permeation chromatography (GPC), and qualitative-quantitative determination of PAHs by a liquid chromatography with selective detectors (HPLC-FLD/DAD).

Significant differences were found in the contamination level of particular commercial brands of teas in all the analyzed kinds of both the fruit and herbal teas. However, similar quality profiles of PAHs were observed, with a very high level of light PAHs in the total content of these compounds. Among all the teas under investigation, no benzo[a]pyrene nor the most carcinogenic polyarenes, i.e. dibenzopyrenes, were detected.

Key words: PAHs, fruit teas, herbal teas, food contaminants ☒