

Marta Ciecierska, Mieczysław Obiedziński

OZNACZENIE ZAWARTOŚCI WIELOPIERŚCIENIOWYCH WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH W KAWACH NATURALNYCH PALONYCH METODĄ HPLC-FLD/DAD*

Zakład Oceny Jakości Żywności Wydziału Nauk o Żywności SGGW w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. *M. Obiedziński*

Oznaczono zawartość 19 WWA w wybranych kawach naturalnych palonych przy użyciu chromatografii cieczowej z selektywnymi detektorami fluorescencyjnym oraz diodowym (HPLC-FLD/DAD). Stwierdzono bardzo wysoki udział lekkich WWA w sumarycznej zawartości tych związków, natomiast niski udział 15 WWA zalecanych do badań przez Komitet Naukowy ds. Żywności UE.

Hasła kluczowe: WWA, kawy naturalne palone, analiza HPLC-FLD/DAD.
Key words: PAHs, roasted natural coffee, HPLC-FLD/DAD analysis.

Zainteresowanie szerokiego spektrum nauk, w tym nauki o żywności, wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA) wynika przede wszystkim z ich działania genotoksycznego, mutagennego i kancerogennego (1). Zgodnie z zaleceniem Komisji Europejskiej z dnia 4 lutego 2005 (2) niezbędnym jest przeprowadzenie badań nad poziomami benzo[a]pirenu oraz pozostałych związków należących do 15 WWA wytypowanych przez Komitet Naukowy ds. Żywności UE w produktach spożywczych. Uwzględniając fakt, iż produkty wysokotłuszczowe są potencjalnym źródłem hydrofobowych WWA, kawa zawierająca od 10 do 17% tłuszczu, poza tym poddawana procesowi prażenia, może być w szczególności zanieczyszczona przez poliareny (3, 4). Związki te występują w żywności zazwyczaj jako złożone mieszaniny tzw. lekkich oraz ciężkich WWA.

Celem pracy było zatem oznaczenie zawartości 19 WWA, w tym 4 związków z grupy tzw. lekkich WWA (z listy rekomendowanej do badań przez EPA) oraz 15 WWA wg Komitetu Naukowego UE przy wykorzystaniu metody HPLC-FLD/DAD w wybranych kawach naturalnych palonych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły kawy dwóch gatunków: Arabika - pochodząca z Brazylii, Peru, Etiopii, Indonezji, Tanzanii oraz Robusta - z Wybrzeża Kości

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

Słoniowej, Indonezji, Indii, Ugandy, Wietnamu. Kawy zostały poddane prażeniu w temperaturze 125 - 135°C przy zastosowaniu ogrzewania bezprzeponowego (piece elektryczne). Badaniom poddano po trzy próbki każdej z kaw. Każdą z trzech próbek tego samego asortymentu analizowano w trzech powtórzeniach.

Metodyka badań obejmowała ekstrakcję tłuszczu, oczyszczenie ekstraktu na kolumnie z żelom krzemionkowym, izolację WWA z matrycy tłuszczowej przy wykorzystaniu chromatografii preparatywnej (GPC) oraz jakościowe i ilościowe oznaczenie związków metodą chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną oraz diodową (HPLC-FLD/DAD).

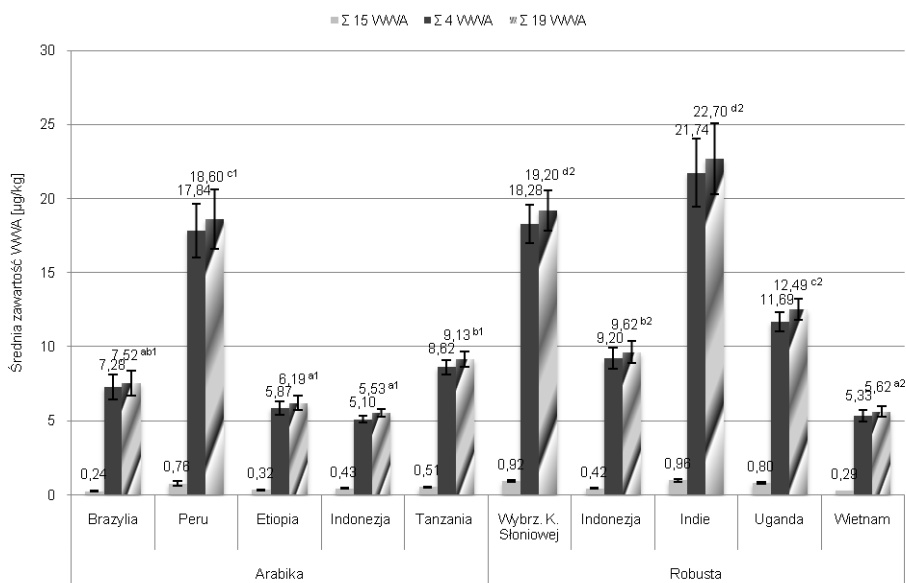
Naważkę kawy zalewano 50 cm³ mieszaniny heksan/ aceton (60/40, v/v) oraz umieszczano w łaźni ultradźwiękowej (30 min.). Uzyskany ekstrakt po przefiltrowaniu oraz zagęszczeniu (do ok. 50 µl rozpuszczalnika) przenoszono na szczyt kolumny wypełnionej Silica żelom (Fluka), a następnie wymywano cykloheksanem. Pierwsze 10 cm³ przesączu odrzucano, a kolejne zebrane 75 cm³ zatężano oraz rozpuszczano w 5 cm³ cykloheksanu. W celu oddzielenia frakcji WWA od związków interferujących zastosowano kolumnę do chromatografii żelowej TSK Gel G1000HXL, 300 x 7,8 mm, 5 µm. Do rozdziału wprowadzano 1 cm³ uprzednio przygotowanej mieszaniny. Rozdział prowadzono metodą izokratyczną przy przepływie 0,8 cm³/min. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina cykloheksan/ octan etylu (50/50, v/v). Zastosowano detektor UV-VIS, dł. fali 254 nm. Zebraną frakcję WWA po zagęszczeniu i rozpuszczeniu w 1 cm³ acetonitrylu poddano analizie metodą HPLC-FLD/DAD przy zastosowaniu aparatu HPLC Shimadzu 2010 z detektorem fluorescencyjnym RF-10A_{XL} oraz diodowym SPD-M10A_{VP}. Rozdział prowadzono z zastosowaniem kolumny chromatograficznej BAKERBOND PAH-16 Plus 250 x 3mm, 5 µm firmy WITKO – Baker. Temp. termostataowania kolumny wynosiła 30°C. Analizy wykonywano metodą gradientową przy przepływie 0,5 cm³/min, stosując mieszaninę acetonitryl/ woda, 50/ 50 (A) oraz acetonitryl (B). Zastosowane 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 wykonano metodą standardów zewnętrznych.

Na podstawie wyznaczonych parametrów walidacyjnych stwierdzono, iż zastosowana metoda oznaczania 19 WWA techniką HPLC-FLD/DAD, poza spełnieniem 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 wykorzystaniu programu Statistica 7.1. Ocenę istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi sumarycznej zawartości 19 WWA dla poszczególnych kaw, w ramach ich dwóch analizowanych gatunków, przeprowadzono 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 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 HPLC-FLD/DAD, przedstawiono na ryc. 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].

Objaśnienia:

a1, b1, c1; a2, b2, c2 – wartości średnie Σ 19 WWA oznaczone innymi literami przy tej samej cyfrze (czyli w ramach jednego z 2 porównań sumarycznej zawartości 19 WWA) oznaczają statystycznie istotną różnicę między średnimi na poziomie $\alpha = 0,5$.

Niezależnie od gatunku kawy oraz miejsca ich pochodzenia, zaobserwowano bardzo podobne profile jakościowe zawartości WWA. Odnotowano, iż 4 lekkie węglowodory (fenantren, antraceni, fluoranteni i piren), rekomendowane do badań przez EPA, stanowiły od 92% do 97% sumarycznej zawartości poliarenow w kawach Arabika oraz od 94% do 96% z puli WWA oznaczonych w kawach Robusta. Stwierdzono zatem bardzo niski udział ciężkich WWA w zanieczyszczeniu analizowanych kaw. Z listy 15 poliarenow rekomendowanych do badań przez Komitet Naukowy ds. Żywności UE, oznaczono przede wszystkim

niewielkie ilości benzo[a]antracenu, chryzenu oraz 5-metylochryzenu. Benzo[b]- oraz benzo[k]fluoranten stwierdzono jedynie w śladowych ilościach, odpowiednio w przypadku dwóch kaw Robusta oraz jednej kawy Arabika. W żadnej z próbek kaw nie wykryto obecności benzo[a]pirenu oraz pozostałych ciężkich poliarenow, w tym najbardziej kancerogennych dibenzopirenow.

Wśród kaw palonych Arabika istotnie statystycznie najwyższym poziomem zanieczyszczenia 19 poliarenowi cechowała się kawa pochodząca z Peru (18,60 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Niższe zawartości Σ 19 poliarenow wykazywały kawa z Tanzanii oraz Brazylii (odpowiednio 9,13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 7,52 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Statystycznie najniższym stopniem zanieczyszczenia 19 WWA cechowały się natomiast kawy Arabika z Etiopii oraz Indonezji (6,19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 5,53 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Pośród kaw palonych Robusta najwyższym statystycznie poziomem sumarycznej kontaminacji 19 WWA (wynoszącym 22,70 $\mu\text{g}/\text{kg}$) charakteryzowała się kawa pochodząca z Indii. Nieistotnie statystycznie niższą zawartość Σ 19 WWA stwierdzono w przypadku kawy z Wybrzeża Kości Słoniowej (19,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Istotnie statystycznie niższe zawartości Σ 19 WWA, w porównaniu do dwóch wyżej opisanych kaw, zaobserwowano w próbkach kaw pochodzących z Ugandy, Indonezji oraz Wietnamu (12,49 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 9,62 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 5,62 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (ryc. 1).

Porównywalne wyniki badań zostały opublikowane w innych doniesieniach naukowych. Francuscy badacze stwierdzili, iż w próbkach kaw palonych pobranych z krajowego rynku w puli wszystkich 11 oznaczonych WWA dominujący udział stanowią fenantren, piren oraz fluoranten, a poziom ich zawartości kształtował się w zakresie od 10,0 do 25,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Sumaryczna zawartość 11 poliarenow, a pośród nich 4 lekkich WWA oraz 7 WWA z listy Komitetu Naukowego UE – od benzo[a]antracenu do benzo[g,h,i]perylenu, wahała się w granicach od 21,8 do 64,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (5). W badaniach traktujących o zanieczyszczeniu kaw palonych benzo[a]pirenem, jego zawartość kształtowała się pomiędzy 0,1 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ produktu i była uzależniona od stopnia prażenia kawy (3). W innych badaniach zawartość benzo[a]pirenu w kawach silnie palonych wynosiła maksymalnie 22,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, natomiast w kawach mielonych oraz instant kształtowała się w granicach od poniżej 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 1,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (5-7).

Stwierdzone w niniejszej pracy bardzo duże zróżnicowanie poziomu sumarycznego zanieczyszczenia kaw naturalnych w ramach ich dwóch analizowanych gatunków może wynikać z różnego stopnia zanieczyszczenia środowiska, a także ze sposobu suszenia kawy po zbiorach. Według innych badaczy również powyższe czynniki różnicują poziom zawartości WWA w kawach. Na poziom zanieczyszczenia kaw palonych WWA wpływają także parametry prażenia kaw, czyli temperatura i czas procesu, jak również jego technika (4, 7, 8). Można zatem stwierdzić, iż odnotowany w niniejszej pracy względnie niski poziom zanieczyszczenia analizowanych kaw wynikał z zastosowania bardzo łagodnych warunków palenia, a więc niskiej temperatury oraz elektrycznego systemu grzewczego. Przemysłowo natomiast kawy prażone są najczęściej w zakresie temperatur 185–190°C. Doniesienia literaturowe wskazują, iż od około 170°C rozpoczyna się właściwy proces prażenia, podczas którego zachodzą reakcje

pirolityczne prowadzące do powstawania WWA (9-11). Kawy prażone długo i w wysokiej temperaturze odznaczają się prawie czarną barwą, ponadto ziarna w wyniku silnego prażenia pękają, a na ich powierzchni gromadzi się tłuszcz, co prowadzi do wyższego poziomu zanieczyszczenia lipofilnymi WWA (11, 12).

WNIOSKI

Odnotowane profile jakościowe i ilościowe zawartości WWA wskazują na środowiskowy charakter zanieczyszczenia analizowanych kaw palonych. Stwierdzony względnie niski poziom zawartości poliarenow w kawach wynikał z zastosowania łagodnych warunków prażenia ziarna przy użyciu elektrycznego systemu grzewczego, które nie sprzyjają powstawaniu WWA, a zwłaszcza ciężkich poliarenow. Niski poziom zanieczyszczenia analizowanych kaw palonych przez WWA wyznacza także niskie poziomy zanieczyszczenia ich naparów.

M. Ciecierska, M. Obiedziński

DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS CONTENT IN ROASTED NATURAL COFFEE BY HPLC-FLD/DAD METHOD

Summary

The objective of this research was to perform studies dealing with the contamination of selected roasted natural coffee by 19 PAHs (including 4 light PAHs listed by EPA and 15 PAHs listed by the EU Scientific Committee on Food). The employed methodology comprised fat extraction, extract's clean up using silica gel column, PAHs isolation from fat matrix by gel permeation chromatography (GPC) and their determination using high performance liquid chromatography with selective detectors (HPLC-FLD/DAD).

Similar quality profiles of PAHs with light PAHs being predominant were revealed for all tested coffee. Summary content of 19 PAHs in the analyzed coffee was within 5.53 – 22.70 µg/kg. The obtained quality and quantity profiles of PAHs indicate the environmental nature of coffee contamination. Moreover, relatively low level of PAHs content is the consequence of the applied mild parameters of roasting coffee beans with the use of the electrical heating system, which does not create favourable conditions for the formation of PAHs, particularly heavy ones.

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. *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.– 5. *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.– 6. *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.– 7. *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.– 8. *Orecchio S., Ciotti V.P., Culotta L.*: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: analytical method by GC-MS, profile, levels and sources. *Food Chem. Toxicol.*, 2009; 47 (4): 819-826.– 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. *Yeretizian 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. *Matajszczyk E.*: Czynniki kształtujące jakość kawy mielonej. *Przem. Spoż.*, 2001; 55 (1): 26-28.

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