

**Mariusz S. KUBIAK<sup>1</sup>, Magdalena POLAK<sup>2</sup>, Paweł PISZCZ<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Katedra Procesów i Urządzeń Przemysłu Spożywczego, Wydział Mechaniczny, Politechnika Koszalińska, Koszalin

<sup>2</sup> Katedra Towaroznawstwa i Badań Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

<sup>3</sup> Instytut Chemii, Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Ścisłych, Akademia Podlaska, Siedlce

## **OZNACZANIE POZIOMU ZAWARTOŚCI B(a)P W RYNKOWYCH PRZETWORACH MIĘSNYCH Z WYKORZYSTANIEM HPLC**

*Zagadnienia związane ze skażeniem środowiska naturalnego oraz zanieczyszczeniami artykułów rolno-spożywczych wzbudzają zainteresowanie społeczeństwa już od kilku lat. W związku ze wzrostem uprzemysłowienia w ciągu ostatnich kilku dekad, ilość związków chemicznych, wprowadzonych do środowiska naturalnego przez człowieka, osiągnęła ogromne rozmiary.*

### **WSTĘP**

Szacuje się, że w środowisku występuje obecnie ponad 100 000 ksenobiotyków, które nie występowały w nim wcześniej [2, 22]. Zatem w codziennym życiu organizm ludzki jest narażony na działanie tysięcy substancji chemicznych, które są wytworem naturalnych procesów, jak również działalności człowieka. Niektóre z nich są korzystne dla zdrowia (na przykład główne składniki żywności), ale wiele innych może wpływać negatywnie, pogarszając jakość i bezpieczeństwo życia [7, 33].

Prowadzona edukacja w środkach masowego przekazu i dotycząca szczególnie zagrożenia zdrowia związanego ze spożyciem żywności skażonej mikrobiologicznie czy chemicznie sprawiła, że w konsumenckiej ocenie artykułów rolno-spożywczych brane są pod uwagę nie tylko walory użytkowe, sensoryczne, higieniczne czy estetyczne, ale i zawartość substancji obcych w produkcie, mogąca zagrażać bezpieczeństwu zdrowia [6]. Podawane informacje sprawiają, że w konsumenckiej ocenie artykułów rolno-spożywczych została zdefiniowana kolejna cecha, na którą przeciętny konsument zaczął zwracać uwagę.

Wykrywanie dużego poziomu w różnych elementach środowiska związków pogarszających jakość życia pogłębia zakres prowadzonych badań nad ich dopuszczalnym stężeniem. Z uwagi na to, że zdrowie społeczeństwa jest największym dobrem, coraz większego znaczenia nabierają czasowo-przestrzenne badania monitoringowe poziomu kontaminantów zarówno w artykułach rolno-spożywczych, jak i w paszach dla zwierząt. Pozwalają one na ustalenie zarówno pochodzenia skażeń chemicznych, jak i ich przyczyn, co umożliwia skuteczne zapobieganie zagrożeniom bezpieczeństwa zdrowia konsumentów oraz zwierząt hodowlanych [33, 38].

Do związków tej grupy należą metale ciężkie, trwałe zanieczyszczenia organiczne, w tym węglowodory chloroorganiczne, dioksyne, polichlorowane bifenyle, a także wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA).

Najczęściej stosowane są dwie techniki chromatograficzne: chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS) oraz wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją fluorescencyjną (HPLC/FLD). Celem pracy było oznaczenie benzo(a)pirenu w wybranych rynkowych przetworach mięsnych poddanych różnym metodom wędzenia i określenie poziomu zanieczyszczenia. Przygotowanie próbki do oznaczenia benzo(a)pirenu w rynkowych przetworach mięsnych wędzonych obejmowało ekstrakcję frakcji lipidowej, zastosowanie techniki SEC do wydzielenia węglowodorów z tłuszczu i techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (HPLC/FLD).

Jednym z głównych źródeł WWA są paliwa kopalniane – węgiel i ropa naftowa, z których są uwalniane. Powstają także w czasie wytwarzania energii w elektrowniach i elektrociepłowniach. Drugim istotnym źródłem emisji do atmosfery są gazy spalinowe transportu samochodowego, jak również dymy z kotłowni, urządzeń grzewczych i zakładów przemysłowych, w szczególności przemysłu ciężkiego, hut, koksowni i tym podobnych.

Policykliczne węglowodory występują w powietrzu w formie par lub skondensowane są na cząsteczkach pyłów. W zależności od warunków atmosferycznych mogą się przemieszczać na znaczne odległości od źródeł emisji i sprzyjać imisji WWA nawet na terenach słabo zindustrializowanych lub typowo rolniczych. Zazwyczaj cięższe wielopierścieniowe węglowodory (o masie cząsteczkowej powyżej 228 u) są przenoszone wraz z pyłami. Opadające z atmosfery pyły i kondensujące na powierzchni związki mogą zanieczyszczać surowce rolno-spożywcze, wodę i glebę [2, 33].

Wśród węglowodorów zanieczyszczających atmosferę przeważają alifatyczne (nasycone i nienasycone) oraz aromatyczne, o małej masie cząsteczkowej [24]. Alkeny i dieny w zakresie temperatur 500-800°C typowych dla rozkładu termicznego (w szczególności w warunkach ograniczonego dostępu tlenu) mają tendencję do rodnikowej polimeryzacji, tworząc wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Uwolnione do atmosfery policykliczne węglowodory występują w postaci par lub ulegają adsorpcji na powierzchni pyłów: sadza i lotne popioły [16, 32].

Żywność i surowce rolne mogą być nie tylko zanieczyszczone policyklicznymi węglowodorami pochodzącymi ze środowiska produkcji rolnej, ale również w wyniku procesów termicznych utrwalania i przygotowywania do spożycia, m.in.: heterocykliczne aminy aromatyczne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne czy akrylamidu.

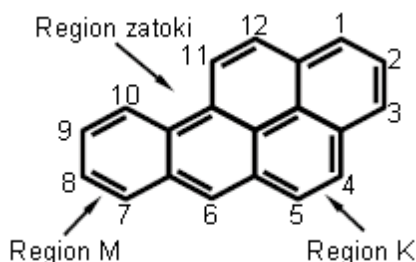
Znane od tysięcy lat procesy utrwalania żywności poprzez suszenie, wędzenie, pieczenie na ogniu czy też suszenie bezprzeponowe gazami spalinowymi, mogą zanieczyszczać produkty spożywcze znacznymi ilościami WWA [10, 11, 26]. Piśmiennictwo dotyczące obecności WWA w żywności jest bardzo bogate i obejmuje różnorodne aspekty występowania tych związków w żywności. Na podstawie piśmiennictwa w tabeli 1 przedstawione

zostały źródła i przyczyny zanieczyszczenia przez WWA produktów rolno-spożywczych [16].

**Tabela 1.** Źródła i przyczyny zanieczyszczenia żywności przez WWA [16, 21, 22, 38]

rodzaj skażenia	źródło	przenoszone przez	rodzaj żywności
środowisko egzogenne	przemysł ogrzewanie wytwarzanie energii transport spalanie odpadów pożary lasów, wybuchy wulkanów zanieczyszczenia pozostałościami paliw i/lub olejów mineralnych	powietrze woda gleba	warzywa owoce zboża rośliny oleiste ryby i inne owoce morza
środowisko endogenne	biosynteza w roślinach biosynteza mikroorganizmów	–	warzywa
zabiegi technologiczne egzogenne	wędzenie pieczenie na ruszcie, grillowanie suszenie bezprzeponowe palenie kawy ekstrakcja rozpuszczalnikami woski, parafiny stosowane do opakowań, oleje mineralne preparaty uszczelniające do rur wodociągowych	dym, powietrze rozpuszczalniki, woski parafinowe smoły paki	wędzona żywność pieczona żywność suszona żywność palona kawa oleje i tłuszcze roślinne sery woda pitna
obróbka żywności endogenna	wysokotemperaturowa obróbka żywności	–	żywność wstępnie przetworzona

Budowa przestrzenna wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych ma charakter planarny. Badacze przypisują aktywność biologiczną niektórym regionom i pozycjom atomów węgla w cząsteczce WWA. Odnosi się to w szczególności do regionu K (zewnątrzny narożnik pierścienia fenantrenowego) oraz regionu M (para przeciwstawnych atomów pierścieni antracenowych) oraz usytuowania regionu „zatoki”, co zostało przedstawione na rys. 1.



Rysunek 1. Budowa benzo[a]pirenu oraz miejsca regionów o biologicznej aktywności [10, 11]

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne stanowią grupę ksenobiotyków, spośród których wiele przejawia właściwości toksyczne, genotoksyczne, mutagenne i rakotwórcze [3, 21].

WWA zbudowane są z dwóch lub więcej skondensowanych pierścieni aromatycznych. Nie należą do związków o tak wysokiej trwałości w środowisku, jak chlorowane węglowodory (dioksyny, furany i polichlorowane bifenyle). W obecności światła i tlenu ulegają reakcjom fotochemicznym z utworzeniem dioli, chinonów i aldehydów.

Najlepiej poznanym węglowodorem z grupy WWA w środowisku i żywności jest benzo[a]pirenu (B[a]P), co przyczyniło się do traktowania go jako wskaźnika występowania innych kancerogennych węglowodorów [12, 13, 14]. Tendencja traktowania tego węglowodoru jako wskaźnikowego została utrzymana w pracach poświęconych opracowaniu współczynników równoważnej toksyczności i stanowi swoisty pomost między badaniami w dobie współczesnej. W badaniach WWA w środowisku, istotnym ograniczeniem były dostępne techniki analityczne, a w szczególności techniki separacji i rozdziału WWA.

Międzynarodowa Agencja do Badań nad Rakiem (IARC) gromadzi informacje o właściwościach biologicznych WWA [1, 2, 12, 25]. Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (EPA) na podstawie zebranych informacji utworzyła listę 16 WWA najczęściej oznaczanych w próbkach pobranych ze środowiska oraz w próbkach żywności [28]. Osiem z nich ma udowodnione właściwości biologiczne wpływające na zdrowie człowieka [8, 6, 13, 19, 23, 25].

Od szeregu lat stosuje się w badaniach policyklicznych węglowodorów koncepcję analizy zaproponowanych przez amerykańską Agencję Ochrony Środowiska 16 WWA [6, 12, 13]. Jednak ze względu na ograniczenia związane między innymi z kosztami zakupu i wykorzystywania wzorców podczas analiz, powoduje oznaczanie tylko jednego (B[a]P) lub wybranych WWA.

Wyznaczono najwyższe dopuszczalne poziomy zawartości benzo(a)pirenu w niektórych środkach spożywczych zawierających tłuszcze i oleje oraz w żywności wędzonej [37]. Według Rozporządzenia Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 roku, które określa najwyższe dopuszczalne poziomy zanieczyszczeń w środkach spożywczych, zawartość B[a]P w produktach mięsnych wędzonych, tkance mięśniowej ryb wędzonych, skorupiakach nie może przekraczać  $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , a w olejach jadalnych nie powinna być wyższa niż  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , natomiast w produktach dla dzieci  $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Regulacje UE limitują również zawartości benzo(a)pirenu – B[a]P i benz(a)antracenu – B[a]A w preparatach dymów wędzarniczych, których zawartość nie może przekraczać odpowiednio  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  dla B[a]P i  $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  dla B[a]A [18, 19, 23, 25, 27, 31].

Ważnym aspektem jest stwierdzenie, że rozwój metodyki badań nad zawartością WWA miał charakter prekursorski w rozwoju analizy śladowej w żywności. Metody oznaczania wielopierścieniowych węglowodorów w różnorodnych matrycach żywności zostały omówione w szeregu pracach przeglądowych, a matryce żywnościowe z punktu widzenia analitycznego cha-

rakteryzują się bardzo wysokim stopniem trudności w porównaniu ze środowiskowymi (woda, osady, gleba).

Metody analityczne oznaczania tej grupy związków wymagają szczególnej precyzji. Są czasochłonne zwłaszcza na etapie izolacji i oczyszczenia próbek z substancji utrudniających ich oznaczanie [20]. Ze względu na poziom śladowy występowania WWA w żywności wędzonej oraz ich skomplikowane techniki, wiarygodnego oznaczania jakościowego i ilościowego, analiza WWA obejmuje identyfikację i oznaczanie ilościowe poszczególnych związków wyłącznie metodami chromatograficznymi [9, 17]. W analizie WWA stosowane są najczęściej dwie techniki chromatograficzne: chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS) oraz wysoko-sprawna chromatografia cieczowa z detekcją fluorescencyjną (HPLC/FLD).

W rozporządzeniu WE nr 333/2007 z 28 marca 2007 uzupełnionym Dyrektywą Komisji nr 2005/10/WE z dnia 4 lutego 2005 roku znalazły się wymagania i kryteria sprawności, jakie muszą spełniać metody analityczne dla oznaczanych związków WWA. Należą do nich, między innymi:

- specyficzność metody;
- granica wykrywalności nie mniejszej niż  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;
- granica oznaczalności nie mniejszej niż  $0,9 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;
- odzysk w zakresie 50-120%.

Metody oznaczania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w matrycach żywnościowych stanowią problem z powodu tego, że mają charakter lipofilny. W celu wyodrębnienia frakcji WWA z matryc zawierających tłuszcze stosuje się hydrolizę w środowisku zasadowym za pomocą metalonolowego roztworu KOH, wielokrotne ekstrakcje ciecz-ciecz lub ciecz-ciało stałe [20]. Inną metodą wyodrębniania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z matryc żywnościowych jest ekstrakcja za pomocą ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym. Metodą przygotowania próbek do analizy jest preparatywna chromatografia wykluczania sterycznego (SEC). Jest to metoda względnie szybka i prosta [4, 17, 20, 35, 36, 37].

Technika oznaczania WWA z wykorzystaniem HPLC z detektorem fluorescencyjnym charakteryzuje się niższą granicą wykrywalności tej grupy związków. Analizę wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych za pomocą HPLC prowadzi się w układzie faz odwróconych. Fazę ruchomą stanowią zwykle acetonitryl i woda lub metanol i woda z wykorzystaniem gradientu stężeń lub warunków izokratycznych [17, 20, 35, 36, 37].

## METODYKA

Materiał do badań stanowiły rynkowe wędzone przetwory mięsne poddane przemysłowym i tradycyjnym technikom wędzenia. Badane próbki podzielono na dwie grupy asortymentu: wędzonki, kiełbasy wędzone.

Dla oznaczania B[a]P stosowano następujące odczynniki i wzorce:

Acetonitryl (ACN), dichlorometan (DCM), chloroform i metanol - (HPLC) firmy Labscan (Dublin, Irland), Benzo(b)chryzen – B[b]Ch Dr firmy Ehrenstorfer GMBH ( $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  ACN), Benzo(a)piren - B[a]P Standard Reference Ma-

terial 1647d-NIST ( $4,91 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Pozostałe odczynniki były klasy „czysty do analiz”. Woda z systemu Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). Dla ilościowej analizy B[a]P stosowano mieszaninę wzorców i standardu wewnętrznego w acetonitrylu o stężeniu: B[a]P ( $49,1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) i B[b]Ch ( $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) oraz roztwór wzorca wewnętrznego B(b)Ch w acetonitrylu o stężeniu  $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### *Aparatura wykorzystana podczas przeprowadzania analiz*

Do izolacji frakcji węglowodorowej z wyekstrahowanego tłuszczu zastosowano chromatograf preparatywny z automatycznym dozownikiem próbek ASI-100, gradientową pompę chromatograficzną wraz z odgazowywaczem P-580, detektor fotometryczny z matrycą diodową UVD-340S, uniwersalny łącznik chromatograficzny UCI-100 (DIONEX-SOFTRON, Germering, Niemcy), kolektor frakcji Foxy Jr. Fraction Collector (Isco, Lincon, USA), kolumna wykluczania sterycznego – Plgel na złożu PS/DVB,  $5 \mu\text{m}$ ,  $50 \text{ \AA}$ ,  $600 \times 7,8 \text{ mm i.d.}$ , wraz z przedkolumną (Polymer Laboratories, Amherst, USA). Przebieg analiz kontrolowany był przez program Chromleon v. 6.20 (DIONEX-SOFTRON, Germering, Niemcy).

Do oznaczania ilościowego B[a]P wykorzystano chromatograf analityczny Agilent seria 1100 wyposażony w próżniowy odgazowywacz próbek G-1322A, automatyczny dozownik próbek G-1313A, pompę czterokanałową G-1311A, termostat kolumny G-1316A, detektor fluorymetryczny z możliwością przemiatania widm G-1321A (Agilent Technologies, Palo Alto, USA), kolumnę z przedkolumną Hypersil Green PAH,  $5 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 3 \text{ mm i.d.}$  (Thermo Electron Corporation, Runcorn, USA). Przebieg analiz kontrolowany był przez program Chem Station LC 3D (Agilent Technologies, Palo Alto, USA).

#### *Procedura analityczna według której wykonywane były oznaczenia*

Do szklanych probówek odważano  $1 \text{ g}$  uprzednio zhomogenizowanej próbki, dodawano wzorca wewnętrznego  $100 \mu\text{L}$  B[b]Ch ( $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), a następnie  $1,5 \text{ mL}$  metanolu. Probki wytrząsano za pomocą mieszadła typu Vortex przez  $1 \text{ minutę}$ , następnie dodawano  $3 \text{ mL}$  chloroformu i  $1,5 \text{ mL}$  wody. Całość wytrząsano ponownie przez  $3 \text{ minuty}$ , a następnie wirowano przez  $10 \text{ minut}$  przy  $10\,000$  obrotów/minutę. Roztwór chloroformowy zawierający frakcję lipidową WWA sączono do probówki ( $10 \text{ mL}$ ) przez bibułę Whatman nr 4. Probkę ponownie ekstrahowano  $3 \text{ mL}$  chloroformu, wytrząsano za pomocą mieszadła typu Vortex przez  $3 \text{ minuty}$ , następnie wirowano przez  $10 \text{ minut}$  przy  $10\,000$  obrotów/minutę. Frakcję chloroformową ponownie filtrowano przez sączek. Połączone frakcje chloroformowe odparowywano do sucha w strumieniu azotu w łaźni wodnej ( $40^\circ\text{C}$ ). Pozostałość rozpuszczano w  $4 \text{ mL}$  dichlorometanu. Tak przygotowane ekstrakty próbek poddawano oczyszczaniu z wykorzystaniem chromatografii preparatywnej wykluczenia sterycznego (SEC), [34, 35, 36].

Etap oczyszczania z wykorzystaniem chromatografii preparatywnej wykluczenia sterycznego (SEC) wykonano w warunkach izokratycznych z zastosowaniem fazy ruchomej - dichlorometanu (DCM) o prędkości przepływu  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . System detekcji stanowił detektor UV dokonujący pomiaru przy

długości fali  $\lambda = 254$  nm. Przygotowany ekstrakt próbki w dichlorometanie 400  $\mu\text{L}$  poddano oczyszczaniu. Eluent zbierano w kolektorze frakcji, a następnie odparowywano do sucha w strumieniu azotu w łaźni wodnej (40°C). Suchą pozostałość rozpuszczano w 200  $\mu\text{L}$  ACN [34, 35, 36]. Tak przygotowane próbki наносono na kolumnę chromatograficzną aparatu HPLC/FLD.

Oznaczanie B[a]P wykonywano stosując program gradientowy fazy ruchomej woda/acetonytryl. Próbkę наносono przy składzie fazy ruchomej (50:50 v:v), (tab. 2). Stężenie acetonytrylu w ciągu 20 min wzrastało do 100%, które utrzymywano przez 15 minut, a następnie powracano do warunków początkowych (50:50 v:v), [34, 35, 36]. Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , temperatura: 25°C. Objętość наносzonej próbki stanowiło 20  $\mu\text{L}$ . Kolumnę termostatowano w temperaturze 25°C. Na podstawie czasów retencji dla B[a]P i B[b]Ch ustalono optymalne warunki pracy detektora fluorescencyjnego:

B[a]P –  $\lambda_{\text{ex}}$  256 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  446 nm;

B[b]Ch –  $\lambda_{\text{ex}}$  295 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  410 nm.

**Tabela 2.** Program gradientowy fazy ruchomej ( $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ )

Czas [min]	ACN [%]	Woda [%]
0	50	50
20	100	0
35	100	0
45	50	50

Zawartości B[a]P - benzo(a)pirenu obliczono wg poniższego wzoru:

$$C_{\text{B[a]P}} = \frac{A_{\text{B[a]P}}}{A_{\text{is}}} \cdot M \cdot k$$

gdzie:

$C_{\text{B[a]P}}$  - zawartość benzo(a)pirenu w próbce [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ];

$A_{\text{B[a]P}}$  - powierzchnia piku benzo(a)piranu [jednostki detektora];

$A_{\text{is}}$  - powierzchnia piku standardu wewnętrznego [jednostki detektora];

$M$  - stężenie dodanego wzorca [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ];

$k$  - współczynnik korekcyjny.

## WYNIKI I DYSKUSJA

W tabeli 3 zestawione zostały wyniki oznaczeń poziomu zawartości B[a]P oznaczanego w badanych przetworach mięsnych w zależności od metody wędzenia (przemysłowe i tradycyjne).

**Tabela 3.** Średnia zawartość B[a]P [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ] w badanych wędzonych przetworach mięsnych

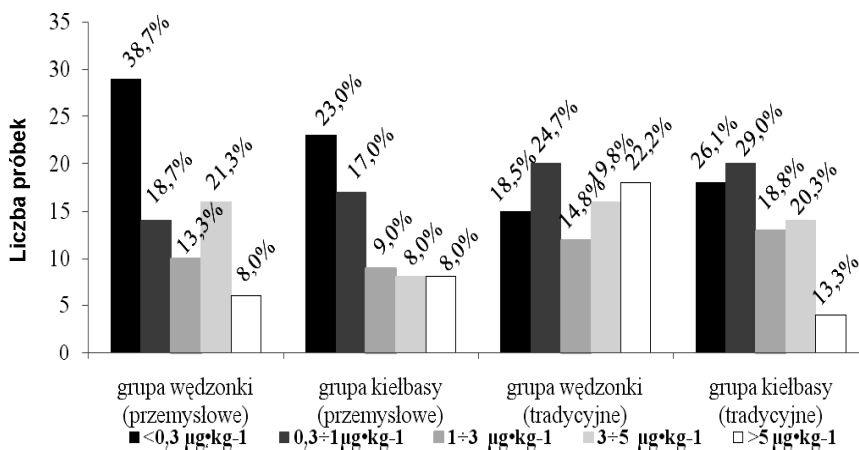
B[a]P [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]	wędzenie przemysłowe		wędzenie tradycyjne	
	Liczba próbek	Udział próbek [%]	Liczba próbek	Udział próbek [%]
poniżej 0,30	52	37,14	33	21,15
od 0,3 do 0,99	31	22,14	40	25,64
od 1,0 do 2,99	19	13,57	25	16,02
od 3,0 do 4,99	24	17,14	30	19,23
powyżej 5,00	14	10,00	28	17,94
$\Sigma$	140	100,00	156	100,00

Spośród 140 próbek przetworów mięsnych wędzonych w warunkach przemysłowych obecność benzo(a)pirenu powyżej określonego limitu stwierdzono w 10% próbek (tj. w 14 próbkach). Próbki, w których stwierdzono przekroczenie dopuszczalnej maksymalnej zawartości B[a]P to wyroby określane mianem boczek wiejski (przemysłowa metoda wędzenia) i szynka z beczki (tradycyjna metoda wędzenia). Zawartość B[a]P większości próbek była w przedziale  $0,30 \div 3,00 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Średnie zawartości B[a]P w wędzonych produktach wynosiły kolejno 37,14% ( $0,30 \div 1,00 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 13,57% ( $1,00 \div 3,00 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i 17,14% ( $3,00 \div 5,00 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i mieściły się w granicach maksymalnej dopuszczalnej zawartości tego związku ( $5,00 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) określonej w Rozporządzeniu Wspólnoty Europejskiej.

Przetwory mięsne z wędzenia tradycyjnego odznaczały się o wiele wyższym udziałem zawartości B(a)P w poszczególnych przedziałach określonych przez autorów. Około 18% przebadanych wyrobów z wykorzystaniem tradycyjnej metody wędzenia stanowiły próbki z zawartością B(a)P powyżej  $5,00 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , granicy maksymalnej dopuszczalnej zawartości określonej w normach i Rozporządzeniu Wspólnoty Europejskiej.

Na rysunku 2 przedstawiony został procentowy rozkład średniego poziomu zanieczyszczenia B[a]P badanych grup wędzonych przetworów mięsnych.





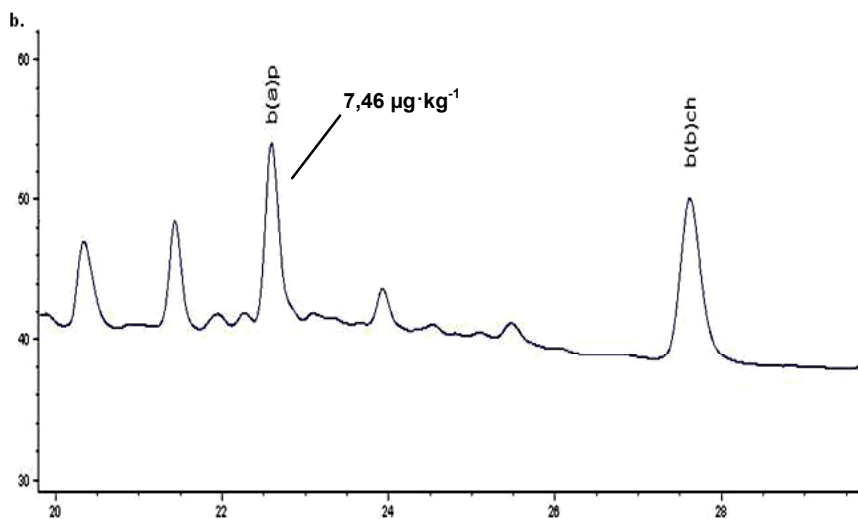
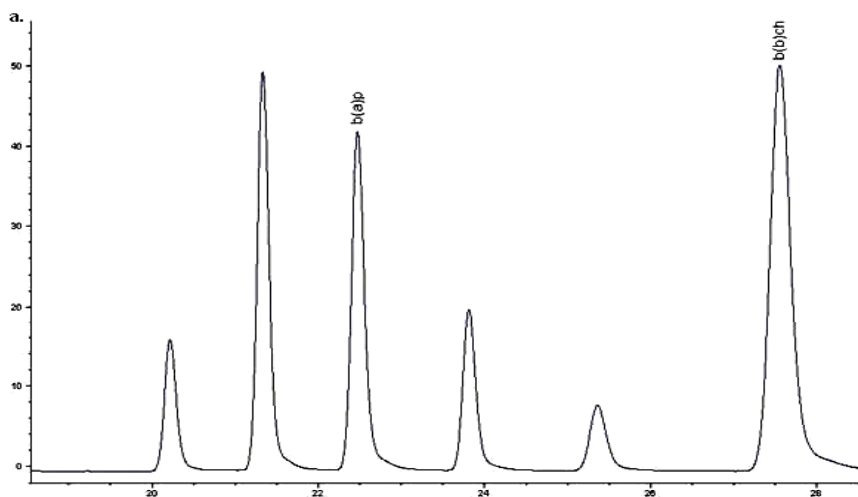
Rysunek 2. Rozkład poziomu skażenia B[a]P w badanych grupach wędzonych przetworów mięsnych

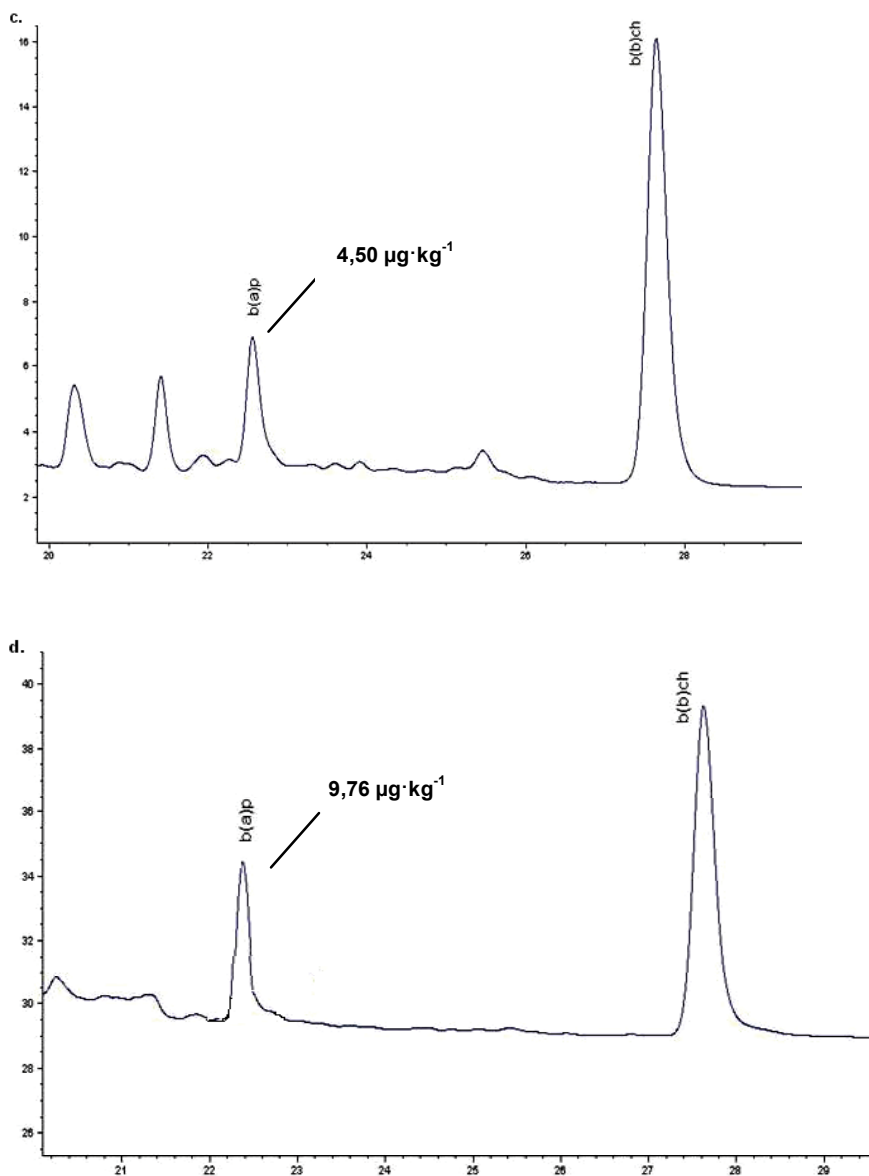
Ciecierska i Obiedziński (2007) w badaniach nad wpływem wędzenia na zawartość 15 WWA w produktach mięsnych stwierdzili, że produkty poddane wędzeniu tradycyjnemu odznaczały się wyższym poziomem zanieczyszczenia WWA [5]. Niższym poziomem zanieczyszczenia związkami WWA odznaczały się produkty, które zostały poddane wędzeniu w sposób przemysłowy. Autorzy wykazali, że wyroby poddane zarówno wędzeniu tradycyjnemu, jak i przemysłowemu, odznaczają się zawartością benzo(a)pirenu istotnie niższą od dopuszczalnego limitu:  $5,00 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , ustalonego w Rozporządzeniu Komisji UE nr 208/2005 dla grupy produktów mięsnych wędzonych. Średnia zawartość B[a]P w części środkowej w poszczególnych produktach: szynki, połówce parzone, kiełbasy średnio rozdrobnione, była poniżej  $0,30 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Część zewnętrzna również nie zawierała B[a]P powyżej dopuszczalnego limitu i wynosiła średnio  $0,43 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Natomiast w badaniach własnych otrzymaliśmy wyższe poziomy, co może być spowodowane odmiennym sposobem wędzenia, gdzie wykorzystano system wędzenia dymem gęstym.

W badaniach przeprowadzonych przez Jira (2004) i Jankowskiego (2004) koncentracja B[a]P w szynkach wędzonych została wykazana na poziomie  $0,61 \pm 0,96 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , co wskazuje, iż limity dopuszczalnej zawartości B[a]P nie są w żaden sposób przekraczane i świadczy to o bezpieczeństwie żywności wędzonej [15, 17]. Co również wskazuje na możliwość wykorzystania łagodniejszego dymu wędzarniczego i zadanych parametrów wędzenia.

Rysunek 3 przedstawia przykładowe najwyższe średnie poziomy B[a]P w próbkach z każdej grupy asortymentu. Na chromatogramie (a) przedstawiony został rozdział węglowodorów aromatycznych z roztworu wzorcowego. Kolejne chromatogramy (b) i (c) obrazują najwyższe średnie

zawartości B[a]P w grupie produktów: wędzonki i kiełbasy wędzone w warunkach przemysłowych. Dla przetworów wędzonych z wykorzystaniem metod tradycyjnych podczas procesu wędzenia najwyższą średnią zawartość, jaką uzyskano dla oznaczanego związku ( $9,76 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) przedstawiono na chromatogramie (d) szynki z beczki. Pozostałe wyroby wędzone z wykorzystaniem metody utrwalania (wędzenia) odznaczały się zawartością poniżej dopuszczalnego limitu  $5,00 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .





Rysunek 2. Przykładowe chromatogramy oznaczania zawartości B[a]P (a)-wzorec; (b) - boczek wiejski - grupa wędzonki (przemysłowa metoda wędzenia); (c) chłopska - grupa kiełbasy (przemysłowa metoda wędzenia); (d) - szynka z beczki (tradycyjna met. wędzenia).

W ogólnym ujęciu oznaczeń wykonanych dla zawartości B(a)P dla wyrobów z produkcji przemysłowej, aż 90% stanowią produkty (wędzonki i kiełbasy wędzone) poniżej dopuszczalnego limitu ustalonego w Rozporządzeniu

Komisji UE nr 208/2005 [29, 30] dla grupy produktów mięsnych wędzonych. Jedynie 10% stanowiły produkty przekraczające ten limit. Metody tradycyjnego wędzenia wprowadzają w większym stopniu zanieczyszczenia z grupy związków WWA, aż 18% wszystkich wyrobów przekraczały dopuszczalny limit.

## PODSUMOWANIE

Zmienność zawartości benzo(a)pirenu w wędzonych przetworach mięsnych poddanych analizom może wynikać przede wszystkim z zastosowanej technologii oraz zadanych parametrów procesu wędzenia oraz kontrowania ich podczas przebiegu procesu. Kolejnym powodem różnic związanych z zawartością związków WWA opisanych w wielu publikacjach jest m.in. rodzaj zastosowanego drewna do wytworzenia dymu, użyte zioła dla podniesienia walorów smakowych gotowego produktu.

Otrzymane wyniki analiz wskazują, że właściwie realizowany proces wędzenia oraz możliwości rozwiązań technicznych przyczyniają się do zminimalizowania potencjalnych zagrożeń względem poziomu zawartości B[a]P w wędzonych przetworach mięsnych.

Stosowane w metody analityczne pozwalają na oznaczenie bardzo niskiego poziomu zanieczyszczenia B[a]P tego typu produktów. Wśród przebadanych wędzonych przetworów mięsnych, wymogi określone w Rozporządzeniu WE nr 333/2007 z 28 marca 2007 roku spełniało aż 90,0% z produkcji przemysłowej i 82,0% z produkcji tradycyjnej, co świadczy o prawidłowo przeprowadzonych procesach podczas wędzenia, jak również o bezpieczeństwie żywności wędzonej na polskim rynku. Jednak pozostały odsetek wyrobów zarówno z produkcji przemysłowej, jak i tradycyjnej może stanowić powód do monitorowania wyrobów wędzonych i poprawy warunków operacji wędzenia. Zminimalizuje to zagrożenie związkami powstającymi w procesie utrwalania żywności, jakim jest wędzenie.

## LITERATURA

1. ACGIH, (1998): Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Cincinnati, OH.
2. Adonis M., Gil L., (2000): Polycyclic aromatic hydrocarbons level and mutagenicity of inhalable particulate matter In Santiago, Chile. Inhalation Toxicology. Vol. 12, no. 12. 1173-1183.
3. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Public Health Statement. Polycyclic aromatic hydrocarbons. Atlanta 1990.
4. Christie W.W., Christie W.W. (Ed.), (1993): Preparation of lipid extracts from tissues. Advances in Lipid Methodology – Two. (edited by, Oily Press, Dundee). 195-213.

5. Ciecierska M., Obiedziński M., (2007): Influence of smoking process on polycyclic aromatic hydrocarbons' content in meat products. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 6 (4), 17-28.
6. Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC), (2005): Discussion paper on polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. 37<sup>th</sup> Session, The Hague, the Netherlands.
7. Dutkiewicz T.: *Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne w środowisku przyrodniczym*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1988.
8. Environmental Protection Agency (EPA) of the United States of America, Compendium Method TO-13, EPA, Cincinnati, OH, USA, (<http://www.epa.gov/epahome/index>), 1981.
9. Garcia Falcon M.S., Gonzales Amigo S., Lage Yusty M.A., Lopez de Alda Villaizan M.J., Simal Lozano J., (1996): Enrichment of benzo(a)pyrene in smoked food products and determination by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*. 753, 207-215.
10. Guillen M.D., Sopelana P.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in diverse foods. *Reviews on Environmental Health*. 1997, vol. 12, 133-146.
11. Guillen M.D., Sopelana P.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in diverse foods. *Food Safety: contamination and Toxins*. Ed. D'Mello J. P. F. 1999, 175-198.
12. IARC, (1983): *Monographs on the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans* vol. 32. Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1. Chemical, Environmental and Experimental Data. Lyon.
13. IARC, *Monographs*, vol. 83/2009, [www.monographs.iarc.fr/2009](http://www.monographs.iarc.fr/2009).
14. IARC, International Agency for Research on Cancer; *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of the chemical to man. Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds*. Lyon France. 1973, 2.
15. Jankowski P.S., (2004): Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in chooses group foodstuff. PhD's dissertation. Gdynia Maritime University, Poland.
16. Jenkins B.M., Jonem A.D., Turn S.Q., Williams R.B., (1996): Emission factors for polycyclic aromatic hydrocarbons from biomass burning. *Environmental Science and Technology*. vol. 30, no. 8, 2462-2469.
17. Jira W., (2004). A GC/MS method for the determination of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and liquid smokes. *European Food Research and Technology*, 218, 208-212.
18. Jira W., Dijnovic J., (2008). PAK in kaltgeraucherten serbische Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*. 5, 114-120.
19. Jira W., Ziegenhals K., Speer K., (2006): PAK in geräucherten Fleischerzeugnissen. *Untersuchungen nach den neuen EU-Anforderungen. Fleischwirtschaft* 86(10), 103-106.
20. Lage Yusty M.A., Cortizo Daviña J.L., (2005): Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detec-

- tion method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil. *Food Contamination*. 16, 59-64.
21. Larsen J.C., Meyland I., Olsen M., Tritscher A.: Polycyclic aromatic hydrocarbons. Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). JECFA/64/SC. 2005, 32-38.
  22. Larsson B.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in Swedish foods. Aspects on analysis, occurrence and intake. Praca doktorska. Uppsala 1986.
  23. Meador J.P., Sommers F.C., Ylitalo G.M., Sloan C.A. (2006): Altered growth and related physiological responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 63:2364-2376.  
<<http://www.nwfsc.noaa.gov/publications/displayallinfo.cfm?docmetadat aid=6562>.
  24. Mitra S., Ray B.: Patterns and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives in indoor air. *Atmospheric Environment*. 1995, vol. 29, no. 22, 3345-3356.
  25. Mu Lee B., Ae Shim G., (2007): Dietary Exposure Estimation of Benzo[a]pyrene and Cancer Risk Assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 70, Iss. 15 & 16, 1391-1394.
  26. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Food. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question N° EFSA-Q 2007-136). *The European Food Safety Authority Journal*. 2008, vol. 724, 1-114.
  27. Regulation (EC) No. 2065/2003 of the European Parliament and of the Council of 10 November 2003 on smoke flavourings used or intended for use in or on foods. *Official Journal of the European Union*. L 309.
  28. Regulation 208/2005 of the EU Commission.
  29. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych, *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej*.
  30. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 333/2007 z dnia 28 marca 2007 r. ustanawiające metody pobierania próbek i metody analiz do celów urzędowej kontroli poziomów ołowiu, kadmu, rtęci, cyny nieorganicznej, 3-MCPD i benzo[a]pirenu w środkach spożywczych, *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej*.
  31. Šimko P., (2002). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. *Journal Chromatography. B*, 770, 3-18.
  32. Simoneit B.R.: Review – Biomass burning – a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion. *Applied Geochemistry*. 2002, vol. 17, 129-162.
  33. Walter C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B.: *Podstawy ekotoksykologii*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.

34. Węgrzyn E., Grzeńkiewicz S., Popławska W., Głód B.K., (2005): Modified analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons, using sec for sample preparation and RP-HPLC with fluorescence detection. Application to different food samples, *Acta Chromatography*, 17. 233-249.
35. Węgrzyn E., Grzeńkiewicz S., Popławska W., Głód B.K., (2006): Improved RP-HPLC Assay and Preparative SEC for the Analysis of Eight Carcinogenic PAH in edible oils, *Tłuszcze Jadalne*. T. XLI. nr 1/2. 53-64.
36. Węgrzyn E., Grzeńkiewicz S., Popławska W., Głód B.K., (2007): Validation and estimation of uncertainty for the determination of PAHs using RP-HPLC with fluorescence detection and SEC for sample preparation. *Tłuszcze Jadalne*. T. XLII. nr 1/2. 61-71.
37. Yurchenko S., Mölder U., (2005): The determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish by gas chromatography mass spectrometry with positive-ion chemical ionization. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18, 857-869.
38. Zakrzewski S.F.: *Podstawy toksykologii środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. 1997, 114.

