

**ESTRY KWASÓW TŁUSZCZOWYCH GLICYDOLU
ORAZ ESTRY KWASÓW TŁUSZCZOWYCH
MONO-3-CHLOROPROPAN-1,2-DIOLU
– NOWE ZANIECZYSZCZENIA W OLEJACH
JADALNYCH**

GLYCIDYL FATTY ACID ESTERS AND
MONO-3-CHLOROPROPANE-1,2-DIOL FATTY ACID
ESTERS – NEW CONTAMINATION IN EDIBLE OILS

Magda Aniołowska*, Agnieszka Kita

*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa
ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630, Wrocław
e-mail: magda.aniolowska@wnoz.up.wroc.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Mechanizm powstawania GE i estrów 3-MCPD w olejach jadalnych
2. Toksyczność GE i estrów 3-MCPD
3. Występowanie GE i estrów 3-MCPD w żywności
4. Ograniczenie powstawania GE i estrów 3-MCPD w żywności
5. Sposoby oznaczania zawartości GE i estrów 3-MCPD w żywności

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane





Mgr inż. Magda Aniołowska w roku 2011 ukończyła biotechnologię na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Obecnie jest doktorantką w Katedrze Technologii Rolnej i Przechowalnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu na kierunku technologia żywności i żywienia. Prowadzi badania nad wpływem parametrów technologicznych smażenia na zawartość estrów glicydylowych w olejach i smażonych produktach.



Dr hab. inż. Agnieszka Kita w roku 1995 ukończyła studia na Wydziale Technologii Żywności Akademii Rolniczej we Wrocławiu. Stopień naukowy doktora nauk rolniczych (1999) oraz doktora habilitowanego w zakresie technologii żywności i żywienia (2006) uzyskała na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. Obecnie pracuje w Katedrze Technologii Rolnej i Przechowalnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu na stanowisku profesora nadzwyczajnego. Specjalność – technologia żywności i żywienia.

ABSTRACT

The aim of the review was to characterize and describe the physicochemical properties and methods for the determination of two types of compounds: 3-monochloropropane-1,2-diol fatty acids esters (3-MCPD esters) and glycidyl fatty acids esters (GE) - new contaminants of food products, including vegetable fats.

This paper describes their structure, several possible mechanisms of reactions occurring during the refining of edible oils, leading to an increase of their content in the final product. It is suggested that these compounds are formed from acylglycerols, under the influence of high temperature [9]. The emphasis was put on the toxicity of the products of their deesterification-free 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and glycidol. Glycidol is genotoxic and has an effect on gene mutations and unscheduled DNA synthesis [17]. 3-MCPD is defined by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) as a genotoxic carcinogen [6, 19]. There are three transformation tracks leading to increased levels of 3-MCPD in foods: from 3-MCPD esters, GE and glycidol [14, 15]. The content of 3-MCPD esters and GE in food products was characterized and different processes involving their synthesis were described. Ways of reduction in food products regarding the aspects of raw materials as well as technology were discussed. Among refined vegetable oils, the largest quantities of 3-MCPD esters and GE were found in palm, corn and coconut oils [6, 25]. Finally, the direct and indirect methods of their determination in oils were described. There are new publications reporting on successive improvements of the existing methods for determination of 3-MCPD and its mono- and di-esters, as well as GE in edible oils [42, 43].

Unfortunately, there is still no universal determination method, which would be simple, affordable and accessible for a wider group, such as food producers, that would improve consumer safety.

Keywords: 3-MCPD fatty acid esters, glycidyl fatty acids esters, edible oils

Słowa kluczowe: 3-MCPD estry kwasów tłuszczowych, glicydylowe estry kwasów tłuszczowych, oleje jadalne

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

2-MCPD	- 2-monochloropropan-1,3-diol
3-MCPD	- 3-monochloropropan-1,2-diol
APCI	- jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym
DAG	- diacyloglicerol
GE	- estry glicydylowe kwasów tłuszczowych
GC-MS	- chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
LC-MS	- chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas
LC-TOFMS	- chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu
LOQ	- granica oznaczalności
MAG	- monoacyloglicerol
SIM	- tryb monitorowania pojedynczych jonów
TAG	- triacyloglicerol
TDI	- tolerowane dzienne pobranie (ang. <i>Tolerable Daily Intake</i>)
WKT	- wolne kwasy tłuszczowe

WSTĘP

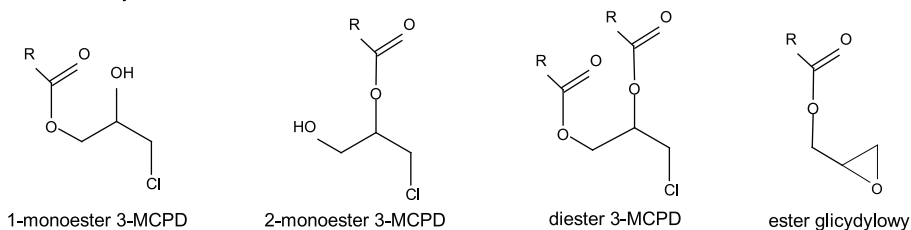
Procesy technologiczne, zwłaszcza obejmujące wysokotemperaturową obróbkę termiczną, mogą prowadzić do powstania w żywności niepożądanych związków chemicznych. W odniesieniu do tłuszczów i produktów uzyskiwanych z ich udziałem są to zarówno izomery *trans* kwasów tłuszczowych jak i liczne produkty degradacji tłuszczu powstające zwłaszcza podczas smażenia – między innymi akrylamid [1]. W ostatnich latach zwrócono uwagę na nową grupę związków – estry kwasów tłuszczowych i 3-monochloropropan-1,2-diolu (3-MCPD) jak i towarzyszące im estry glicydylowe (GE), których obecność stwierdzono w różnego rodzaju tłuszczach rafinowanych oraz produktach uzyskanych z ich udziałem. W odpowiednich warunkach może dochodzić do ich deestryfikacji i uwolnienia wolnego 3-MCPD oraz glicydołu, które ze względu na właściwości toksyczne są związkami niepożądanymi w żywności.

1. MECHANIZM POWSTAWANIA GE I ESTRÓW 3-MCPD W OLEJACH JADALNYCH

Estry glicydylowe, traktowane jako prekursory estrów 3-MPCD, powstają podczas rafinacji – zwłaszcza w trakcie dezodoryzacji [2]. Dezodoryzacja (odwanianie) to ostatni etap procesu rafinacji mający na celu usunięcie z olejów substancji nadających nieprzyjemny smak i zapach, wolnych kwasów tłuszczowych (rafinacja fizyczna), a także wrażliwych na działanie ciepła barwników. Równocześnie usuwane są także związki pożądane takie jak sterole i tokoferole (w olejach roślinnych), co obniża wartość żywieniową tłuszczu. Najpopularniejszą metodą dezodoryzacji jest odwanianie destylacyjne (z przegrzaną parą wodną) podczas którego stosuje się temperatury od 200 do nawet 270°C [3].

GE różnią się pod względem strukturalnym, a także pod kątem możliwości przyłączania reszt kwasów tłuszczowych (Rys. 1). Mogą istnieć tylko jako monoestry, a ich różnorodność strukturalna związana jest z rodzajem reszt kwasów tłuszczowych połączonych z glicydołem [4, 5]. Natomiast estry 3-MCPD, to mieszanina diestrów oraz monoestrów, w której mogą występować różne reszty kwasów tłuszczowych. Monoestry zawierają jeden kwas tłuszczowy, natomiast diestry mogą składać się z dwóch różnych kwasów tłuszczowych. Preferencyjnie najwięcej tworzy się diestrów [6]. Przedmiotem badań większości badaczy stały się estry długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, zarówno nasyconych takich jak palmitynowy (C16:0) i stearynowy (C18:0) oraz nienasyconych, jak oleinowy (C18:1), linolowy (C18:2) i linolenowy (C18:3). Do rzadkości należą prace, w których podjęto się analizy estrów innych kwasów tłuszczowych np. laurynowego (C12:0) i mirystynowego (C14:0) [7, 8].

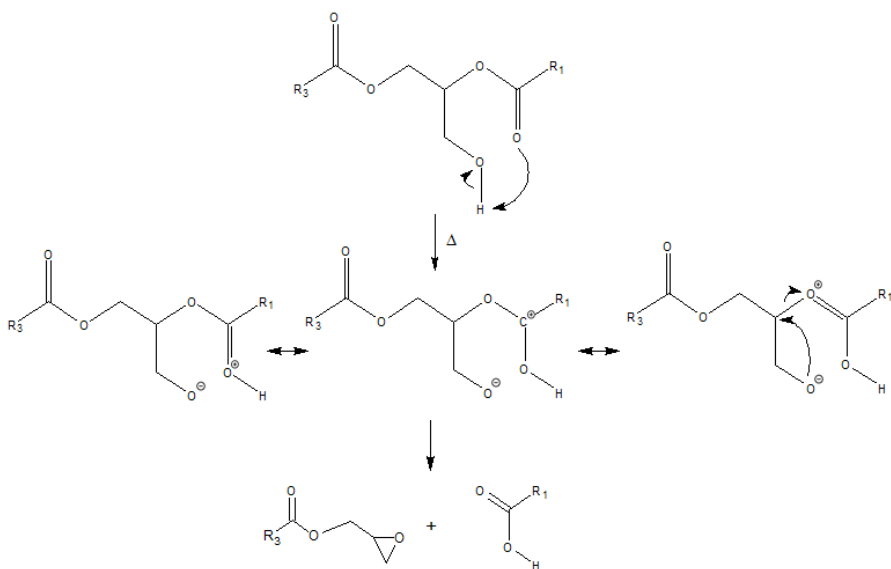
R - łańcuch alkilowy



Rysunek 1. Struktura GE i 3-MCPD [4]

Figure 1. Structure of GE and 3-MCPD [4]

Mechanizm powstawania GE nie jest dokładnie poznany. Sugeruje się, że związki te powstają z diacylogliceroli (DAG). Pod wpływem działania wysokich temperatur w DAG dochodzi do wewnątrzcząsteczkowego przegrupowania, które w konsekwencji prowadzi do eliminacji jednej z reszt kwasów tłuszczowych. Eliminacja ta, może być zainicjowana przez przeniesienie protonu z grupy hydroksylowej na wycylną grupę karboksylową (Rys. 2). Powstały acylooksoniowy jon pośredni może ulec dalszemu przekształceniu poprzez migrację ładunku, powodując uwolnienie kwasu tłuszczowego. Pierścień oksiranowy może być utworzony przez reakcję nukleofilowej grupy alkoksylowej. Teoretycznie, reakcja może zachodzić z udziałem zarówno 1,2 - jak i 1,3-DAG [9].

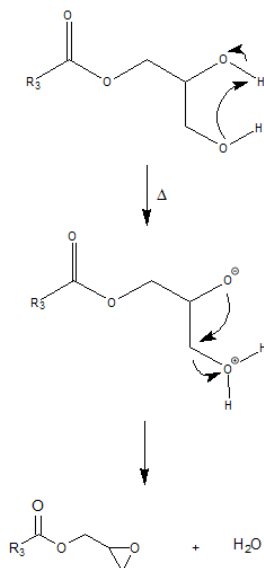


Rysunek 2. Proponowany mechanizm powstawania GE z diacyloglicerolu w wysokiej temperaturze [9]

Figure 2. The proposed mechanism of formation of GE from diacylglycerol at high temperature [9]

W olejach roślinnych, a szczególnie oleju palmowym, prócz DAG obecne są również w niewielkiej ilości monoacyloglicerole (MAG). Biorąc pod uwagę sto-

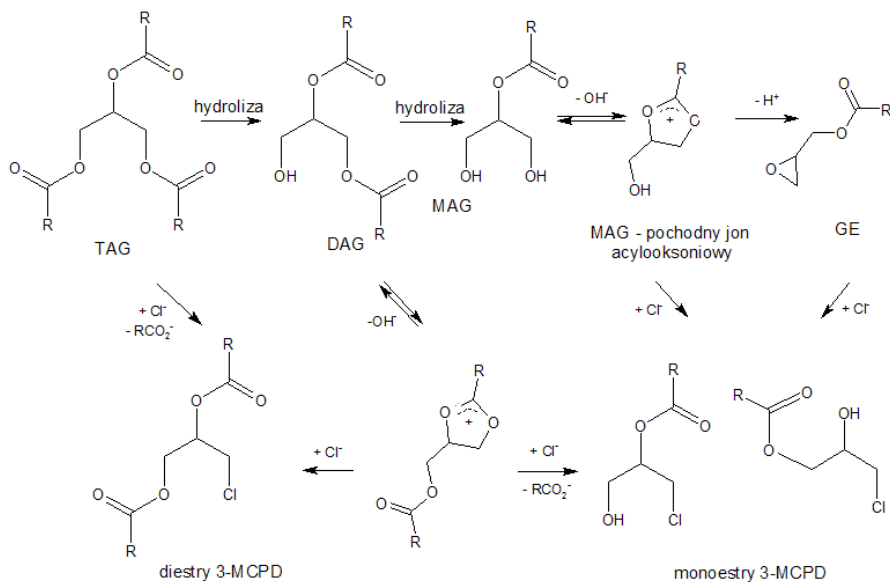
sunkowo duże ilości GE w rafinowanym oleju palmowym, zaproponowano, że GE mogą tworzyć się także z MAG w wyniku dehydratacji cieplnej diolu wicynalnego (Rys. 3). W odróżnieniu od DAG, reakcja ta jest możliwa jedynie z 1(3)-MAG, znanym również jako α -MAG. MAG może być również rozkładany do glicerolu i nasyconego kwasu tłuszczowego z udziałem lipazy MAG (E.C. 3.1.1.34). Jednak biorąc pod uwagę niski ciężar cząsteczkowy glicydotu prawdopodobnie zostaje on usunięty częściowo podczas dezodoryzacji w wyniku działania wysokiej próżni ok. 2 mbara [9].



Rysunek 3. Proponowany mechanizm powstawania GE z monocyloglicerolu w wysokiej temperaturze [9]
 Figure 3. The proposed mechanism of formation of GE from monoacylglycerol at high temperature [9]

Analizując mechanizm tworzenia estrów 3-MPCD w olejach podczas rafinacji stwierdzono, że we wcześniejszych etapach dochodzi do powstania GE, które następnie w obecności jonów chlorkowych mogą ulegać dalszym przekształceniom do estrów 3-MPCD [4]. Zaproponowano kilka możliwych mechanizmów ich powstawania (Rys. 4). W najpopularniejszym z nich założono, że etapem pośrednim jest powstanie jonu acylooksoniowego w wyniku eliminacji cząsteczki wody pochodzącej z MAG [5, 6, 10]. W reakcji tej jon pośredni przekształca się w kwasowym środowisku w cząsteczkę GE, po czym następuje otwarcie pierścienia epoksydowego glicydotu w obecności jonów chlorkowych, w wyniku czego mogą powstać estry 2-MPCD lub 3-MPCD [11]. Inną możliwością jest przegrupowanie wewnątrzcząsteczkowe DAG, z usunięciem grup hydroksylowych [5, 10]. W przypadku obecności jonów chlorkowych dalsza reakcja prowadzi do powstania monoestrów 3-MPCD. Kolejną rozpatrywaną możliwością w tym mechanizmie jest reakcja pochodzącego

z DAG pośredniego jonu acylooksoniowego z jonami chlorkowymi, prowadząca do powstania diestru 3-MCPD [5, 6].



Rysunek 4. Możliwe drogi powstawania GE i estrów 3-MCPD z acylogliceroli [6]

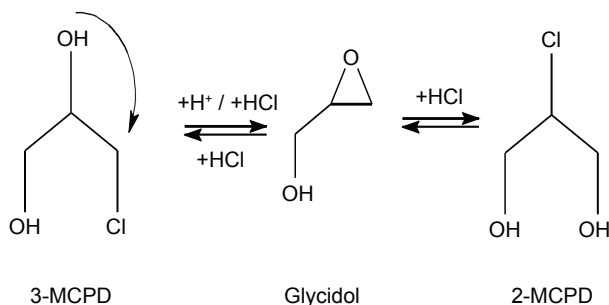
Figure 4. Possible formation pathways of GE and 3-MCPD esters from acylglycerols [6]

Stwierdzono, że istnieje silna korelacja pomiędzy powstawaniem estrów, a składem chemicznym rafinowanego oleju, w tym zawartością MAG i DAG, wolnych kwasów tłuszczowych, a także chlorków pochodzenia organicznego i nieorganicznego oraz fosfolipidów. Dodatkowymi czynnikami sprzyjającymi powstawaniu GE i estrów 3-MCPD są warunki procesu odwaniania, zwłaszcza wysoka temperatura i czas trwania [6, 11, 12]. Tempo formowania GE zwiększa się znacznie po przekroczeniu temperatury 200°C , osiągając najwyższy poziom w temperaturze 240°C . Z kolei do powstawania estrów 3-MCPD dochodzi w temperaturze 200°C , przy czym jej podwyższenie nie wpływa na zwiększenie zawartości estrów w oleju [12, 13].

2. TOKSYCZNOŚĆ GE I ESTRÓW 3-MCPD

Zarówno GE jak i estry 3-MCPD nie wykazują właściwości toksycznych w odniesieniu do organizmów ludzkich i zwierzęcych. Zakłada się jednak, że pod wpływem działania enzymów przewodu pokarmowego mogą one ulegać nawet 100% hydrolizie do wolnego glicydołu i 3-MCPD. Ponadto w obecności jonów chlorkowych może dochodzić do konwersji glicydołu do 3-MCPD. Zakłada się, że przekształcenie to jest odwracalne. Wykazano, że w układach modelowych wraz ze zwiększaniem temperatury rośnie stosunek 2-MCPD do 3-MCPD, co sugeruje

istnienie przemian pomiędzy tymi związkami z występowaniem glicydolu jako produktu pośredniego (Rys. 5) [14, 15].



Rysunek 5. Wzajemna konwersja 3-MCPD i glicydolu [5]

Figure 5. The mutual conversion of 3-MCPD and glycidol [5]

Do uwolnienia chloropropanoli może dochodzić podczas przetwarzania i przechowywania żywności, szczególnie w warunkach niskiego pH i podwyższonej temperatury oraz podczas hydrolizy katalizowanej lipazą w trakcie trawienia w jelicie cienkim [4].

Możliwe są zatem trzy ścieżki przemian prowadzących do zwiększenia zawartości 3-MCPD w żywności: z estrów 3-MCPD, GE oraz glicydolu.

Glicydol i 3-MCPD należą do związków o określonym działaniu toksykologicznym, w tym mutagennym i rakotwórczym. Glicydol to powszechnie używany w przemyśle monomer o bardzo szerokim zastosowaniu. Używany jest w detergentach, kosmetykach, preparatach farmaceutycznych i w przemyśle chemicznym [16]. W żywności glicydol znalazł zastosowanie w produkcji emulgatorów stosowanych w produkcji margaryn, mixów i lodów. Jego działanie genotoksyczne opiera się m.in. na mutacjach genowych i nieplanowanej syntezie DNA. Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IRAC) glicydol zaliczany jest do grupy kancerogenów (grupa 2) i mutagenów (grupa 3), a także do związków szkodliwych dla rozrodczości (grupa 2) [17]. Kancerogenność glicydolu dotyczy przede wszystkim ośrodkowego układu nerwowego oraz płciowego u mężczyzn [6, 18].

3-MCPD będący zanieczyszczeniem żywności, określany jest przez Wspólny Komitet FAO/WHO ds. Dodatków do Żywności (JECFA) mianem genotoksycznego kancerogenu [6, 19]. Na jego szkodliwe działanie narażone są w szczególności nerki, ośrodkowy układ nerwowy, a także jądra co może przekładać się na zanik płodności u mężczyzn. Dopuszczalne dzienne pobranie tego szkodliwego związku (TDI) wynosi 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ masy ciała [4, 6, 12].

3. WYSTĘPOWANIE GE I ESTRÓW 3-MPCD W ŻYWNOCI

3-MPCD po raz pierwszy jako zanieczyszczenie żywności został zidentyfikowany w 1978 roku w roślinnych hydrolizatach białkowych (ang. *hydrolysed vegetable proteins*, HVP) i produktach pochodnych, takich jak sosy sojowe [20]. Obecność estrów 3-MPCD, a następnie towarzyszących im GE, stwierdzono w większych ilościach kilka lat temu w rafinowanych olejach jadalnych. Warunki w jakich powstają w produktach spożywczych nie są w szczegółach dotąd poznane. Zakłada się, że w żywności prekursorami 3-MPCD są związki lipidowe i chlorowodór. Wyniki badań modelowych sugerują, że 3-MPCD może tworzyć się m.in. z glicerolu i innych alkoholi wielowodorotlenowych (po rozpadzie lipidów), z alkoholu alilowego, chloru (także z NaCl) i podchlorynów zawartych w wodzie wodociągowej, lipidów oraz z fosfolipidów, węglowodanów i wreszcie z epichlorhydrin migrujących z torebek do herbaty, filtrów do kawy, osłonek do wędlin, serów i różnych opakowań papierowych [21].

Większość procesów stosowanych podczas przetwarzania żywności (np. hydroliza kwasem solnym białek roślinnych) jak i jej przygotowania bezpośrednio do spożycia (np. pieczenie, wędzenie, grillowanie, obróbka mikrofalowa itd.) stosowanych w przemyśle spożywczym i w gospodarstwach domowych stwarza dogodne warunki do powstawania chloropropanoli i ich prekursorów [22, 23].

W kolejnych badaniach stwierdzono obecność estrów 3-MPCD w produktach wytworzonych na bazie tłuszczów rafinowanych, a także w innych poddanych obróbce termicznej w wysokich temperaturach, takich jak: produkty zbożowe, prażona kawa, ryby wędzone, produkty mięsne, mleczne, a także w sosach na bazie białek roślinnych otrzymywanych na drodze hydrolizy kwasowej, np. sojowych (Tab. 1) [4, 6].

Tabela 1. Zawartość estrów 3-MPCD w wybranych produktach spożywczych [24]

Table 1. The content of 3-MPCD esters in selected food products [24]

Produkt spożywczy	Estry 3-MPCD [mg/ kg]
oleje rafinowane	0,150
pieczywo chrupkie	0,420
skórka chleba	0,547
ciemna mąka	0,580
kawa zbożowa	0,721
pączki	1,210
frytki	6,100

Wśród rafinowanych olejów roślinnych największe ilości GE i estrów 3-MPCD stwierdzono w oleju palmowym, kukurydzianym i kokosowym (do 6,3 mg/kg) (Tab. 2). Z kolei najmniejszą ilością charakteryzował się olej rzepakowy [6, 25].

Tabela 2. Zawartość GE i estrów 3-MPCD w rafinowanych olejach jadalnych [mg/kg] [25]
 Table 2. Content of GE and 3-MPCD esters in refined edible oils [mg/kg] [25]

Oleje rafinowane	GE [mg/kg]	Estry 3-MPCD [mg/ kg]
palmowy	0,3–6,3	1,0–5,8
kukurydziany	0,6	1,7
kokosowy	0,5	0,6
sojowy	0,5	0,9
z nasion palmy oleistej	0,5	1,7
słonecznikowy	0,4	1,0
rzepakowy	< 0,1	0,4

Podjęto również badania nad określeniem składu GE występujących w rafinowanych olejach. W badaniach porównawczych prowadzonych w 17 różnych ośrodkach badawczych z całego świata z zastosowaniem techniki LC-MS wykazano, że zawartość GE była skorelowana ze składem kwasów tłuszczowych analizowanych olejów (Tab. 3) [26].

Tabela 3. Zawartość GE oznaczona przez 17 laboratoriów w trakcie badań porównawczych [26]
 Table 3. Contents of GE determined by 17 laboratories during comparative studies [26]

Oleje rafinowane	GE [mg/kg]				
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
palmowy	2,34	0,50	5,11	1,33	< LOQ
kukurydziany	0,20	< LOQ	0,82	1,49	< LOQ
sojowy	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,48	< LOQ
rzepakowy	< LOQ	< LOQ	0,45	< LOQ	< LOQ

4. OGRANICZANIE POWSTAWANIA GE ORAZ ESTRÓW 3-MCPD W ŻYWNOŚCI

Najlepszym sposobem ograniczenia powstawania chloropropanoli w hydrolizatach białek roślinnych jest zastąpienie hydrolizy kwasowej hydrolizą enzymatyczną. Taka modyfikacja umożliwia zwiększenie pH produktów o wysokiej zawartości wody, co zapobiega tworzeniu się szkodliwych substancji i ich prekursorów. W odniesieniu do produktów wędzonych wykazano, że dodatek węgla sodu do komory wędzarniczej zmniejsza powstawanie chloropropanoli. W przypadku pieczywa, w którym omawiane związki powstają podczas pieczenia, zawartość ich można zredukować przez optymalizację receptury – zwłaszcza udziału cukru. W badaniach wykazano, że duży dodatek cukru przyczynia się do znacznej syntezy glicerolu. Innym sposobem ograniczenia ilości powstających 2-MCPD i 3-MCPD jest stosowanie pieczenia z użyciem pary [27].

Poszukując sposobów ograniczenia lub eliminacji tej niepożądanego grupy związków z żywności rozpatrywano zagadnienia związane z jakością surowca,

a także parametrami technologicznymi. Analizując surowce olejarские, największe prawdopodobieństwo występowania GE i estrów 3-MCPD w końcowym produkcie dają palma oleista i kokosowa oraz kukurydza. Duże zróżnicowanie w jakości oleju palmowego związane jest zarówno z surowcem, na który wpływ mają takie czynniki jak klimat, rodzaj gleby i nawożenia oraz genotyp rośliny, jak i sposób przetwarzania surowca, zwłaszcza parametry rafinacji [11, 12].

Powstawanie GE i estrów 3-MCPD jest silnie skorelowane z obecnością ich prekursorów w oleju surowym, w tym wolnych kwasów tłuszczowych i DAG. Dowiedziono, że większą ilością produktów hydrolizy TAG charakteryzowały się oleje produkowane z miąższu w porównaniu z olejami otrzymanymi z nasion [11]. Stwierdzono, że zawartość DAG i WKT powyżej 3–4% w przetwarzanym surowcu zwiększa istotnie zawartość estrów w otrzymanym oleju rafinowanym. Stąd też, jednym ze sposobów ograniczania powstawania GE i estrów 3-MCPD może być skrócenie czasu i optymalizacja drogi pomiędzy zbiorem surowca a kolejnymi etapami przetwarzania [12, 28]. W przypadku palmy oleistej istotne jest, aby owoce zbierane były w optymalnym stopniu dojrzałości, co zapobiega opadaniu i obtłuczeniom [28]. Po zbiorze, w możliwie jak najkrótszym czasie, który nie powinien przekraczać 24 h, kiście palmy oleistej poddawane są sterylizacji [29]. Pozwala to na zahamowanie przemian hydrolitycznych związanych z intensywną działalnością lipaz znajdujących się w owocach, aktywujących się po odcięciu kiści, a przez to na ograniczenie powstawania wolnych kwasów tłuszczowych i DAG [29, 30]. Inną możliwością obniżenia poziomu DAG jest uprawa specjalnych gatunków roślin oleistych o obniżonej aktywności lipaz lub poprzez enzymatyczną estryfikację DAG do TAG [11]. Do prekursorów niezbędnych przy tworzeniu estrów 3-MPCD należą także związki zawierające chlor, naturalnie występujące w surowcu lub pobierane przez roślinę z gleby i pestycydów. Ich poziom w oleju surowym zależy od genotypu rośliny, rodzaju gleby i stosowanych pestycydów. Ilość chlorków oraz innych prekursorów w oleju surowym może być zredukowana dzięki zastosowaniu wstępnego etapu przygotowującego olej do obróbki, takiego jak przemywanie oleju przed rafinacją wodą pozbawioną chloru w temperaturze 100°C przez 20 min [11, 12].

W odniesieniu do olejów jadalnych poddawanych rafinacji kluczową rolę odgrywają parametry dezodoryzacji. Jednym z efektów tego procesu jest „wybielanie cieplne” – najbardziej widoczne podczas obróbki oleju palmowego, którego celem jest rozkład termiczny karotenów. Degradacja cieplna karotenu jest bardzo powolnym procesem w temperaturze 210°C, podczas gdy w $T > 260^\circ\text{C}$ trwa tylko kilka minut. Z tego względu powszechnie dezodoryzację oleju palmowego prowadzi się w wysokich temperaturach, co pozwalało na istotne skrócenie czasu procesu. Uwzględniając niekorzystne zmiany związane z tworzeniem GE i estrów 3-MCPD, w ostatnich latach zmodyfikowano parametry prowadzenia procesu odwaniania [12, 24]. Ze względu na wykazaną zależność przede wszystkim pomiędzy temperaturą procesu, a ilością powstających estrów zaproponowano łagodniejsze warunki prowadzenia dezodoryzacji poprzez obniżenie „obciążenia cieplnego” (czasu prze-

bywania oleju w wysokiej temperaturze). Obecnie typowe warunki prowadzenia procesu dezodoryzacji oleju jadalnego to:

- niższa temperatura ($< 200^{\circ}\text{C}$) dla olejów wrażliwych na ciepło (np. masło kakaowe, olej z ryb), aby uniknąć zbyt dużej degradacji kwasów tłuszczowych omega-3 (olej rybny) i negatywnego wpływu na właściwości krystalizacji (masło kakaowe),
- wyższe temperatury (ok. 260°C) – wybielania cieplne (np. fizyczna rafinacja oleju palmowego) [31].

W celu zredukowania zawartości estrów 3-MCPD i GE w rafinowanych olejach początkowo zaproponowano obniżenie temperatury dezodoryzacji ($230\text{--}240^{\circ}\text{C}$). Hrnčirik i van Duijn (2011) wykazali jednakże, że nawet w stosunkowo niskich temperaturach dezodoryzacji (230°C), chemicznie lub fizycznie rafinowany olej palmowy może zawierać duże ilości GE (na poziomie około 2 mg/kg). Zauważyli ponadto, że ich zawartość może zwiększać się wykładniczo wraz z wydłużaniem czasu i zwiększaniem temperatury dezodoryzacji [25, 32]. W badaniach prowadzonych przez Destailats i in. (2012) analizowano wpływ temperatury w zakresie od 180 do 240°C (z przyrostem co 20°C) na zawartość GE w oleju palmowym. Wykazano, że w temperaturze poniżej 200°C tworzenie GE było minimalne. Istotne zwiększenie zawartości obserwowano w temperaturze powyżej $220\text{--}230^{\circ}\text{C}$, osiągając poziom ok. $1,8\text{ mg/kg}$ GE w 240°C [9]. W innych badaniach również stwierdzono zawartość GE na poziomie ok. 2 mg/kg , w oleju palmowym dezodoryzowanym w temperaturze 230°C dłużej niż jedną godzinę. Badania te potwierdzają konieczność zmiany parametrów procesu rafinacji zwłaszcza poprzez obniżenie maksymalnej temperatury oraz obciążenia cieplnego. Jednym z zaproponowanych rozwiązań jest prowadzenie dezodoryzacji dwustopniowej, w której wysoką temperaturę powyżej 250°C stosuje się tylko przez kilka pierwszych minut, a następnie do końca procesu (przez kilkadziesiąt minut) utrzymywana jest temperatura 200°C . Zaletą tego rozwiązania jest nie tylko zmniejszenie zawartości estrów, ale również ilości izomerów *trans* kwasów tłuszczowych [12].

Drugim ważnym aspektem mającym wpływ na zawartość chloropropanoli i ich estrów w olejach jest obecność jonów chlorkowych w środowisku reakcji. Ich eliminacja poprzez zwrócenie uwagi na jakość wody używanej w procesie rafinacji stanowi jeden z kluczowych elementów modyfikacji prowadzącej do zmniejszenia zawartości tej grupy zanieczyszczeń na etapie produkcji. Kolejną modyfikacją dotyczącą etapu dezodoryzacji może być wprowadzenie dodatku chemicznych substancji pomocniczych. Szczególnie interesujące wydaje się zastosowanie diacetonu, charakteryzującego się niską ceną, nietoksycznością oraz możliwością całkowitego usunięcia z procesu dzięki niskiej temperaturze wrzenia. W trakcie reakcji diaceton przyłącza związki chloru, co pomaga zredukować do 50% ilość estrów. Dodatek kwasu cytrynowego lub szczawiowego do pary wodnej również wpływa na zmniejszenie ilości GE. Produkty tej reakcji są usuwane pod postacią kondensatu. Dodatkowo estry 3-MPCD można usunąć absorpcyjnie stosując zeolit, tuż po procesie rafinacji.

Alternatywną metodą może być także zastosowanie kondensacyjnych komór próżniowych, w których estry glicydotu oddziela się od oleju wraz z kondensatem [28].

5. SPOSOBY OZNACZANIA ZAWARTOŚCI GE I ESTRÓW 3-MCPD W ŻYWNOSCI

Obecność GE w olejach roślinnych stwierdzono przypadkowo w badaniach mających na celu określenie pochodzenia 3-MCPD i jego estrów z kwasami tłuszczowymi. Weißhaar i Perz (2010) w badaniach ukierunkowanych na identyfikację prekursorów tych związków wykazali, że badane oleje charakteryzowały się stosunkowo dużą zawartością GE [25]. Z kolei Masukawa i in. (2010) analizując oleje pobrane z sieci handlowej w Japonii stwierdzili, że GE obecne były w każdej badanej próbce [34]. Weißhaar i Perz (2010) opracowali metodę pośrednią, stosując GC-MS do ilościowego oznaczenia GE proponując dwa różne sposoby przygotowania próby (opcja A oraz B), które zostały przyjęte jako jedna z metod standardowych DGF (Deutsche Gesellschaft für Fachkrankenpflege und Funktionsdienste). Opcja A polega na oznaczeniu poziomu 3-MCPD oraz sumy jego prekursorów czyli estrów 3-MCPD oraz GE. Opcja B pozwala z kolei na oznaczenie estrów 3-MCPD po całkowitej eliminacji GE w procesie przygotowania próbki poprzez zastosowanie kwasu siarkowego. Poziom GE oblicza się jako różnicę między tymi dwoma oznaczeniami (od wyniku uzyskanego stosując opcję A odejmuje się wynik otrzymany w opcji B) [33].

Okazało się jednak, że analiza estrów MCPD i GE w olejach roślinnych metodą pośrednią proponowaną przez DGF dawała niespójne wyniki ze względu na zróżnicowane warunki wysolenia. W kolejnych badaniach wykazano, że w trakcie analizy dochodzi do rozkładu i ponownego tworzenia MCPD. W odpowiedzi, opracowano metodę bezpośredniej analizy GE w olejach roślinnych z wykorzystaniem LC-TOFMS [34]. Stosując LC-TOFMS oznaczono z powodzeniem także estry 3-MCPD w wielu różnych próbach olejów [35]. Shimizu i in. (2010) również zwrócili uwagę na błąd w proponowanej metodzie pośredniej, stwierdzając że oznaczana zawartość GE jest niedoszacowana, gdy oleje zawierają relatywnie duże ilości GE i/lub acylogliceroli, które są również częściowo analizowane. Wyniki otrzymane stosując proponowane metody bezpośrednie porównano z metodą DGF. Okazało się, że stosując metodę DGF wyniki były wyższe niż przy użyciu techniki LC-TOFMS. W metodzie pośredniej obecność estrów MCPD i GE stwierdzono w każdej analizowanej próbce olejów roślinnych. Natomiast w metodzie porównawczej nie stwierdzono obecności monoestrów MCPD, a diestry MCPD zidentyfikowano tylko w niektórych próbach zawierających olej palmowy [36].

W tym samym czasie, Shiro i in. (2011) opracowali metodę bezpośredniego oznaczenia ilościowego pięciu GE (kwasu palmitynowego, stearynowego, oleinowego, linolowego i linolenowego) w oleju z wykorzystaniem kombinacji podwójnego oczyszczania z użyciem SPE i za pomocą LC-MS [37]. Podobną technikę zasto-

sowali Blumhorst i in. (2011) dokonując dalszych jej modyfikacji [7]. W kolejnych badaniach Masukawa i in. (2011) opracowali metodę ilościowego oznaczenia GE w olejach jadalnych przy użyciu spektrometru masowego z pojedynczym kwadrupolem - instrumentu, który jest niedrogi i łatwy w obsłudze, a przygotowanie próbki wymaga dwóch ekstrakcji w fazie stałej i odparowania rozpuszczalnika [38]. Metoda ta została następnie po raz kolejny zmodyfikowana [39] w celu poprawy sposobu przygotowania próbki i wykorzystania jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) w połączeniu z LC-MS pracującym w trybie selektywnego monitorowania jonu (SIM). Po wprowadzeniu zmian, w 2012r. metoda została przyjęta przez American Oil Chemists' Society, jako technika standardowa [40]. Wadą tej metody jest stosowanie systemu izokratycznego zamiast liniowego gradientu proponowanego przez Granvogl i Schieberle (2011) [41]. Wciąż pojawiają się nowe publikacje donoszące o kolejnych udoskonaleniach istniejących metod pozwalających na oznaczenia 3-MCPD, jego mono- i diestrów, a także GE w olejach jadalnych [42, 43].

UWAGI KOŃCOWE

Od kilku lat uwaga badaczy z całego świata skupiona jest na GE oraz estrach 3-MCPD jako nowopoznanych zanieczyszczeniach żywności, w tym olejów jadalnych. Mimo ciągłej pracy nad poszerzeniem wiedzy w zakresie mechanizmów ich powstawania, istnieje wiele zagadnień wymagających dalszego poznania. Brak udowodnionego negatywnego wpływu GE oraz estrów 3-MCPD na ludzi i zwierzęta nie oznacza, że można bagatelizować ich obecność w produktach spożywczych. Wciąż brakuje uniwersalnej metody oznaczania, która byłaby prosta, tania oraz dostępna dla szerszego grona np. producentów żywności, co przyczyniłoby się do poprawy bezpieczeństwa konsumentów. Przedmiotem szczególnego zainteresowania powinny stać się również dalsze ich przemiany wynikające m.in. z obróbki ciepłej żywności np. podczas smażenia. Dostarczyłoby to kolejnych odpowiedzi na pytania odnośnie sposobów ograniczania występowania GE oraz estrów 3-MCPD, a także produktów ich hydrolizy w olejach jadalnych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Tajner-Czopek, *Wpływ zabiegów technologicznych na właściwości frytek ziemniaczanych i zawartość akrylamidu*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław 2011.
- [2] F. Pudiel, P. Benecke, P. Fehling, A. Freudenstein, B. Matthaus, A. Schwaf, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 368.
- [3] PN-A-86908:2000. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Rafinowane oleje roślinne.
- [4] G. Eisenbrand, S. Guth, M. Habermeyer, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **112**, 158.
- [5] A.K.K. Rahn, V.A. Yaylayan, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 323.

- [6] N. Bakhiya, K. Abraham, R. Gurtler, K.E. Appel, A. Lampen, *Molecular Nutrition and Food Research*, 2011, **55**, 509.
- [7] M.R. Blumhorst, P. Venkatasubramanian, M.W. Collison, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2011, **88**, 1275.
- [8] M. Dubois, A. Tarres, T. Goldmann, G. Loeffelmann, A. Donaubauer, W. Seefelder, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 12291.
- [9] F. Destailats, B.D. Craft, M. Dubois, K. Nagy, *Food Chem.*, 2012, **131**, 1391.
- [10] B.D. Craft, M. Dubois, K. Nagy, F. Destailats, *Food Chem.*, 2012, **132**, 73.
- [11] C.G. Hamlet, L. Asuncion, J. Velisek, M. Dolezal, Z. Zelinkova, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 279.
- [12] A. Freudenstein, B. Matthäus, F. Pudel, T. Rudolph, *Advances in Research and Technology of Rape-seed Oil*, WNUMK, Toruń 2011.
- [13] B.D. Craft, A. Chiodini, J. Garst, M. Granvogl, *Food Addit. Contam. A*, 2013, **30**(1), 46.
- [14] J. Velíšek, M. Doležal, C. Crews, T. Dvořák, *CJFS*, 2002, **20**, 161.
- [15] C.G. Hamlet, P.A. Sadd, *Eur. Food Res. Technol.*, 2002, **215**, 46.
- [16] B. Schilter, G. Scholz, W. Seefelder, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 309.
- [17] *IARC Monographs on the Evaluation of Carcino-genic Risk of Chemicals to Humans*, vol. 77, Lyon 2000.
- [18] Federal Institute for Risk Assessment (BfR) Initial evaluation of the assessment of levels of glycidol fatty acid esters detected in refined vegetable fats (in German) [online] [dostęp: 2014-04-21]. Dostępny w internecie: http://www.bfr.bund.de/cm/349/initial_evaluation_of_the_assessment_of_levels_of_glycidol_fatty_acid_esters.pdf
- [19] Oświadczenie Panelu Naukowego ds. Zanieczyszczeń w łańcuchu żywnościowym (CONTAM) na wniosek Komisji Europejskiej, dotycząca estrów 3-MCPD [online], [dostęp: 2014-04-21]. Dostępny w internecie: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1048.pdf>
- [20] H. Gawarska, D. Sawilska-Rautenstrauch, A. Starski, K. Karłowski, *Rocz. Panstw. Zakł. Hig.*, 2009, **60**(3), 213.
- [21] W. Seefelder, G. Scholz, B. Schilter, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 319.
- [22] B. Matthäus, F. Pudel, P. Fehling, K. Vosmann, A. Freudenstein, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 380.
- [23] Z. Zelinkova, B. Svejkovska, J. Velisek, M. Dolezal, *Food Addit. Contam. A*, 2006, **23**, 1290.
- [24] R. Weißhaar, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 304.
- [25] R. Weißhaar, R. Perz, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2010, **112**, 158.
- [26] M.R. Blumhorst, M.W. Collison, R. Cantrill, H. Shiro, Y. Masukawa, S. Kawai, K. Yasunaga, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2013, **90**, 493.
- [27] M. Dolezal, J. Velisek, *Proceedings of Chemical Reactions in Foods II*, Praga, 1992.
- [28] B.D. Craft, K. Nagy, W. Seefelder, M. Dubois, F. Destailats, *Food Chem.*, 2012, **132**, 73.
- [29] A. Southworth, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1985, **62**(2), 250.
- [30] Y.M. Choo, A.S.H. Ong, C.K. Ooi, *Developments In Oils and Fats*, Chapman & Hall, Liverpool, 1995.
- [31] Komisja Europejska, Zintegrowane zapobieganie zanieczyszczeniom i ich ograniczanie. Dokument referencyjny na temat najlepszych dostępnych technik w przemyśle spożywczym. [online], [dostęp: 2014-04-21]. Dostępny w internecie: [http://ippc.mos.gov.pl/ippc/custom/BREF_spozy\(1\).pdf](http://ippc.mos.gov.pl/ippc/custom/BREF_spozy(1).pdf)
- [32] K. Hrciric, G. van Duijn, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 374.
- [33] Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft: DGF Standard Method C III 18 (2009) Determination of ester-bound 3-chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD esters) and 3-MCPD forming substances in fats and oils by means of GC-MS. Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (Germany).

- [34] Y. Masukawa, H. Shiro, S. Nakamura, N. Kondo, N. Jin, N. Suzuki, N. Ooi, N. Kudo, *J. Oleo Sci.*, 2010, **59**(2), 81.
- [35] T.D. Haines, K.J. Adalf, R.M. Pierceall, I. Lee, P. Venkitasubramanian, M.W. Collison, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2011, **88**, 1.
- [36] M. Shimizu, N. Kudo, H. Shiro, K. Yasunaga, Y. Masukawa, Y. Katsuragi, Yasumasu T., *JOCS*, 2010, **59**(10), 535.
- [37] H. Shiro, N. Kondo, N. Kibune, Y. Masukawa, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 356.
- [38] Y. Masukawa, H. Shiro, N. Kondo, N. Kudo, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2011, **88**, 15.
- [39] A. Becalski, S. Y. Feng, B. P.-Y. Lau, T. Zhao, *ABC*, 2012, **403**, 2933.
- [40] AOCS/JOCS Official Method Cd 28-10, *Glycidyl Fatty Acid Esters in Edible Oils*, Approved 2012.
- [41] M. Granvogl, P. Schieberle, Quantitation of glycidyl esters via stable isotope dilution analysis. [online], [dostęp: 2014-04-21]. Dostępny w internecie: http://www.aocs.org/files/resourcespdf/3_aocs_cinnati_030511.pdf
- [42] S. MacMahon, E. Mazzol., T. H. Begley, G. W. Diachenko, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 4737.
- [43] S. MacMahon, T.H. Begley, G.W. Diachenko, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk. Assess.*, 2013, **30**(12), 2081.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 czerwca 2014

