

Strona czasopisma: <http://analit.agh.edu.pl/>

Badanie stężenia ołowiu i cynku w ekstraktach z maślaków zwyczajnych rosnących na terenie Nadleśnictwa Olkusz

Determination the concentration of lead and zinc in extracts of slippery jack growing in the Olkusz Forest District

Gabriel Moskal, Dominika Łękawa, Anna Potoczek

AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, Polska

ABSTRAKT: W pracy przeprowadzono woltamperometryczne badanie stężenia ołowiu i cynku w próbkach owocników maślaka zwyczajnego wyekstrahowanych za pomocą ultradźwięków. Próbki zostały zebrane na terenie Nadleśnictwa Olkusz. Gatunek grzyba został wybrany ze względu na jego powszechne występowanie na tym terenie, również w miejscach gdzie odbywa się aktywne wydobywanie surowców bogatych w cynk i ołów. Zanalizowano roztwory uzyskane poprzez ekstrakcje suszonych owocników w wodzie bidestylowanej oraz w rozcieńczonym kwasie octowym. Pomiary przeprowadzono z wykorzystaniem woltamperometrii różnicowej w układzie wykorzystującym wiszącą elektrodę rtęciową jako elektrodę pracującą.

ABSTRACT: This study was conducted to determine the concentration of lead and zinc in the samples of slippery jack using voltammetry. The samples were prepared similarly to the preparation of this fungi for food purposes. The mushrooms were collected in the Olkusz Forest District. The mushroom species was chosen because of its widespread occurrence in this area, also in places where raw materials containing zinc and lead are extracted. Analyses of the solutions obtained by extraction of dried mushroom's fruit bodies in bidistilled water and in dilute acetic acid were carried out. Measurements were performed using Differential Pulse Voltammetry in a system using a hanging mercury electrode.

Słowa kluczowe: ołów, cynk, grzyby, woltamperometria

1. Wstęp

1.1. Charakterystyka grzybów

Duże zainteresowanie budzi zawartość metali ciężkich w grzybach, w szczególności w grzybach jadalnych. Są one uznany surowcem spożywczym, przetwarzanym w znacznej ilości w skali domowej oraz przemysłowej [1]. Często spotykaną formą są wywary w postaci zup i sosów oraz marynata w occie. Zakłada się, że roczne spożycie sięga kilku kilogramom świeżej masy na osobę, aczkolwiek w pewnych regionach może być kilkukrotnie wyższe [2].

Wartość odżywcza grzybów nie jest duża. Zawierają one nieznaczne ilości białek, kwasów tłuszczowych, sacharydów, witamin oraz składników mineralnych [3,4]. Białko znajdujące się w grzybach cechuje bardzo dobra przyswajalność, sięgającą do 90%, a około 75% całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych stanowią niezbędne kwasy nienasycone. Do składników mineralnych znajdujących się w grzybach możemy zaliczyć: wapń, magnez, potas i fosfor oraz mikroelementy cynku, miedzi, manganu, żelaza i molibdenu a do witamin ryboflawinę (B2), niacynę (B3) i folacynę (B9) [5,6].

Grzyby charakteryzują się również wysoką zdolnością do nagromadzania metali ciężkich [1,2,3]. Procesy te zależą od wielu czynników genetycznych i środowiskowych. Gleba, jako jeden z nich jest więc istotnym elementem [1,3]. Metale ciężkie nie ulegają biodegradacji ani rozpadowi, dlatego w środowisku naturalnym ich największe stężenie występuje w glebie [7].

1.2. Charakterystyka terenu Nadleśnictwa Olkusz

Wśród terenów, które obejmuje Nadleśnictwo Olkusz, wyróżnić można rejon powiatu olkuskiego (gminy Bukowno, Bolesław, Klucze, Olkusz, Trzyciąż i Wolbrom) [8]. Na terenie tym prowadzona jest od wielu lat działalność górnicza, związana z eksploatacją rud cynku i ołowiu. Zachodnia część tego obszaru charakteryzuje się glebami o niskiej klasie bonitacji, które zanieczyszczone metalami ciężkimi prowadzą do skażeń produktów rolnych m.in. ołowiem, kadmem i cynkiem. Zakwaszenie gleb przyczynia się dodatkowo do potęgowania intensywności pobierania przez rośliny metali, a więc zwiększania stopnia skażenia żywności [9].

Grzyby rosnące na tych terenach, zbierane są na dużą skalę w celach głównie handlowych. W ten sposób trafiają do szerokiego grona konsumentów.

1.3. Charakterystyka ołowiu

Jednym z rozpatrywanych metali ciężkich jest ołów. Ten szeroko rozpowszechniony w przyrodzie pierwiastek jest znany i wykorzystywany od ponad 4500 lat. W układzie okresowym znajduje się w 14 grupie, 6 okresie. W warunkach standardowych jest ciałem stałym o temperaturze topnienia 327.4°C i temperaturze wrzenia 1749°C. Jego liczba atomowa jest równa 82 zaś masa atomowa 207.19 [10].

W związkach chemicznych ołów występuje na +II i +IV stopniu utlenienia. Wystawiony na działanie powietrza, pokrywa się warstwą tlenku chroniącą przed korozją. Nie wchodzi w reakcję z azotem, parą wodną, czy fluorowodorem. W podwyższonej temperaturze reaguje z chlorem, fluorem i siarką. W obecności powietrza wchodzi w reakcję z kwasem octowym, stężonym kwasem azotowym i siarkowym, a w obecności utleniaczy z rozcieńczonym kwasem solnym [7].

Do organizmu ludzkiego ołów dostarczany jest głównie przez układ pokarmowy i oddechowy. Po wchłonięciu pierwiastek ten wiąże się z erytrocytami i transportowany jest przez układ krwionośny do tkanek i narządów, w których się akumuluje. Większość przyjętego ołowiu gromadzi się w wątrobie, sercu, nerkach, następnie w mięśniach i skórze. W końcowym etapie pierwiastek ten odkłada się w kościach, zębach czy paznokciach, w których kumuluje się całe życie [7,12]. Proces wchłaniania zależny jest od diety. Bogata w wapń i fosfor obniża ilość pobieranego ołowiu. Z kolei kwas cytrynowy i askorbinowy nasilają ten proces [7].

Ołów, działając wielonarządowo, jest pierwiastkiem silnie toksycznym dla organizmów żywych. Przyjmuje się, że może być pośrednią przyczyną podwyższonego ciśnienia tętniczego. Działanie to wynika z wpływu tego pierwiastka na układ krążenia poprzez nasilenie procesów miażdżycowych czy kurczliwości naczyń tętniczych.

Ekspozycja na wysokie dawki ołowiu powoduje duże ryzyko wystąpienia niewydolności nerek. Pierwiastek ten ma działanie nefrotoksyczne i może wywołać zaburzenie funkcji nerek oraz rozwinięcie nadciśnienia nerkopochodnego [13].

Metale ciężkie, szczególnie ołów i kadm, znacznie wpływają na układ immunologiczny. Działają głównie na komórki w nim występujące, uszkodzając limfocyty B, limfocyty T, makrofagi oraz komórki cytotoksyczne. Powoduje to zaburzenia czynności krwiotwórczej takie jak trombocytopenia, leukopenia oraz niedokrwistość [14].

Zatrucie ołowiem, kiedyś występujące bardzo często, obecnie należy do rzadkości. Na początku objawia się bólami głowy, słodkawym smakiem w ustach, nudnościami, bólami brzucha o charakterze kolki, zaparciem czy utratą łaknienia. Następnie pojawiają się wymioty, spadki ciśnienia krwi oraz obniżenie temperatury ciała. Dalsza ekspozycja na ołów prowadzi do niewydolności wątroby, niewydolności nerek, uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego i w konsekwencji zgonu. Cechą charakterystyczną osób chorych przewlekłe jest „ołowiana cera”, czyli żółtoszare zabarwienie skóry i „rąbek ołowiowy” na dziąsłach, spowodowany odkładaniem się siarczku ołowiu [15].

1.4. Charakterystyka cynku

Kolejnym analizowanym pierwiastkiem jest cynk. W układzie okresowym znajduje się w 12 grupie, 4 okresie. W warunkach standardowych jest szarawobiałym ciałem stałym o temperaturze topnienia 419.8°C i temperaturze wrzenia 908°C. Jego liczba atomowa wynosi 30 zaś masa atomowa 65.37 g/mol [16].

W związkach chemicznych cynk występuje na +II stopniu utlenienia. Wystawiony na działanie powietrza ulega pasywacji. Pierwiastek ten wchodzi w reakcję z kwasami utleniającymi i nieutleniającymi oraz z mocnymi zasadami. W podwyższonej temperaturze reaguje z tlenem, azotem, fosforem i fluorowcami.

Pierwiastek ten jest mikroelementem odpowiedzialnym za prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Jego jony biorą udział w syntezie, wydzielaniu i przekazywaniu sygnałów o obecności insuliny, jak również wydzielaniu i aktywacji trzustkowych egzoenzymów trawiennych oraz w wydzielaniu glukagonu. Szczególną rolę kationy cynku pełnią w mózgu. W ośrodkowym układzie nerwowym modulują przewodzenie sygnałów nerwowych w synapsach [17].

Do organizmu ludzkiego cynk dostaje się przez układ pokarmowy lub oddechowy. Pobieranie tego pierwiastka regulowane jest hormonalnie i zazwyczaj rośnie proporcjonalnie do jego zawartości w pożywieniu. Uważa się, że toksyczność cynku polega na zaburzeniu metabolizmu metali niezbędnych do prawidłowej pracy organizmu, gdyż jego droga wchłaniania jest taka sama jak glinu i żelaza.

Pierwiastek ten transportowany jest w osoczu jako kompleks cynkowo-makroglobulinowy, albuminowo-cynkowy lub w nieznacznych ilościach jako kompleks z metalotioneiną. Na początku, wchłonięty cynk odkłada się w wątrobie, tworząc kompleksy z białkami. Następnie gromadzi się w gruczołach płciowych i nerkach [12].

W ośrodkowym układzie nerwowym zbyt wysokie stężenie cynku w przestrzeni międzykomórkowej może prowadzić do zahamowania wzrostu i różnicowania neuronów, a nawet do ich śmierci. Dodatkowo, obniżając poziom zredukowanego glutationu wywołuje stres oksydacyjny [16].

Zatrucie cynkiem objawia się obniżonym poziomem miedzi we krwi, upośledzoną odpowiedzią immunologiczną czy redukcją frakcji HDL. W przypadku ostrego zatrucia występują bóle nadbrzusza, wymioty, ospałość i zmęczenie [12].

2. Część badawcza

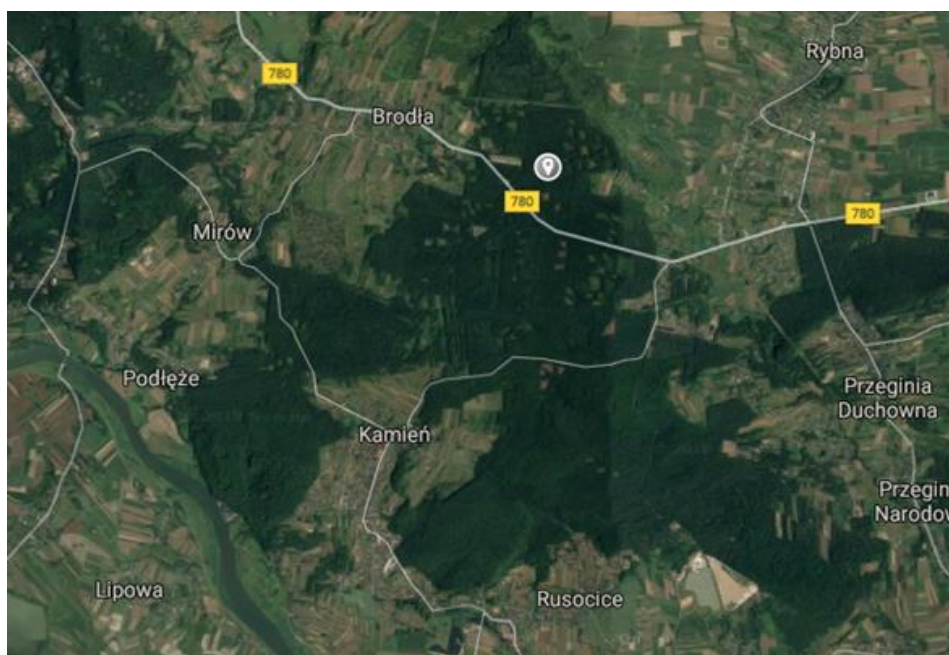
2.1. Pobór Próbek

Owocniki maślaków zwyczajnych pobrano dnia 16 października 2018, na terenach Nadleśnictwa Olkusz, w tym w pobliżu zakładów Górniczo-Hutniczych „Bolesław”. Na **Rysunku 1** przedstawiono zdjęcia satelitarne rejonu, w którym pobrano próbki.



Rysunek 1. Zdjęcie satelitarne rejonu w którym pobrano próbki [19].

Owocniki będące próbkami referencyjnymi zostały pobrane dnia 14 października z terenów przylegających do szkółki leśnej położonej w leśnictwie Brodła. Pobrane owocniki były zbierane do sterylnych woreczków z tworzywa sztucznego. Na **Rysunku 2** przedstawiono zdjęcie satelitarne z oznaczonym oddziałem leśnym w którym pobrano próbki referencyjne.



Rysunki 2. Zdjęcie satelitarne z zaznaczonym oddziałem leśnym w którym pobrano próbki referencyjne [19].

2.2. Sprzęt i aparatura

W celu przeprowadzenia badań wykorzystano aparaturę:

- myjka ultradźwiękowa wodna IS-2, producent InterSonic
- układ woltamperometryczny:
- analizator elektrochemiczny typu M161, producent mtm-anko, Kraków, Polska
- statyw elektrodowy typu M164
- elektroda pracująca: μ CGMDE - mikroelektroda rtęciowa o kontrolowanym wzroście kropli
- elektroda pomocnicza: drut platynowy
- elektroda odniesienia: chlorosrebrowa z podwójnym płaszczem ($\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{M KCl}/3\text{M KNO}_3$)
- mieszadło magnetyczne
- naczynko pomiarowe o objętości 5 ml

2.3. Odczynniki

W celu przeprowadzenia badań zastosowano następujące odczynniki:

- 16M roztwór kwasu octowego
- woda bidestylowana
- argon 99.999%
- 3M roztwór azotan(V) potasu
- roztwór kwasu azotowego (V) 1:10 czda
- wzorzec cynku o stężeniu $10 \text{ mg}/\text{dm}^3$, firma Merck
- wzorzec ołowiu o stężeniu $10 \text{ mg}/\text{dm}^3$, firma Merck

2.4. Przygotowanie próbek

Pobrane próbki grzybów wstępnie przygotowano w sposób analogiczny do grzybów przeznaczonych do celów spożywczych.

W pierwszej kolejności usunięto charakterystyczną dla tego gatunku grzyba skórę, następnie pokrojono owocniki na plastry grubości ok. 5mm. Po odrzuceniu plastrów w których stwierdzono obecność lub ślady żerowania owadów, pozostałe suszono przez 180 minut w temperaturze 60°C . Wysuszone owocniki rozkruszono i zhomogenizowano. Z badanego materiału oraz z materiału referencyjnego odważono próbki o masie 1 g i umieszczono je w sterylnych, zamykanych pojemnikach z tworzywa sztucznego.

Przygotowano dwa rodzaje badanych próbek: próbki mające imitować zalewę grzybów marynowanych zalano roztworem przygotowanym z 10 ml wody bidestylowanej oraz 5 ml stężonego kwasu octowego.

Do pozostałych próbek dodano po 15 ml wody destylowanej. Następnie wszystkie próbki poddano działaniu ultradźwięków przez czas trwający 5 minut. Po tak przeprowadzonej ekstrakcji pobrano roztwory do sterylnych, zamykanych probówek z tworzywa sztucznego.

2.5. Parametry pomiarów

Na podstawie przeprowadzonej optymalizacji ustalono parametry:

- Technika woltamperometrii impulsowej różnicowej
- Potencjał początkowy E_P : -1100 mV
- Potencjał końcowy E_K : -100 mV
- Potencjał schodka E_s : 30 mV
- Różnica potencjałów dE : 30 mV
- Czas wyczekiwania t_w : 10 ms

- Czas próbkowania t_p : 10 ms
- Czas zatężania: 500 ms
- Zakres prądowy: $1\mu\text{A}$
- Przerwy:
 - E: -1100 mV, t: 15 s
 - E: -650 mV, t: 60 s

2.6. Pomiary

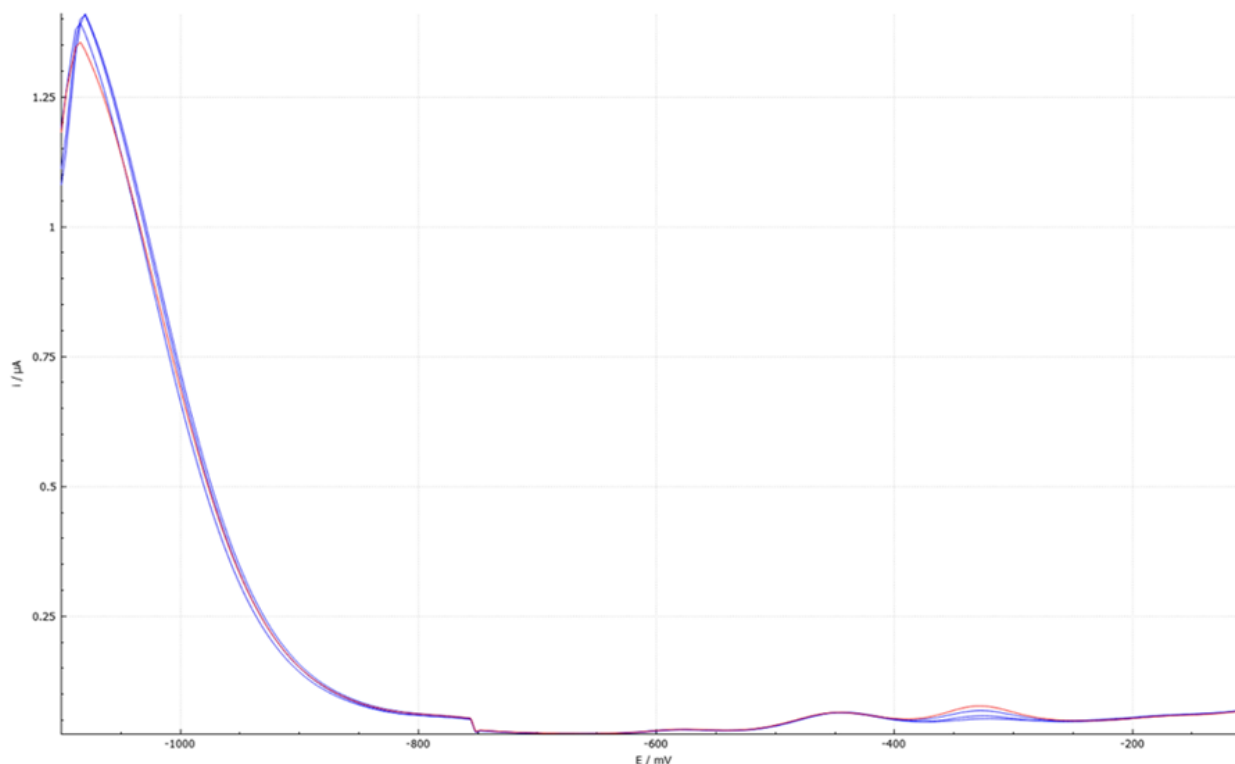
W pierwszej kolejności złożono układ pomiarowy, obejmujący: naczynko pomiarowe, w pokrywie którego umieszczono trzy elektrody: pracującą, odniesienia i pomocniczą, element mieszający, oraz doprowadzenie gazu obojętnego - argonu. Wykorzystano technikę impulsową różnicową, jako metodę kalibracji wykorzystano metodę dodatku wzorca.

Następnie do naczynka pomiarowego wprowadzono za pomocą pipety automatycznej roztwór elektrolitu podstawowego, składający się z 3.5 ml wody bidestylowanej, 0.5 ml KNO_3 , 0.5 μl HNO_3 . Do tak przygotowanej mieszaniny dodano 1 ml próbki. Przed przystąpieniem do pomiarów układ poddano odtlenianiu przepuszczając przez roztwór gaz obojętny. Po upływie określonego czasu dokonano pierwszego pomiaru. Następnie dodano kolejno roztwory wzorcowe ołowiu i cynku rejestrując dla każdego z nich woltamogram. Każdy pomiar powtórzono dwukrotnie. Pozostałe próbki oznaczono zgodnie z przedstawionym powyżej schematem.

3. Wyniki

Na **Rysunku 1** przedstawiono przykładowy woltamogram zarejestrowany techniką DPV dla ekstraktu na bazie rozcieńczonego kwasu octowego. W zakresie, w którym spodziewano się sygnału od jonów cynku wystąpił bardzo mocny sygnał prądowy związany z wysokim stężeniem jonów wodorowych będących produktem hydrolizy kwasu octowego. Przy potencjale -450 mV zarejestrowano sygnał pochodzący od jonów kadmu, których stężenie nie jest przedmiotem analizy.

Dla tych ekstraktów oznaczano wyłącznie stężenie jonów ołowiu, dla których pik rejestrowano przy potencjale -325 mV.



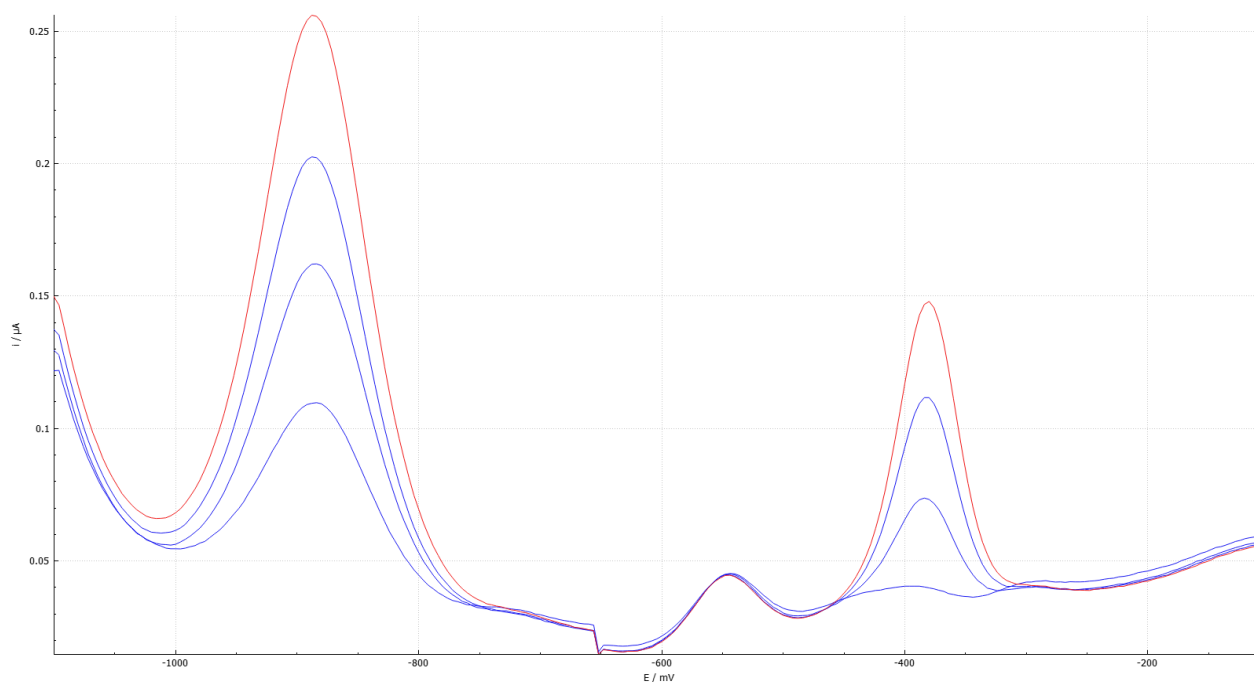
Rysunek 3. Przykładowy woltamogram dla pomiarów wykonanych dla ekstraktu z rozcieńczonego kwasu octowego.

Wyniki oznaczenia stężenia ołowiu w ekstrakcie z rozcieńczonego kwasu octowego przedstawiono w **Tabeli 1**.

Tabela 1. Wyniki oznaczenia w ekstrakcie z rozcieńczonego kwasu octowego.

	Stężenie ołowiu [mg/kg]	Stężenie cynku [mg/kg]
Próbka badana	0.343 ± 0.042	Nie badano
Próbka referencyjna	0.322 ± 0.035	Nie badano

Na **Rysunku 2** przedstawiono przykładowy woltamogram zarejestrowany techniką DPV dla ekstraktu wodnego. Na przedstawionym woltamogramie można wyróżnić trzy piki woltametryczne. Przy potencjale -875 mV zarejestrowano sygnał pochodzący od jonów cynku, dla potencjału -550 mV zarejestrowano wyraźny sygnał pochodzący od jonów kadmu, dla potencjału -375 mV zarejestrowano sygnał pochodzący od jonów ołowiu. Przedmiotem tej analizy było oznaczenie stężenie jonów cynku i ołowiu.



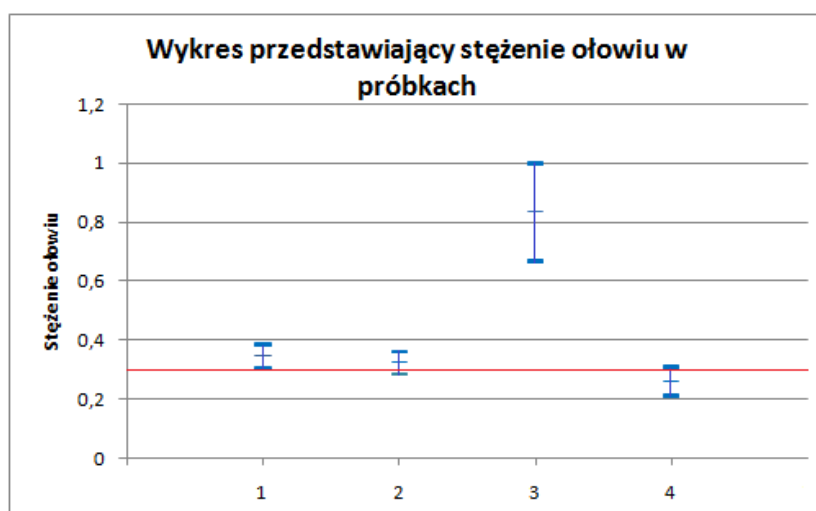
Rysunek 4. Przykładowy voltamogram zarejestrowany dla ekstraktów wodnych.

Wyniki oznaczenia stężenia ołowiu w ekstrakcie wodnym przedstawiono w **Tabeli 2**.

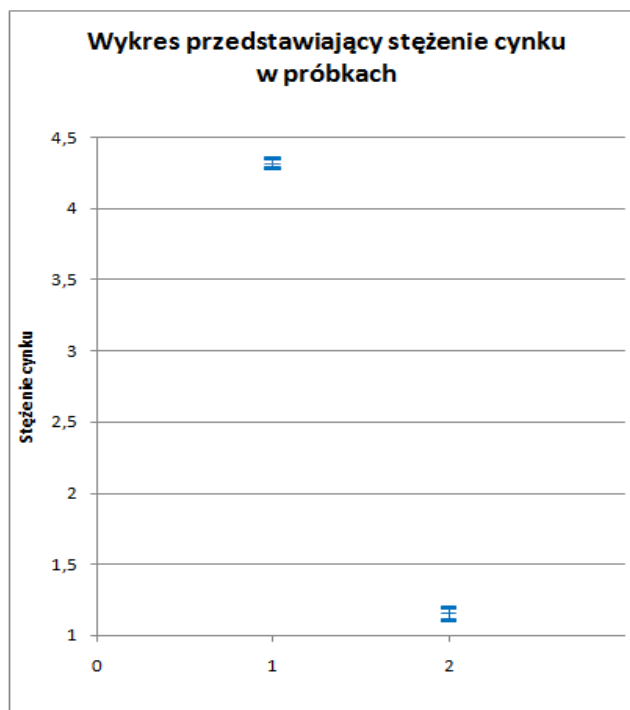
Tabela 2. Wyniki oznaczenia w ekstrakcie wodnym

	Stężenie ołowiu [mg/kg]	Stężenie cynku [mg/kg]
Próbka badana	0.832 ± 0.165	4.316 ± 0.038
Próbka referencyjna	0.259 ± 0.048	1.150 ± 0.048

Wykres porównujący uzyskane wyniki stężenia ołowiu dla badanych próbek z normą pokazano na **Rysunku 5**. Zestawienie uzyskanych wyników stężeń cynku przedstawiono na **Rysunku 6**.



Rysunek 5. Wykres przedstawiający stężenie ołowiu w próbkach: 1 - ekstrakt z rozcieńczonego kwasu octowego próbki badanej, 2 - ekstrakt z rozcieńczonego kwasu octowego próbki referencyjnej, 3 - ekstrakt wodny próbki badanej, 4 - ekstrakt wodny próbki referencyjnej.



Rysunek 6. Wykres przedstawiający stężenie cynku w próbkach: 1 - ekstrakt wodny próbki badanej, 2 - ekstrakt wodny próbki referencyjnej.

4. Wnioski

Ekstrakcja suszu z owocników maślaka zwyczajnego w wodzie bidestylowanej pozwoliła na zarejestrowanie wyraźnych sygnałów od trzech rodzajów jonów: cynku, ołowiu oraz kadmu. Zarejestrowane stężenia ołowiu w próbce referencyjnej były wyższe w ekstrakcie z kwasu octowego. Różnica między stężeniem ołowiu w próbce referencyjnej

i w próbce badanej w ekstrakcie wodnym wynosi 0.573 mg/kg a w ekstrakcie z rozcieńczonego kwasu octowego 0.021 mg/kg . Natomiast różnica między stężeniem cynku w próbce referencyjnej i w próbce badanej w ekstrakcie wodnym wynosi 3.166 mg/kg a w ekstrakcie z rozcieńczonego kwasu octowego szumy wywołane prawdopodobnie zbyt dużym stężeniem jonów wodorowych uniemożliwiły jednoznaczny pomiar stężenia cynku. Różnica stężeń prawdopodobnie wynika z podwyższonej stężenia oznaczanych metali w glebie na terenach, z których pochodzą badane próbki.

Rozporządzenie ministra zdrowia nie przewiduje maksymalnego stężenia cynku w świeżych lub przetworzonych owocnikach grzybów jadalnych, istnieje natomiast wartość graniczna stężenia ołowiu wynosi ona 0.3 mg/kg. Badana próbka suszonych owocników maślaka zwyczajnego zebrana w nadleśnictwie Olkusz przekroczyła graniczne stężenie ołowiu w obu badanych środowiskach, natomiast próbka referencyjna przekroczyła tylko w przypadku środowiska kwasu octowego. Ze względu na wysokie stężenie ołowiu, zdaniem autorów publikacji, nie powinno się spożywać grzybów zebranych w rejonie nadleśnictwa Olkusz, ponieważ nawet taka ilość ołowiu może mieć negatywny wpływ na zdrowie kobiet w ciąży czy matek karmiących piersią.

Literatura

- [1] E. Adamiak, S. Kalembasa, B. Kuźniemska, Zawartość metali ciężkich w wybranych gatunkach grzybów jadalnych, *Acta Agrophysica*, 2013, 20(1), 7-16
- [2] I. Sas-Golak, K. Sobieralski, M. Siwulski, J. Lisiecka, Skład, wartość odżywcza oraz właściwości zdrowotne grzybów pozyskiwanych ze stanowisk naturalnych, *Problemy Nauk Biologicznych*, 2011, 60, 483–490
- [3] M. Wojciechowska-Mazurek, M. Mania, K. Starska, M. Rebeniak, K. Karłowski, Pierwiastki szkodliwe dla zdrowia w grzybach jadalnych w Polsce, *Bromat. Chem. Toksykol.* XLIV, 2011, 2, 143–149
- [4] M. Siwulski, K. Sobieralski, I. Sas-Golak, Wartość odżywcza i prozdrowotna grzybów, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, (92), 16–28
- [5] P. Mattila, K. Könkö, M. Euroła, J. Pihlava, J. Stola, L. Vahteisto, V. Hieraniemi, J. Kumpulainen, M. Valtonen, V. Pironen, Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms, *J. Agric. Food Chem*, 2001, 49, 2343–2348
- [6] J. Rajewska, B. Bałasińska, Biologically active compounds of edible mushrooms and their beneficial impact on health, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2004, 58, 352–357
- [7] I. Krzywy, E. Krzywy, M. Pastuszek-Gabinowska, A. Brodkiewicz, Ołów - czy jest się czego obawiać?, *Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie*, 2010, 56, 2, 118–128
- [8] <http://www.olkusz.katowice.lasy.gov.pl/polozenie> - strona internetowa Nadleśnictwą Olkusz (listopad 2018)
- [9] Program ochrony środowiska dla powiatu olkuskiego, Olkusz 2014
- [10] A. Garbacz Klempka, Informator Metale Nieżelazne, Akademia Górniczo Hutnicza w Krakowie, Wydział Odlewnictwa, Specjalność Odlewnictwo Artystyczne i Precyzyjne, 2007, 242
- [11] J. Minczewski, Z. Marczenko, *Chemia analityczna: Podstawy teoretyczne i analiza jakościowa*, t. 1. PWN, Warszawa 2001.
- [12] M. Piontek, Z. Fedyczak, K. Łuszczynska, H. Lechów, Toksyczność miedzi, cynku oraz kadmu, rtęci i ołowiu dla człowieka, kręgowców i organizmów wodnych, *Uniwersytet Zielonogórski, Zeszyty Naukowe* nr 155, 2014, 35
- [13] A. Goch, J. Goch, Rola ołowiu w patogenezie nadciśnienia tętniczego, *MEDPRESS*, 2005, 18, 351–353
- [14] A. Skoczyńska, K. Gruber, K. Belowska Bień, V. Mlynek, Ryzyko chorób układu krążenia u pracowników huty szkła narażonych na działanie ołowiu, *MEDPRESS*, 2007, 58, 475–483.
- [15] E. Szczeklik, *Choroby wewnętrzne: podręcznik multimedialny oparty na zasadach EBM*, t. 2. Kraków 2006, 2205–2209, 2237
- [16] Karta charakterystyki substancji chemicznej, 2014, 12-22
- [17] B. Gapys, A. Raszeja-Specht, H. Bielarczyk, Rola cynku w procesach fizjologicznych i patologicznych organizmu, *Journal of Laboratory Diagnostics*, 2014; 50(1): 45-52
- [18] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 stycznia 2003 r. w sprawie maksymalnych poziomów zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych, które mogą znajdować się w żywności, dozwolonych substancjach dodatkowych, substancjach pomagających w przetwarzaniu albo na powierzchni żywności (Dz.U. 2003, nr 37, poz. 325 i 326).