

Gdański Uniwersytet Medyczny

Wydział Farmaceutyczny



Joanna Brzezińska-Rojek

**Bromatologiczna i fizykochemiczna ocena
suplementów diety zawierających *Beta vulgaris* L.**

Rozprawa doktorska na podstawie cyklu publikacji naukowych

Praca wykonana

w Katedrze i Zakładzie Bromatologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotorzy pracy:

dr hab. Małgorzata Grembecka
prof. dr hab. Magdalena Prokopowicz

Gdańsk, 2023 r.

Wykaz prac wchodzących w skład cyklu publikacji będącego podstawą rozprawy doktorskiej:

D.1. **Brzezińska J.**, Grembecka M. (2021) Suplementy diety – specyficzna żywność. *Post. Hig. Med. Dośw.* 75(1): 655-673, <https://doi.org/10.2478/ahem-2021-0011>

Punktacja IF: 0,357; MEiN: 40,000

D.2. **Brzezińska J.**, Brzezicha-Cirocka J., Misztal-Szkudlińska M., Szefer P., Grembecka M. (2020) Beta vulgaris L. jako bogate źródło substancji o charakterze prozdrowotnym. *Bromat. Chem. Toksykol.* 53(2): 57-65.

Punktacja IF: 0,000; MEiN: 5,000

D.3. **Brzezińska J.**, Szewczyk A., Brzezicha J., Prokopowicz M., Grembecka M. (2021) Evaluation of physicochemical properties of beetroot-based dietary supplements. *Foods.* 10(8): 1-16, art. ID 1693, <https://doi.org/10.3390/foods10081693>.

Punktacja IF: 5,561; MEiN: 100,000

D.4. **Brzezińska-Rojek J.**, Sagatovych S., Malinowska P., Gadaj K., Prokopowicz M., Grembecka M. (2023) Antioxidant capacity, nitrite and nitrate content in beetroot-based dietary supplements. *Foods*, 12: 1017, <https://doi.org/10.3390/foods12051017>

Punktacja IF: 5,561; MEiN: 100,000

D.5. **Brzezińska-Rojek J.**, Rutkowska M., Brzezicha J., Konieczka P., Prokopowicz M., Grembecka M. (2022) Mineral composition of dietary supplements – analytical and chemometric approach. *Nutrients*, 14 (1): 1-25, art. ID 106, <https://doi.org/10.3390/nu14010106>

Punktacja IF: 6,706; MEiN: 140,000

D.6. **Brzezińska-Rojek J.**, Rutkowska M., Ośko J., Konieczka P., Prokopowicz M., Grembecka M. (2022) Mercury content in beetroot and beetroot-based dietary supplements. *J. Food Compos. Anal.*, 114: 104828, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104828>

Punktacja IF: 4,520; MEiN: 100,000

Łączna punktacja Impact Factor prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej: 22,705.

Łączna punktacja MEiN prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej: 485,000.

Przeprowadzone badania, będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej, zostały częściowo sfinansowane z poniższych źródeł:

1. Projekt POWER3 (POWR.03.02.00-00-I014/17-00) – Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, przyznany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (realizowany w latach 2019-2023)
2. Stypendium Santander Universidades dla studentów i doktorantów Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (realizowany w 2021 roku)

Spis treści

Skróty.....	6
Streszczenie	7
Abstract.....	10
1. Wprowadzenie	12
2. Cel badań	17
3. Materiał badawczy i koncepcja badań.....	17
4. Wyniki i dyskusja	18
4.1. Ocena jakości i bezpieczeństwa wybranych suplementów diety zawierających <i>Beta vulgaris</i> L.....	18
4.1.1. Ocena poprawności oznakowania	18
4.1.2. Parametry fizyczne	20
4.2. Ocena bromatologiczna wybranych suplementów diety zawierających <i>Beta vulgaris</i> L.....	23
4.2.1. Całkowita zawartość polifenoli (TPC) i całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAC)	23
4.2.2. Zawartość azotanów(III) i (V).....	26
4.2.3. Skład pierwiastkowy	27
4.3. Oszacowanie ryzyka zdrowotnego konsumenta.....	33
4.3.1. Zawartość arsenu (As), kadmu (Cd), ołowiu (Pb) i platyny (Pt).....	34
4.3.2. Zawartość rtęci (THg)	36
4.3.3. Ryzyko związane z zawartością azotanów(III) i (V)	36
5. Wnioski	37
Literatura.....	39
Spis rycin	44
Spis tabel.....	44
Artykuły naukowe wchodzące w skład cyklu publikacji.....	45
Publikacja D.1.	45
Publikacja D.2.	65
Publikacja D.3.	75
Publikacja D.4.	97
Publikacja D.5.	130
Publikacja D.6.	165
Załączniki.....	176

Skróty

ADI	ang. <i>Acceptable Daily Intake</i> , dopuszczalne dziennie spożycie
AI	ang. <i>Adequate Intake</i> , odpowiednie spożycie
CA	ang. <i>Cluster Analysis</i> , analiza skupień
CUPRAC	ang. <i>Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity</i> , metoda oceny potencjału antyoksydacyjnego oparta na redukcji związków miedzi
CV-AAS	ang. <i>Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry</i> , atomowa spektrometria absorpcyjna z generacją zimnych par
d.d.	ang. <i>daily dose</i> , dzienna dawka
DPPH	2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl
d.u.	ang. <i>dosage unit</i> , jednostka dawkowania
EAR	ang. <i>Estimated Average Requirement</i> , średnie zapotrzebowanie
EFSA	ang. <i>European Food Safety Authority</i> , Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności
FA	ang. <i>Factor Analysis</i> , analiza czynnikowa
FAAS	ang. <i>Flame Atomic Absorption Spectroscopy</i> , atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją w płomieniu
GAE	ang. <i>Gallic Acid Equivalents</i> , ekwiwalenty kwasu galusowego
GIF	Główny Inspektorat Farmaceutyczny
GIS	Główny Inspektorat Sanitarny
LOD	ang. <i>Limit of Detection</i> , granica wykrywalności
LOQ	ang. <i>Limit of Quantification</i> , granica oznaczalności
MP-AES	ang. <i>Microwave Plasma-Atomic Emission Spectroscopy</i> , atomowa spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w mikrofalowej plazmie azotowej
m.c.	masa ciała
PTMI	ang. <i>Tolerable Monthly Intake</i> , tolerowane tymczasowe miesięczne pobranie
PTWI	ang. <i>Tolerable Weekly Intake</i> , tolerowane tymczasowe tygodniowe pobranie
RDA	ang. <i>Recommended Dietary Allowance</i> , zalecane dzienne spożycie
RONS	ang. <i>Reactive Oxygen and Nitrogen Species</i> , reaktywne formy tlenu i azotu
RWS	Referencyjne Wartości Spożycia
ś.m.	świeża masa
TAC	ang. <i>Total Antioxidant Capacity</i> , całkowity potencjał antyoksydacyjny
TE	ang. <i>Trolox Equivalents</i> , ekwiwalenty troloksu
THg	ang. <i>Total Mercury Content</i> , całkowita zawartość rtęci
THQ	ang. <i>Target Hazard Quotient</i> , docelowy iloraz zagrożenia
TPC	ang. <i>Total Phenolic Content</i> , całkowita zawartość polifenoli
Troloks	kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksyłowy
URPL	Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych
USP	ang. <i>United States Pharmacopoeia</i> , Farmakopea Stanów Zjednoczonych
WHO	ang. <i>World Health Organisation</i> , Światowa Organizacja Zdrowia

Streszczenie

Na polskim rynku są obecne suplementy diety zawierające buraka zwyczajnego (*Beta vulgaris* L.), który jest chętnie wybierany przez konsumentów ze względu na potencjalne działanie prozdrowotne. Jest ono związane ze znaczną zawartością substancji bioaktywnych takich jak składniki mineralne, witaminy, cholina, błonnik, barwniki betalainowe, polifenole i inne związki azotowe. Jednak to warzywo korzeniowe wykazuje zdolność do akumulacji metali ciężkich oraz azotanów(III) i (V), które mogą stanowić potencjalne zagrożenie dla konsumenta. W literaturze dotychczas brakuje doniesień dotyczących skuteczności i bezpieczeństwa suplementów diety zawierających *Beta vulgaris* L. Rosnące zainteresowanie tą grupą produktów, ich powszechna dostępność, szczególnie w obrocie pozaaptecznym, niedostateczna kontrola rynku, oraz brak europejskich wytycznych dotyczących parametrów fizycznych formy aplikacyjnej, stwarzają ryzyko występowania na rynku produktów o niewłaściwej jakości, stanowiących potencjalne ryzyko dla konsumenta.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była bromatologiczna i fizykochemiczna ocena suplementów diety zawierających buraka zwyczajnego (*Beta vulgaris* L.). W ramach zaplanowanych badań oceniono jakość i bezpieczeństwo wybranych suplementów na podstawie poprawności ich oznakowania oraz parametrów fizycznych form aplikacyjnych. Ponadto dokonano oceny bromatologicznej poprzez oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli (TPC), całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (TAC), zawartości azotanów(III) i (V) oraz profilu 22 pierwiastków w badanych produktach. Dodatkowo oszacowano narażenie konsumenta na pierwiastki toksyczne oraz azotany(III) i (V). Wyniki otrzymane dla suplementów diety były porównywane z surowcem uprawnym (burakiem zwyczajnym), aby zweryfikować, czy mogą być one konkurencyjnym źródłem substancji bioaktywnych.

Materiał badawczy stanowiły 54 suplementy diety w postaci tabletek, kapsułek i proszków zawierające buraka zwyczajnego oraz 20 próbek surowca uprawnego (buraka zwyczajnego). Suplementy zostały zakupione stacjonarnie w aptekach, a także przez Internet ze sklepów ze zdrową żywnością i popularnych portali aukcyjnych, w celu uzyskania reprezentatywnej grupy produktów dostępnych dla polskiego konsumenta. Większość produktów była pochodzenia polskiego, amerykańskiego lub angielskiego.

W pierwszym etapie zweryfikowano poprawność oznakowania opakowania wybranych suplementów diety. Następnie wyznaczono parametry fizyczne postaci tabletek oraz kapsułek stosując wytyczne Farmakopei Amerykańskiej (USP). Ponadto oceniono stosunek kształtu i wielkości jednostek dawkowania na podstawie zaleceń Agencji Żywności i Leków (FDA) dla producentów suplementów diety oraz badań preferencji

konsumentów. Stwierdzono, że 64% opakowań posiadała niekompletne oznakowanie. Suplementy diety z buraka w postaci tabletek i kapsułek charakteryzowały się znacznym zróżnicowaniem parametrów fizycznych, a część z nich może stanowić zagrożenie dla konsumentów ze względu na niespełnianie kryteriów jakości określonych przez USP odnośnie jednolitości masy jednostek dawkowania, czasu rozpadu, twardości i ścieralności.

Następnie analizowany materiał został scharakteryzowany odnośnie właściwości przeciwutleniających poprzez wyznaczenie TPC metodą Folina-Ciocalteu oraz TAC metodą CUPRAC i DPPH. Zawartość azotanów(III) i (V) została wyznaczona wg ISO 6635-1984(E). Co więcej, oznaczono profil 22 pierwiastków (Na, K, Ca, Mg, P, Fe, As, Se, Zn, Cu, Ag, Co, Ni, Mo, Al, Mn, Sr, Cr, Ba, Li, Pb, Cd) z zastosowaniem techniki pomiarów spektrometrycznych ze wzbudzeniem w mikrofalowej plazmie azotowej (MP-AES) oraz całkowitą zawartość rtęci (THg) techniką atomowej spektrometrii absorpcyjnej z generowaniem zimnych par rtęci (CV-AES). Uzyskane dane pomiarowe zostały przetworzone z wykorzystaniem wielowariancyjnych technik chemometrycznych takich jak analiza czynnikowa (FA) i analiza skupień (CA). Ponadto oszacowano realizację rekomendacji żywieniowych, wykorzystując normy żywienia dla populacji Polski przez dzienną dawkę suplementów diety (d.d.) i 100-gramową porcję warzywa. Wykazano znaczne zróżnicowanie suplementów diety z buraka pod względem TPC (0,7-251 mg GAE/d.d.), TAC (430-3520 $\mu\text{mol TE/d.d.}$; 37-90% aktywność wobec DPPH), zawartości azotanów(III) (10-78 $\mu\text{g/d.d.}$), azotanów(V) (16-169 mg/d.d.) i składu mineralnego. Stwierdzono, że większość analizowanych suplementów diety dostarczała mniej składników bioaktywnych niż 100-gramowa porcja świeżego warzywa. Wyjątek stanowiły produkty wzbogacone solami Fe, które dostarczały znacznie więcej tego pierwiastka (4,5-8,8 mg Fe/dzień) niż warzywo (0,50-0,88 mg/100 g). Natomiast analiza chemometryczna pozwoliła na poszerzoną charakterystykę zaobserwowanych współzależności oraz na zróżnicowanie materiału faktograficznego na podstawie jego składu mineralnego w zakresie typu produktu (suplement diety, warzywo), rodzaju uprawy (konwencjonalna, organiczna), pochodzenia (sklep wielkopowierzchniowy, sklep detaliczny) oraz postaci (tabletki, kapsułka).

W ostatnim etapie oszacowano ryzyko zdrowotne związane z przyjmowaniem wybranych suplementów diety z buraka. Wykazano, że część analizowanych produktów może stanowić zagrożenie dla zdrowia spożywających je osób ze względu na znaczne zanieczyszczenie Cd (sześć produktów) i As (pięć produktów). Jednocześnie, dowiedziono, że analizowane produkty nie stanowiły bezpośredniego zagrożenia dla konsumenta w kontekście zanieczyszczenia THg, Pb, Pt oraz żaden produkt nie dostarczał azotanów(III) i (V) w dawce przekraczającej ADI.

Otrzymane wyniki wskazują na zasadność wprowadzenia kontroli suplementów diety zawierających buraka zwyczajnego na rynku polskim pod względem: poprawności oznakowania, parametrów fizycznych, TPC, TAC, zawartości azotanów(III), (V), składu mineralnego i zanieczyszczeń pierwiastkami toksycznymi. Dodatkowo wskazują na konieczność wprowadzenia wytycznych odnośnie parametrów fizycznych, które obowiązują w Farmakopei Stanów Zjednoczonych.

Abstract

Bromatological and physicochemical evaluation of dietary supplements containing *Beta vulgaris* L.

There are dietary supplements containing beetroot (*Beta vulgaris* L.) on the Polish market that are willingly chosen by consumers due to their potential health benefits. It is associated with a significant content of bioactive substances such as minerals, vitamins, choline, fibre, betalain dyes, polyphenols and other nitrogenous compounds. However, as a root vegetable, it can accumulate heavy metals and nitrates(III) and (V), which may pose a potential threat to the consumer. The literature so far lacks reports on the effectiveness and safety of dietary supplements containing *Beta vulgaris* L. The growing interest in dietary supplements (DSs), their widespread availability, especially in non-pharmacy trade, insufficient market control and the lack of European guidelines on the physicochemical parameters of the application form pose a risk of products of incorrect quality on the market, posing a potential risk to the consumer.

The aim of this doctoral thesis was the bromatological and physicochemical evaluation of DSs containing beetroot (*Beta vulgaris* L.). Thus, the quality and safety of selected supplements were assessed based on the correctness of their labelling and the physical parameters of the application forms. Then, the bromatological evaluation was carried out by determining the total polyphenol content (TPC), the total antioxidant capacity (TAC), the content of nitrates(III) and (V) and the profile of 22 elements in the tested products. In addition, exposure to toxic elements, nitrates(III), and (V) was estimated. The results obtained for DSs were compared to fresh vegetables. The research material consisted of 54 DSs in the form of tablets, capsules, powders containing beetroot and 20 samples of beetroot. The supplements were purchased stationary in pharmacies, as well as via the Internet from health food stores and popular auction portals to collect a representative group of products available to the Polish consumer. Most of the products were of Polish, American or English origin.

In the first stage, the labelling correctness of selected DSs was verified. Next, the physical parameters of the tablet and capsule forms were determined based on the United States Pharmacopoeia (USP) guidelines. In addition, the ratio of the shape and size of the dosage units was assessed because of the Food and Drug Administration (FDA) recommendations for manufacturers of DSs and consumer preference studies. It was found that 64% of the packaging had incomplete labelling. Beetroot-based DSs in the form of tablets and capsules were characterised by a significant diversification of physicochemical parameters. Some of them may pose a threat to consumers due to non-compliance with the quality criteria specified by the USP regarding mass uniformity, disintegration time, hardness, and friability.

Then, the analysed material was characterised in terms of antioxidant properties by determining TPC using the Folin-Ciocalteu method and TAC using the CUPRAC and DPPH methods. The content of nitrates(III) and (V) was determined according to ISO 6635-1984(E). Moreover, the profiles of 22 elements (Na, K, Ca, Mg, P, Fe, As, Se, Zn, Cu, Ag, Co, Ni, Mo, Al, Mn, Sr, Cr, Ba, Li, Pb, Cd) were determined using spectrometric measurement technique with excitation in microwave nitrogen plasma (MP-AES) and mercury content using atomic absorption spectrometry with cold mercury vapour generation (CV-AES). The obtained measurement data were processed using multivariate chemometric techniques such as factor analysis (FA) and cluster analysis (CA). In addition, the implementation of nutritional recommendations based on the Nutrition Standards for the Polish population was estimated by the recommended daily dose of DSs (d.d.) and a 100-gram portion of vegetables. A significant differentiation of beetroot-based DSs in terms of TPC (0.7-251 mg GAE/d.d.), TAC (430-3520 $\mu\text{mol TE/d.d.}$; 37-90% activity against DPPH), nitrates(III) content (10-78 $\mu\text{g/d.d.}$), nitrates(V) content (16-169 mg/d.d.), and mineral composition. It was found that most of the analysed DSs provided fewer bioactive ingredients than a 100-gram portion of a fresh vegetable. The exception was products enriched with Fe salts, which provided much more of this element (4.5-8.8 mg Fe/day) than vegetables (0.50-0.88 mg/100 g). The chemometric analysis allowed for an in-depth characterisation of the observed interdependencies and for the differentiation of factual material based on its mineral composition in terms of product type (dietary supplement, vegetable), type of cultivation (conventional, organic), origin (small and large-retail stores) and form (tablet, capsule).

In the last stage, the health risk associated with the intake of selected beetroot-based DSs was estimated. It has been shown that some of the analysed products may pose a threat to consumers due to the significant contamination of Cd (six products) and As (five products). At the same time, the evaluated products were not dangerous because of THg, Pb, Pt contamination and none of the products provided nitrates(III) or (V) in a dose exceeding the ADI.

The obtained results indicate the legitimacy of introducing control of beetroot-based DSs on the Polish market in terms of correct labelling, physical parameters, TPC, TAC, nitrates(III), (V), mineral composition and contamination with toxic elements. In addition, they indicate the need to introduce guidelines regarding physical parameters, such as in the United States Pharmacopoeia.

1. Wprowadzenie

1.1. Suplementy diety

Rynek suplementów diety powiększa się z każdym rokiem, a produkty te stały się popularnym elementem diety Polaków [1]. W 2018 roku stosowanie tych preparatów zadeklarowało ponad 70% badanych, a połowa z nich przyjmowała je codziennie [2]. Wartość rynku suplementów w 2020 roku wynosiła ponad 6 mld zł i nadal obserwuje się tendencję wzrostową (2017 r.: 4,4 mld zł, 2018 r.: 5,4 mld) [3]. Rosnący popyt może wynikać m.in. z intensywnej reklamy tych produktów w środkach masowego przekazu [1].

Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (z późn. zm.) definiuje suplement diety, jako *środek spożywczy, którego celem jest uzupełnienie normalnej diety, będący skoncentrowanym źródłem witamin lub składników mineralnych lub innych substancji wykazujących efekt odżywczy lub inny fizjologiczny, pojedynczych lub złożonych, wprowadzany do obrotu w formie umożliwiającej dawkowanie, w postaci: kapsulek, tabletek, drażetek i w innych podobnych postaciach, saszetek z proszkiem, ampulek z płynem, butelek z kroplomierzem i w innych podobnych postaciach płynów i proszków przeznaczonych do spożywania w małych, odmierzonych ilościach jednostkowych, z wyłączeniem produktów posiadających właściwości produktu leczniczego w rozumieniu przepisów prawa farmaceutycznego* [4].

Składnikami suplementów diety mogą być witaminy, składniki mineralne, inne substancje wykazujące efekt odżywczy lub inny fizjologiczny np. surowce i przetwory roślinne. Jedynie zawartość witamin i składników mineralnych jest prawnie uregulowana [5]. Natomiast dla większości przetworów roślinnych stosowanych w suplementach nie zostały określone dawki, nie ma także obowiązku standaryzacji [Publikacja D.1.]. Co więcej, pojęcia *efekt odżywczy* i *efekt fizjologiczny* nie są zdefiniowane w ustawodawstwie polskim i europejskim [6].

Ze względu na formę aplikacyjną zbliżoną do postaci farmaceutycznej oraz dostępność m.in. w aptekach, część konsumentów nie odróżnia suplementu diety od produktu leczniczego [7], szczególnie tradycyjnego produktu leczniczego roślinnego [8]. Zgodnie z definicją, tradycyjne roślinne produkty lecznicze m.in. *mają wskazania właściwe wyłącznie dla tradycyjnego produktu leczniczego roślinnego, z uwagi na ich skład i przeznaczenie, mogą być stosowane bez nadzoru lekarza w celach leczniczych, diagnostycznych lub monitorowania terapii oraz spełniają kryteria produktu leczniczego wydawanego bez przepisu lekarza, a ponadto posiadają wystarczające dane dotyczące tradycyjnego ich zastosowania, w szczególności bezpieczeństwa stosowania zgodnie ze sposobem, o którym mowa w pkt. 2, a ich wystarczające działanie farmakologiczne i skuteczność są stwierdzone na podstawie długotrwałego stosowania*

i doświadczenia w lecznictwie [9]. Muszą być one standaryzowane na zawartość substancji aktywnych, dla których określone są zakres stosowania, ilość i sposób dawkowania, możliwe działania niepożądane i przeciwwskazania [Publikacja D.1.]. Ze względów ekonomicznych oraz proceduralnych, istnieje ryzyko, że suplementy mogą wyprzeć z rynku roślinne produkty lecznicze, które charakteryzują się zweryfikowaną jakością oraz bezpieczeństwem stosowania [8]. Porównanie wybranych aspektów produktów leczniczych i suplementów diety zostało przedstawione w Tabeli 1.

Tabela 1 Porównanie leków i suplementów diety [Publikacja D.1.].

	Lek	Suplement diety
Instytucja kontrolująca	URPL	GIS
Wprowadzenie do obrotu	Na podstawie zgody URPL po kontroli jakości, skuteczności i bezpieczeństwa stosowania	Zgłoszenie do GISu, zawierające opis składu i projekt opakowania
Badania kliniczne	Wieloletnie – w zależności czy wprowadzony zostanie produkt oryginalny, czy generyczny	Brak wymogów
Skład	Substancje lecznicze w dawce wywołującej działanie lecznicze potwierdzone badaniami klinicznymi	Dopuszczone substancje, mogą zawierać substancje o działaniu leczniczym jednak w dawce niewywołującej takiego efektu
Postać	Określona przez Farmakopeę Polską	Umożliwiająca dawkowanie
Kontrola	Ciągła	Fragmentaryczna (GIS), nieobligatoryjna
Informacje	Ulotka dla pacjenta, Charakterystyka Produktu Leczniczego (ChPL)	Oznakowanie opakowania zgodnie z rozporządzeniem
Reklama	Ścisłe regulacje prawne, dozwolona tylko dla produktów z kategorii OTC	Duża dowolność, nadzór UOKiK
Cel stosowania	Działanie lecznicze, terapeutyczne lub profilaktyczne	Uzupełnienie diety, brak działania leczniczego

ChPL – Charakterystyka Produktu Leczniczego; GIS – Główny Inspektorat Sanitarny; OTC (ang. *Over-the-counter*) – leki dostępne bez recepty; UOKiK – Urząd Ochrony Konkurencji i Konsumentów; URPL – Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych

Podsumowując, opakowanie jest podstawowym źródłem informacji dla konsumenta, przez co konsument zwykle nie otrzymuje bezpośredniej informacji o możliwych działaniach niepożądanych, potencjalnych interakcjach czy przeciwwskazaniach

do stosowania. Szczególnie w przypadku wieloskładnikowych produktów istnieje uzasadniona obawa o to, czy są one bezpieczne i skuteczne, ponieważ nie ma obowiązku dostarczenia potwierdzających to wyników badań. Suplementy mogą wchodzić w interakcje z innymi składnikami diety, produktami leczniczymi czy wyrobami medycznymi, oraz mogą powodować działania niepożądane wymagające hospitalizacji [10]. W Polsce nie ma dostępu do bazy danych gromadzącej takie informacje [11]. Doniesienia literaturowe wskazują, że najczęściej hospitalizacji związanych z suplementami diety było związanych z zażywaniem produktów zawierających przetwory roślinne, wywołujących efekt odżywczy, wspomagających utratę masy ciała, energetyzujących oraz multiwitaminowych. Najczęściej zgłaszanymi działaniami niepożądanymi były: bóle i zawroty głowy, zadławienie, zaburzenia połykania wywołane przez jednostki dawkowania, zaburzenia lękowe, łagodne i umiarkowane reakcje alergiczne, nudności, wymioty, bóle brzucha, ból w klatce piersiowej oraz tachykardia [Publikacja D.1.].

1.2. Suplementy diety zawierające *Beta vulgaris* L.

Burak zwyczajny (*Beta vulgaris* L.) jest szeroko rozpowszechnioną, wieloletnią rośliną uprawną należącą do rodziny komosowatych (*Chenopodiaceae*). Za jadalne części uznaje się spichrzowe korzenie, łodygi i liście. Najczęściej do celów spożywczych wykorzystywany jest korzeń. Zawiera on od 0,5 do 2,5% składników mineralnych [12] i jest szczególnie cennym źródłem makropierwiastków takich jak K, Na, Mg, Ca, P oraz mikropierwiastków – Fe, Mn, Zn, Cu [13–15], a także witamin (z grupy B oraz C, A, E, K) [Publikacja D.2.]. Ze względu na zawartość substancji bioaktywnych [Publikacja D.2.], wprowadzenie buraka do diety może być korzystne jako wzmacniające endogenne mechanizmy przeciwutleniające, chroniące składniki komórek przed stresem oksydacyjnym, który jest uznawany za istotny element patofizjologii ponad 200. chorób, w tym nowotworów i chorób metabolicznych [16,17]. Za działanie antyoksydacyjne korzenia buraka odpowiadają głównie barwniki betalainowe (w tym betanina, betanidyna) [18], związki polifenolowe (rutyna, epikatechina, kwas kawowy) [19] oraz witaminy (witamina C) [20]. Ponadto azotany(III) i inne donory NO mogą wykazywać aktywność przeciwutleniającą poprzez hamowanie powstawania wolnych rodników i bezpośredni wychwyty potencjalnie szkodliwych reaktywnych form tlenu i azotu (RONS) [17,21]. Korzeń buraka i jego przetwory badane są także w kierunku działania antyseptycznego, przeciwbakteryjnego, przeciwzapalnego i przeciwgorączkowego, antyproliferacyjnego, żółciopędnego, moczopędnego, przeciwnowotworowego, a także przeciwcukrzycowego, co w znacznej mierze jest związane z jego wysoką aktywnością przeciwutleniającą [Publikacja D.2.].

Suplementacja diety produktami z buraka może być korzystna dla:

- Sportowców celem zwiększenia wydolności i tolerancji wysiłku fizycznego [22,23],
- osób z nadciśnieniem tętniczym ze względu na potencjalne działanie hipotensyjne [24,25],
- chorych na cukrzycę typu 2 ze względu na potencjalne działanie przeciwzapalne i poprawiające metabolizm glukozy [26,27].

Ponadto producenci suplementów zawierających buraka polecają swoje produkty:

- kobietom w ciąży i osobom z anemią z niedoboru Fe celem poprawienia parametrów morfologicznych krwi,
- dzieciom jako naturalne źródło Fe,
- chorym na nowotwory ze względu na działanie odżywcze i wspomagające rekonwalescencję.

Jednakże brakuje rzetelnych badań potwierdzających skuteczność u ludzi w wymienionych wskazaniach.

Nieliczne publikacje dotyczą ograniczeń związanych ze stosowaniem buraka. Konsumenci najczęściej zgłaszają beeturię (czerwony mocznik) [28,29] i czerwony stolec [29]. Odnotowano także anafilaksję po spożyciu gotowanego buraka [30,31]. Szczególną ostrożność powinny zachować osoby cierpiące na kamicy nerkową, ponieważ burak zawiera kwas szczawiowy [32,33]. Osoby z hemochromatozą lub chorobą Wilsona mogą być narażone na akumulację w organizmie Fe i Cu [34].

Burak zwyczajny jest dostępny na rynku głównie jako świeże warzywo, lub w postaci sproszkowanej, otrzymywanej przez mielenie suszonego buraka lub liofilizację. Rynek sproszkowanej postaci buraka ulega sukcesywnemu wzrostowi na całym świecie, a jego wartość w 2022 roku wyniosła około 456 mln dolarów [35]. Ta postać wykorzystywana jest do nadawania smaku i zapachu różnym produktom (np. sosom, przetworom owocowym, wypiekom, gotowej żywności), ale także jako suplement diety, lub jako półprodukt do ich wytwarzania [35]. Szczególną grupę stanowią roślinne suplementy żelaza, w tym te zawierające sproszkowanego buraka, których popularność zwiększa się ze względu na rosnącą świadomość konsumentów w temacie zbilansowanej diety i zdrowia, a także wzrost odsetka wegan i wegetarian w populacji światowej [36]. W Polsce, w latach 2018-2021 do Głównego Inspektora Sanitarnego złożono blisko 180 zawiadomień o chęci wprowadzenia do obrotu suplementów zawierających przetwory z buraka.

Działanie prozdrowotne o znaczeniu klinicznym jest uzależnione od dawki substancji bioaktywnych. Kluczową rolę pełni także jakość surowca oraz bezpieczeństwo

wynikające z braku zanieczyszczeń i odpowiedniej formy aplikacyjnej. Suplementy diety z buraka dostępne są w różnych postaciach takich jak tabletki konwencjonalne, kapsułki, proszki, pastylki do ssania, płyny (soki, shoty, płynne ekstrakty), żele, batony, aerozole, inne. W swoim składzie zawierają przede wszystkim przetwory z korzenia, ale także z części zielonych. Nomenklatura dotycząca wykorzystanego do produkcji przetworu stosowana przez producentów jest zróżnicowana (ekstrakt, suszony korzeń, liofilizat, suszony sok, itd.), ponieważ nie jest prawnie ujednolicona. Ten fakt często utrudnia porównanie produktów między sobą lub do świeżego warzywa, a tym samym oszacowanie czy produkt może wywołać efekt prozdrowotny. Niewielki odsetek producentów standaryzuje produkty na zawartość azotanów, betainy czy betaniny. Na rynku obecne są także suplementy diety na bazie buraka wzbogacone związkami żelaza (głównie glukonian i fumaran żelaza(II)), witaminami (z grupy B, witaminą C), oraz innymi substancjami (np. betaina). To warzywo i jego przetwory mogą być źródłem pierwiastków toksycznych i innych zanieczyszczeń (szczególnie azotanów), które mogą być obecne w surowcu roślinnym, lub mogą zostać wprowadzone na etapie produkcji. Brak szczegółowych wytycznych odnośnie formy aplikacyjnej skutkuje obecnością na rynku produktów o różnych, niezwyfikowanych parametrach fizycznych formułacji, która może stanowić ryzyko bezpośrednio związane z przyjmowaniem produktu (np. zakrzepienie się). Wiele takich produktów pochodzi z importu, a kraje różnią się znacząco w podejściu do produkcji suplementów diety [Publikacja D.1.].

Motywacją do podjęcia badań był fakt, że rosnący popyt na suplementy diety skutkuje wprowadzaniem na rynek polski coraz nowszych produktów. Stosunkowo nieskomplikowana procedura wprowadzenia do sprzedaży oraz wybiórcza kontrola rynku, prowadzi do obecności w obrocie produktów o niezwyfikowanej jakości i bezpieczeństwie dla konsumenta. Potencjalne działanie prozdrowotne produktu wynika z jakości wykorzystanego surowca, parametrów fizycznych formy aplikacyjnej umożliwiających uwolnienie substancji aktywnych w świetle przewodu pokarmowego, braku zanieczyszczeń, właściwego sposobu przechowywania, a pośrednio także z oznakowania w sposób czytelny dla konsumenta (zgodny z wymaganiami). Ze względu na brak powyższych danych ze strony producenta oraz znaczne spożycie przez konsumentów, suplementy powinny podlegać ciągłej ewaluacji [Publikacja D.1.], a także ocenie, czy mogą być one alternatywą dla świeżych warzyw. Ponadto suplementy z buraka obarczone są ryzykiem związanym z akumulacją w organizmie pierwiastków toksycznych, a jako skoncentrowane formy mogą dostarczać ich w ilości zagrażającej bezpieczeństwu konsumenta.

2. Cel badań

Głównym celem badań pracy doktorskiej była ocena bromatologiczna i fizykochemiczna suplementów diety zawierających buraka zwyczajnego (*Beta vulgaris* L.). Została ona przeprowadzona na podstawie badań parametrów fizycznych formy aplikacyjnej, zawartości składników odżywczych i bioaktywnych, a także potencjalnych zanieczyszczeń.

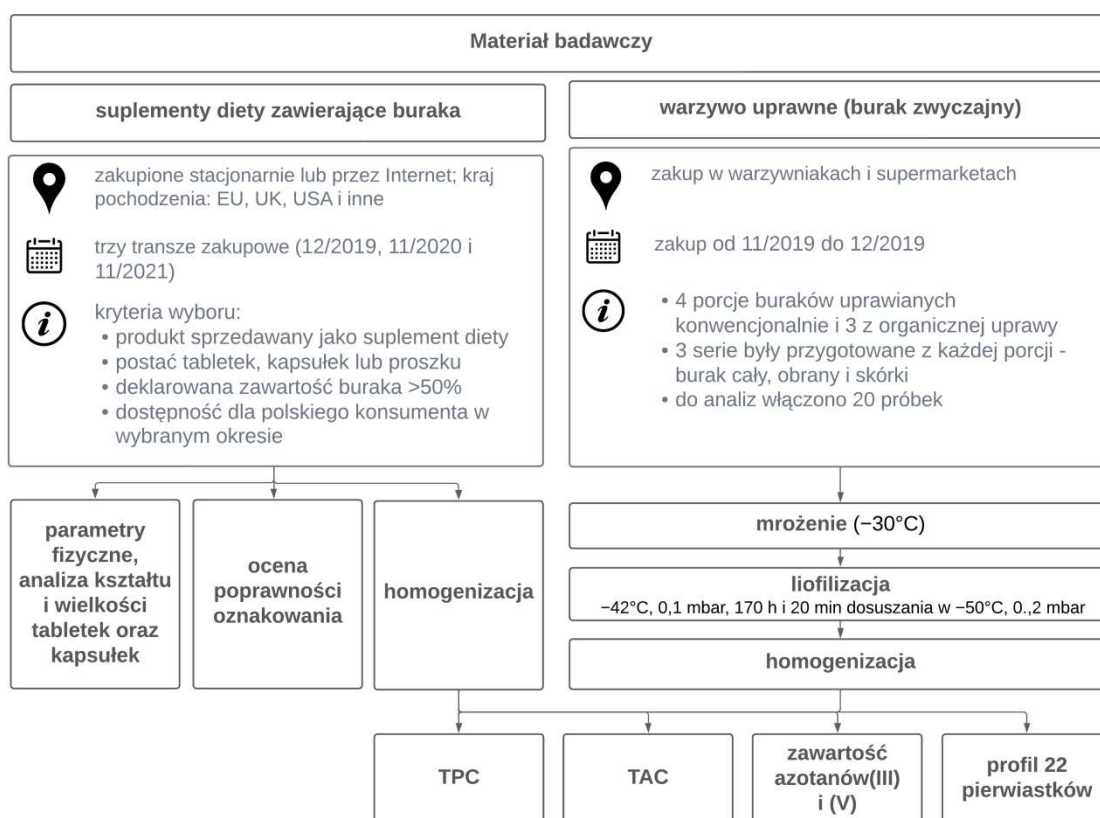
Wyznaczono następujące cele cząstkowe:

1. Ocena jakości i bezpieczeństwa wybranych suplementów diety zawierających *Beta vulgaris* L. odnośnie poprawności oznakowania i parametrów fizycznych formy aplikacyjnej.
2. Ocena bromatologiczna suplementów diety zawierających *Beta vulgaris* L. pod względem potencjału antyoksydacyjnego, całkowitej zawartości polifenoli, zawartości azotanów(III) i (V), oraz składu pierwiastkowego, w porównaniu z surowcem roślinnym (świeżym burakiem).
3. Oszacowanie narażenia na pierwiastki toksyczne oraz azotany(III) i (V) wskutek stosowania suplementów diety zawierających *Beta vulgaris* L. oraz świeżego buraka.

3. Materiał badawczy i koncepcja badań

Materiał badawczy stanowiły łącznie 54 suplementy diety pochodzące od 42 różnych producentów, dostępne na polskim rynku w postaci tabletek, kapsułek i proszków, oraz 7 partii warzywa uprawnego (burak zwyczajny zakupiony na terenie Trójmiasta w sezonie zbiorów), jako materiał porównawczy (Rycina 1). Szczegółowa charakterystyka produktów została przedstawiona w Tabeli Z1 (załącznik 1).

Ocena wybranych suplementów diety z buraka była prowadzona z poziomu konsumenta, co skutkowało różną ilością produktów włączonych do różnych analiz, bądź zmiennymi numerami serii analizowanych suplementów. Niektóre produkty były dostępne w ograniczonej ilości lub stawały się niedostępne po kilku miesiącach. Część suplementów pochodziła z importu, więc nie byłoby możliwości bezpośredniego nabycia od producenta, gdyby nie zakup z wolnego rynku. Producenci wykazywali, że w składzie analizowanych suplementów znajduje się burak, burak organiczny lub wykorzystano całe warzywo (bez obierania), dlatego zgromadzono materiał warzywny z upraw konwencjonalnych i organicznych, który został podzielony na serie – całe warzywo, obrane i skórki (Rycina 1). Na potrzeby obliczeń przyjęto średnią porcję 100 g świeżego warzywa (buraka), ponieważ jest to ilość, dla której obowiązkowo podaje się wartość odżywcza, znakując żywność [37].



Rycina 1 Charakterystyka materiału badawczego oraz koncepcja badań.

4. Wyniki i dyskusja

4.1. Ocena jakości i bezpieczeństwa wybranych suplementów diety zawierających *Beta vulgaris* L.

Bezpieczeństwo suplementów diety jest bezpośrednio związane z ich jakością, na którą poza zawartością składników aktywnych, składa się także odpowiednie oznakowanie oraz parametry fizyczne gotowej formy aplikacyjnej. Powinny one umożliwiać stosowanie produktu zgodnie z rekomendacjami producenta i wywołanie efektu prozdrowotnego [38]. Zarówno w Polsce, jak i UE, nie ma wytycznych dotyczących parametrów fizycznych formułacji suplementów diety, dlatego wykorzystano monografię Farmakopei Stanów Zjednoczonych (USP).

4.1.1. Ocena poprawności oznakowania

Oznakowanie suplementów diety musi spełniać wymagania stawiane oznakowaniu żywności [4,37], a ponadto wytyczne określone dla kategorii suplementów diety [5]. Na Rycinie 2 przedstawiono przykładowy wzór opakowania.



Rycina 2 Oznakowanie suplementu diety [fragment oryginalnej ryciny z Publikacji D.2.].

Przeanalizowano 42 różne opakowania produktów zawierających buraka [Publikacja D.4.] uprzednio sprawdzając, czy zostały one zgłoszone do Rejestru produktów objętych powiadomieniem o pierwszym wprowadzeniu do obrotu [39]. Wykazano, że choć wszystkie były sprzedawane jako suplementy diety, osiem nie posiadało określenia "suplement diety" na opakowaniu i zgłoszenia do GIS, więc oceniono je jako tradycyjne produkty żywnościowe. Ewaluacja poprawności oznakowania wykazała, że 64% produktów nie spełniało wymogów prawnych odnośnie znakowania żywności, ponieważ nie zawierała co najmniej jednego z obligatoryjnych elementów. Pozostałe wnioski z analizy poprawności oznakowania zostały zestawione w Tabeli 2.

Tabela 2 Wyniki oceny poprawności oznakowania wybranych suplementów diety i produktów żywnościowych (opracowanie na podstawie wyników zawartych w Publikacji D.4.).

Element oznakowania	Wynik oceny
Oznakowanie w języku polskim	26% produktów charakteryzowała się częściowym lub całkowitym brakiem oznakowania w języku polskim
Prawidłowe określenie daty minimalnej trwałości	23% wytwórców użyło w oznakowaniu niewłaściwego sformułowania poprzedzającego datę minimalnej trwałości
Oznaczenie składników produktu	brak sformułowania „składniki” (5% produktów), ilości netto żywności (26% produktów), zalecanej porcji do spożycia w ciągu dnia (3% produktów), zawartości

Element oznakowania	Wynik oceny
	witamin i składników mineralnych w dziennej porcji produktu (21% produktów) lub realizacji ich Referencyjnych Wartości Spożycia (RWS) (3% produktów)
Ostrzeżenie o nieprzekraczaniu zalecanej porcji do spożycia w ciągu dnia	nie zostało umieszczone na 12% opakowań
Stwierdzenie, że suplementy nie mogą być stosowane jak substytut zróżnicowanej diety	nieobecne na 12% opakowań
Określenia, że powinny być przechowywane w sposób niedostępny dla małych dzieci	uchybiecie w przypadku 9% opakowań
Oświadczenia żywieniowe i zdrowotne	15% produktów sugerowało, że wykazują właściwości zapobiegania lub leczenia chorób, 21% produktów zawierało na opakowaniu oświadczenia zdrowotne spoza rejestru oświadczeń zdrowotnych EFSA lub których używanie jest niedozwolone ze względu na brak dowodów naukowych

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że niekompletne lub niewłaściwe oznakowanie może wpłynąć na przyjmowanie produktu przez konsumenta niezgodnie z jego przeznaczeniem; brak zgłoszenia suplementu do GIS może świadczyć o nielegalnym wprowadzeniu do obrotu.

4.1.2. Parametry fizyczne

W Publikacji D.3. przedstawiono wyniki badań 31 produktów w tabletkach i kapsułkach (od 23 różnych producentów) dotyczących oznaczenia parametrów fizycznych, wielkości i kształtu jednostek dawkowania. Dla produktów w tabletkach niepowlekanych (14 produktów) przeprowadzono analizę jednolitości masy [40], czasu rozpadu [41], ścieralności [42] i twardości [43], a dla produktów w kapsułkach (17 produktów) analizę jednolitości masy [40] i czasu rozpadu [41].

Uzyskano następujące wyniki (Publikacja D.3., Tabela 1 i 2):

A. Badanie jednolitości masy

- masa tabletek wynosiła od $352,33 \pm 13,37$ do $1528,94 \pm 29,93$ mg,
- średnia masa netto kapsułek wahała się w zakresie od $286,11 \pm 18,25$ do $713,54 \pm 13,62$ mg,
- wszystkie produkty w tabletkach spełniły wymagania USP dotyczące jednolitości masy preparatów jednodawkowych,

- dwa produkty nie spełniły wymagań USP dotyczących jednolitości masy preparatów jednodawkowych,
- cztery produkty charakteryzowały się masą jednostki dawkowania powyżej 1 g.

B. Badanie czasu rozpadu

- produkty w kapsułkach rozpadały się w czasie od 4 do 31 min, a w tabletkach od 13 do ponad 60 min,
- siedem badanych produktów (sześć w postaci tabletek i jeden w kapsułkach) nie spełniło wymagań USP dotyczących czasu rozpadu jednostki dawkowania, ponieważ po 30 min testu, co najmniej dwie z jednostek dawkowania nie uległy całkowitemu rozpadowi.

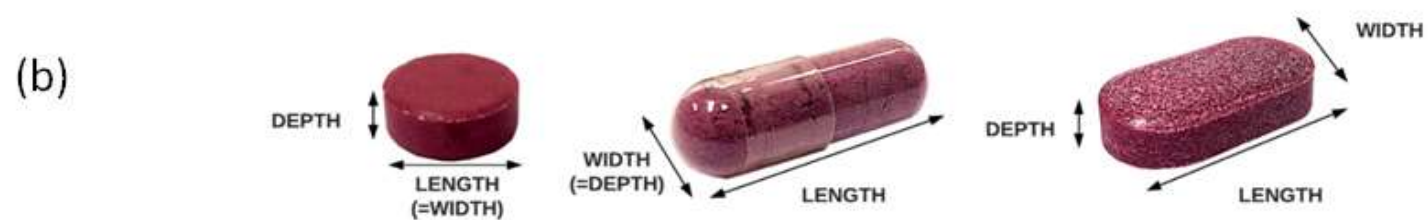
C. Badanie twardości tabletek

- wyniki twardości tabletek były zróżnicowane pomiędzy producentami i wynosiły od $59,1 \pm 14,27$ do $455,8 \pm 31,67$ N.

D. Badanie ścieralności tabletek

- ścieralność tabletek wynosiła od 0,06 do 0,97%,
- dwa produkty nie spełniły wymagań USP dotyczących ścieralności, ponieważ tabletki pękały podczas prowadzenia testu.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono zróżnicowanie masy jednostek dawkowania, które może wynikać z zastosowania różnych technologii produkcji przez wytwórców. Brak jednolitości masy poszczególnych jednostek dawkowania w przypadku dwóch produktów w kapsułkach może skutkować brakiem powtarzalności osiąganego efektu prozdrowotnego [44]. Uzyskane wyniki wskazują również, iż istnieje potencjalne ryzyko, że siedem suplementów diety nie ulegnie całkowitemu rozpadowi po spożyciu, co może mieć wpływ na ilość uwolnionej substancji bioaktywnej. Część oznaczonych parametrów fizycznych suplementów różniła się znacznie pomiędzy seriami tego samego produktu. Świadczy to o braku powtarzalności procesu produkcji lub nieuwzględnieniu zasad dobrej praktyki wytwarzania (GMP), dobrej praktyki higienicznej (GHP) oraz procedur opartych na zasadach Analizy Zagrożeń i Krytycznych Punktów Kontroli (HACCP) [Publikacja D.1.].



Rycina 3a Zróżnicowanie wielkości i kształtów jednostek dawkowania analizowanych suplementów. Rycina 3b Sposób wymiarowania jednostek dawkowania. Grafiki oryginalne z Publikacji D.3.

Zaobserwowano znaczne zróżnicowanie kształtu i wielkości analizowanych produktów, co może wpływać na komfort pacjentów przy ich stosowaniu. Produkty były w postaci cylindrycznych kapsułek (17 produktów), łukowato zaokrąglonych okrągłych tabletek (6 produktów), płaskich okrągłych tabletek (3 produkty), łukowato zaokrąglonych podłużnych tabletek (3 produkty) i łukowato zaokrąglonych owalnych tabletek (2 produkty) (Rycina 3a). Analiza kształtu została wykonana na podstawie zaleceń FDA dla producentów suplementów [45] oraz doniesień literaturowych odnośnie preferencji konsumentów dotyczących postaci preparatów doustnych [46–50] (Rycina 3b). Jeden produkt (U1) nie spełnił zaleceń FDA, ponieważ jeden z wymiarów jednostki dawkowania przekraczał 22 mm [45]. Odnosząc wymiary i kształt analizowanych suplementów do doniesień literaturowych zawierających wyniki badań preferencji konsumentów i pacjentów dotyczące doustnych form dawkowania wyciągnięto następujące wnioski:

- 13 suplementów może wywoływać dyskomfort podczas połykania, przyjmując, że jednostki dawkowania nie powinny przekraczać 8 mm (w jakimkolwiek wymiarze),
- wszystkie analizowane suplementy diety mogą być potencjalnie problematyczne do połknięcia, ponieważ ich wskaźniki wielkości (suma wartości długości, szerokości i głębokości tabletki/kapsułki) przekraczały 21 mm.

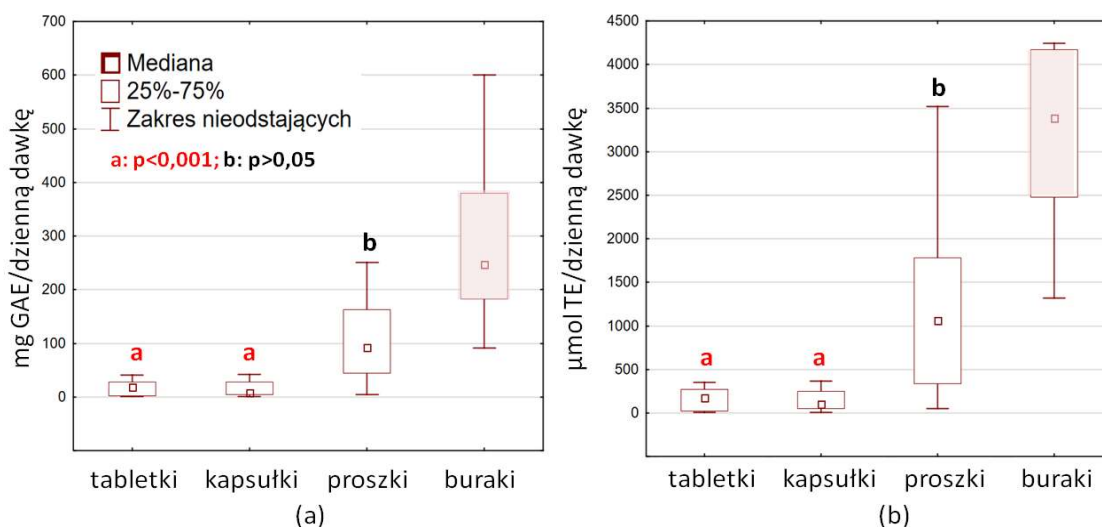
4.2. Ocena bromatologiczna wybranych suplementów diety zawierających *Beta vulgaris* L.

Skład suplementów diety jest pochodną składu surowca, który został wykorzystany w produkcji oraz procesów obróbki, którym został poddany. Zawartość substancji bioaktywnych w buraku może różnić się w zależności od odmiany [51] oraz wykorzystanego przetworu [52], a efekt prozdrowotny będzie wiązał się z dostarczoną dawką substancji bioaktywnych. Celem oszacowania potencjalnego korzystnego wpływu na organizm konsumenta, oznaczono TPC, TAC, zawartości azotanów(III) i (V) oraz skład pierwiastkowy produktów. Otrzymane wyniki porównano z burakiem świeżym i doniesieniami literaturowymi dotyczącymi klinicznych efektów zastosowania buraka.

4.2.1. Całkowita zawartość polifenoli (TPC) i całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAC)

Ze względu na brak referencyjnej metody pomiaru właściwości antyoksydacyjnych, dobrą praktyką jest wykorzystywanie kilku różnych podejść, które pozwalają na komplementarną ocenę aktywności badanego materiału [53,54]. Zdecydowano się oznaczyć TPC oraz TAC 50 suplementów diety (42 różnych producentów) oraz 20 próbek surowca uprawnego (buraka zwyczajnego) [Publikacja D.4.]. Zastosowane

metody różniły się warunkami prowadzenia reakcji, co było szczególnie istotne ze względu na bogactwo przeciwutleniaczy w buraku, jak i złożoną matrycę suplementów (niektóre były wzbogacone np. witaminą C, B, związkami żelaza). Parametr TPC jest jednym z ważnych parametrów określających aktywność antyoksydacyjną, ponieważ wysoka zawartość związków fenolowych jest związana z wysoką zdolnością przeciwutleniającą [54]. W tym celu wykorzystano metodę Folina-Ciocalteu (FC), a wyniki wyrażono w ekwiwalentach kwasu galusowego (GAE). Natomiast TAC jest wypadkową zawartości przeciwutleniaczy oraz ich wzajemnych interakcji, a do jej oznaczenia wykorzystano metodę CUPRAC oraz DPPH. Wyniki zostały wyrażone odpowiednio w ekwiwalentach troloksu (TE) (CUPRAC) oraz jako procent redukcji aktywności rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowego (DPPH). Wszystkie metody zostały zwalidowane, dzięki czemu prowadzono badania z zadowalającą dokładnością (86-115%) i precyzją (0,34-5,5%) [Publikacja D.4., Tabela 1]. Dodatkowo metoda FC została w pełni zoptymalizowana na potrzeby analizy produktów z buraka, a w metodach CUPRAC i DPPH zoptymalizowano czas inkubacji próbek [Publikacja D.4., Rycina 2].



Rycina 4 Wykres ramkowy obrazujący TPC oznaczony metodą FC (a) i TAC oznaczony metodą CUPRAC (b), w rekomendowanej dziennej porcji suplementów diety i 100-gramowej porcji buraków. Na rycinie oznaczono wyniki porównania poszczególnych grup suplementów ze 100-gramową porcją buraka (test U Manna-Whitneya). Wykresy zostały przygotowane na podstawie danych zawartych w Publikacji D.4.

Wyniki otrzymane metodą CUPRAC i FC wykazywały silną korelację (współczynnik korelacji rang Spearmana, $RS > 0,85$, $p < 0,05$) we wszystkich grupach produktów. Suplementy w kapsułkach ($14 \pm 1,2$ mg GAE/g), proszku ($13 \pm 0,68$ mg GAE/g) i liofilizaty ($15 \pm 0,702$ mg GAE/g i $14 \pm 0,47$ mg GAE/g) charakteryzowały się zbliżonymi wartościami TPC. Jedynie były one istotnie niższe (test U Mann-Whitneya, $p = 0,0049$) dla produktów w tabletkach ($7,8 \pm 0,77$ mg GAE/g) w porównaniu

z liofilizatami, co może wynikać z obecności substancji pomocniczych w tabletkach. Uwzględniając dawkowanie zalecane przez producenta, wykazano, że dawka suplementów w proszku charakteryzowała się wyższą całkowitą zawartością polifenoli ($99 \pm 9,6$ mg GAE/d.d.) niż odpowiednio w tabletkach ($17 \pm 1,4$ mg GAE/d.d.) i kapsułkach ($15 \pm 1,3$ mg GAE/d.d.), których wartości TPC były zbliżone (Rycina 4a). Aczkolwiek porcja buraków charakteryzowała się najwyższym poziomem TPC spośród wszystkich grup analizowanych próbek (211 ± 16 mg GAE/d.d. i 299 ± 13 mg GAE/d.d.). Produkty T7, C8A i C8B były wzbogacone w kwas askorbinowy oraz związki Fe, co mogło wpłynąć na ich wyższy potencjał antyoksydacyjny. Wykazano zróżnicowanie poziomów TPC i TAC w zależności od części morfologicznych warzywa, ponieważ najwyższą aktywność oznaczono dla skórek buraków.

Dawka suplementów w proszku charakteryzowała się także wyższymi wartościami TAC ($1228 \mu\text{mol} \pm 97$ TE/d.d.) niż odpowiednio w tabletkach ($167 \mu\text{mol} \pm 8,1$ TE/d.d.) i kapsułkach ($138 \mu\text{mol} \pm 10$ TE/d.d.) (Rycina 4b). Jednak porcja buraka wykazywała wyższe poziomy TAC w porównaniu do formulacji suplementów ($2743 \mu\text{mol} \pm 233$ TE/d.d. i $4064 \mu\text{mol} \pm 192$ TE/d.d.). W przypadku TAC wyrażonego jako $\mu\text{mol TE/g}$ produktu, liofilizaty zawierały istotnie więcej substancji antyoksydacyjnych niż suplementy (test U Manna-Whitneya, $p < 0,05$). Produkt P9 charakteryzował się wartością TPC (251 mg GAE/d.d.) i TAC ($3520 \mu\text{mol TE/d.d.}$) na poziomie uśrednionej wartości dla świeżego buraka (TPC 211 mg GAE/100 g, TAC $2743 \mu\text{mol TE/100 g}$) [Publikacja D.4., Tabela 2].

Suplementy w tabletkach i kapsułkach charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością wobec DPPH. Najwyższą aktywność wobec DPPH wśród tabletek wykazał T7 (90%), a C6 (90%) i C8B (90%) wśród kapsułek. Produkt C8A, pochodzący od tego samego producenta co C8B, wykazał aktywność wobec DPPH na poziomie 74%. Świadczy to o różnicach aktywności antyoksydacyjnej między seriami tego samego produktu i może prowadzić do wywołania różnego efektu prozdrowotnego. W grupie proszków wysoką aktywnością wobec DPPH wyróżniał się P11, który był wzbogacony w Fe oraz witaminę C. Większą aktywnością wobec DPPH (>70%) charakteryzowały się ogólnie produkty wzbogacone w kwas askorbinowy i Fe niż zawierające tylko przetwór buraczany [Publikacja D.4., Tabela S6]. Szczególnie obecność kwasu askorbinowego, który bardzo szybko reaguje z DPPH (<1 min) [55,56], mogła wpływać na otrzymywanie wyższych wyników.

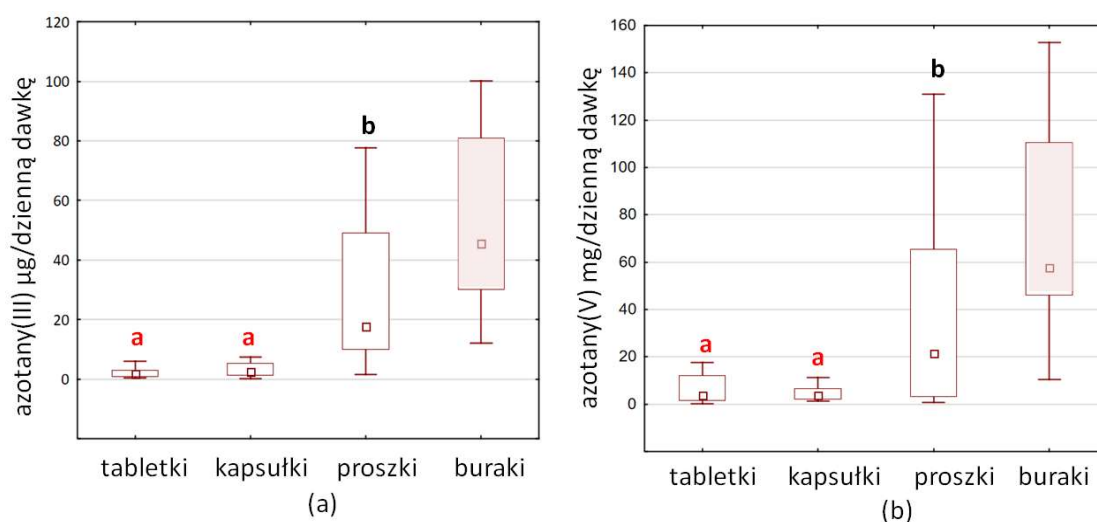
Większa podaż substancji przeciwutleniających z suplementami w proszku niż z suplementami w tabletkach czy kapsułkach wiąże się przede wszystkim z większą jednostkową dawką (3-16,9 g proszku). Pomimo skoncentrowanej formy, dzienna

porcja suplementów diety charakteryzowała się niższą aktywnością antyoksydacyjną (TPC, TAC) niż 100-gramowa porcja świeżych buraków.

4.2.2. Zawartość azotanów(III) i (V)

Zawartość azotanów(III) i (V) została oznaczona w 50 suplementach diety (42 różnych producentów) oraz 20 próbkach surowca uprawnego (buraka zwyczajnego) wg ISO 6635-1984(E) [Publikacja D.4.]. Wykorzystana metoda została zwalidowana, a otrzymane parametry pozwoliły na prowadzenie analiz z satysfakcjonującą dokładnością (81-105%) i precyzją (0,22-4,95%) [Publikacja D.4., Tabela 1].

Zaobserwowano znacznie niższe poziomy azotanów(III) (0,21-78 $\mu\text{g}/\text{d.d.}$) niż azotanów(V) (0,20-169 $\text{mg}/\text{d.d.}$) w dawce analizowanych suplementów, co jest charakterystyczne także dla świeżego surowca (12-293 $\mu\text{g}/100 \text{ g s.m. NO}_2^-$ i 11-153 $\text{mg}/100 \text{ g s.m. NO}_3^-$) [Publikacja D.4., Tabela 2 i 3]. Suplementy w tabletkach i kapsułkach zawierały istotnie mniej (test U Manna Whitneya, $p < 0,05$) azotanów(III), a suplementy w tabletkach także mniej azotanów(V) niż liofilizaty buraka w gramie produktu. Zawartość NO_2^- w suplementach w proszkach nie różniła się od buraka, a zawartość NO_3^- była porównywalna w suplementach w kapsułkach, proszku i warzywie (Publikacja D.4., Tabela S10). Nie stwierdzono zróżnicowania zawartości azotanów(III) i (V) w zależności od części morfotycznych korzenia buraka (test U Manna-Whitneya, $p > 0,05$). Odnosząc się do dziennej dawki, porcja warzywa dostarczała więcej azotanów(III) (49 $\mu\text{g}/100 \text{ g s.m.}$) i (V) (90 $\text{mg}/100 \text{ g s.m.}$) niż większość suplementów. Jedynie produkty P9 (169 $\text{mg}/\text{d.d.}$), P10 (99 $\text{mg}/\text{d.d.}$) i P13 (131 $\text{mg}/\text{d.d.}$) zapewniały większą ilość NO_3^- niż 100-gramowa porcja buraka.



Rycina 5 Wykres ramkowy obrazujący zawartość azotanów(III) (a) i (V) (b) w rekomendowanej dziennej porcji suplementów diety i 100-gramowej porcji buraków. Na rycinie oznaczono wyniki porównania poszczególnych grup suplementów ze 100-gramową porcją buraka (test U Manna-Whitneya). Wykresy zostały przygotowane na podstawie danych zawartych w Publikacji D.4.

Suplementy w kapsułkach i tabletkach zawierały zbliżoną zawartość azotanów(III) i (V) w porcji i dostarczały mniej tych związków niż produkty w proszku (Rycina 5a, b). Trzy produkty w kapsułkach (C1, C10, C11) i jeden w proszku (P9) posiadały informację o zawartości azotanów na opakowaniu, jednak w dwóch z nich (C10, C11) nie wykryto $\text{NO}_3^- > \text{LOQ}$ ($0,0027 \mu\text{g/mL NO}_2^-$), a C1 zawierał ich śladowe ilości (4,2% deklarowanej zawartości). Jedynie P9 dostarczał zbliżoną dawkę azotanów(V) do deklarowanej (85%).

Związki azotowe są donorami tlenu azotu (NO), który jako wielofunkcyjny mediator, poprawia funkcje śródbłonna, rozkurcza ściany naczyń krwionośnych, a w efekcie prowadzi do obniżenia ciśnienia krwi [57,58]. W badaniach klinicznych, obniżenie skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi oraz spadek tętna było obserwowane u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym po jednorazowym spożyciu 217 mg NO_3^- w postaci soku z buraka [59]. Przy krótkotrwałej suplementacji, wyższe dawki wywoływały efekt kliniczny (370-450 mg NO_3^- w postaci soku z buraka) [60,61]. Żaden z analizowanych suplementów, przy stosowaniu zgodnie z rekomendacjami producenta, nie dostarcza takiej dawki, więc prawdopodobnie nie byłyby skuteczne w normalizacji ciśnienia tętniczego.

Konsumpcja przetworów buraczanych może być korzystna dla pacjentów z cukrzycą typu 2 ze względu na ich wpływ na stres oksydacyjny i markery stanu zapalnego. Karimzadeh i in. [27] przeprowadzili 12-tygodniową interwencję wśród czterdziestu sześciu pacjentów z cukrzycą typu drugiego (T2DM), z zastosowaniem soku z buraka, która doprowadziła do zmniejszenia stężenia niektórych markerów stanu zapalnego, w tym IL-6, TNF- α i NF- κ B, biorących udział w patogenezie powikłań tego schorzenia. Dobowa dawka (24 mL) zastosowanego soku z buraka zawierała 46 mg GAE (TPC), 173 mg azotanów(V) oraz 0,096 mg azotanów(III) [27]. Spośród produktów przeanalizowanych w badaniach własnych, jedynie 100-gramowa porcja analizowanych buraków mogłyby dostarczyć takich ilości substancji bioaktywnych, aby wywołać podobny efekt. Większość suplementów w proszku charakteryzowała się porównywalnymi wartościami TPC (średnio 99 mg/d.d.), jednak zawierała znacznie mniej azotanów(III) (0,028 mg/dzienną dawkę) i (V) (43 mg/d.d.) [Publikacja D.4.].

4.2.3. Skład pierwiastkowy

Zawartość 22 pierwiastków (Na, K, Ca, Mg, P, Fe, As, Se, Zn, Cu, Ag, Co, Ni, Mo, Al, Mn, Sr, Cr, Ba, Li, Pb, Cd) została oznaczona w 17 suplementach diety oraz 20 próbkach surowca uprawnego (buraka zwyczajnego) we współpracy z Katedrą Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej (zespół prof. dr hab. inż. Piotra Konieczki) [Publikacja D.5.]. Badany materiał poddano homogenizacji i mineralizacji wspomaganą mikrofalami, a następnie przeanalizowano metodą atomowej

spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w mikrofalowej plazmie azotowej (MP-AES). Metoda została zwalidowana – dokładność dla wszystkich pierwiastków mieściła się w zakresie 80-120%, a precyzja była na akceptowalnym poziomie (do 10%) [Publikacja D.5., Tabela 3].

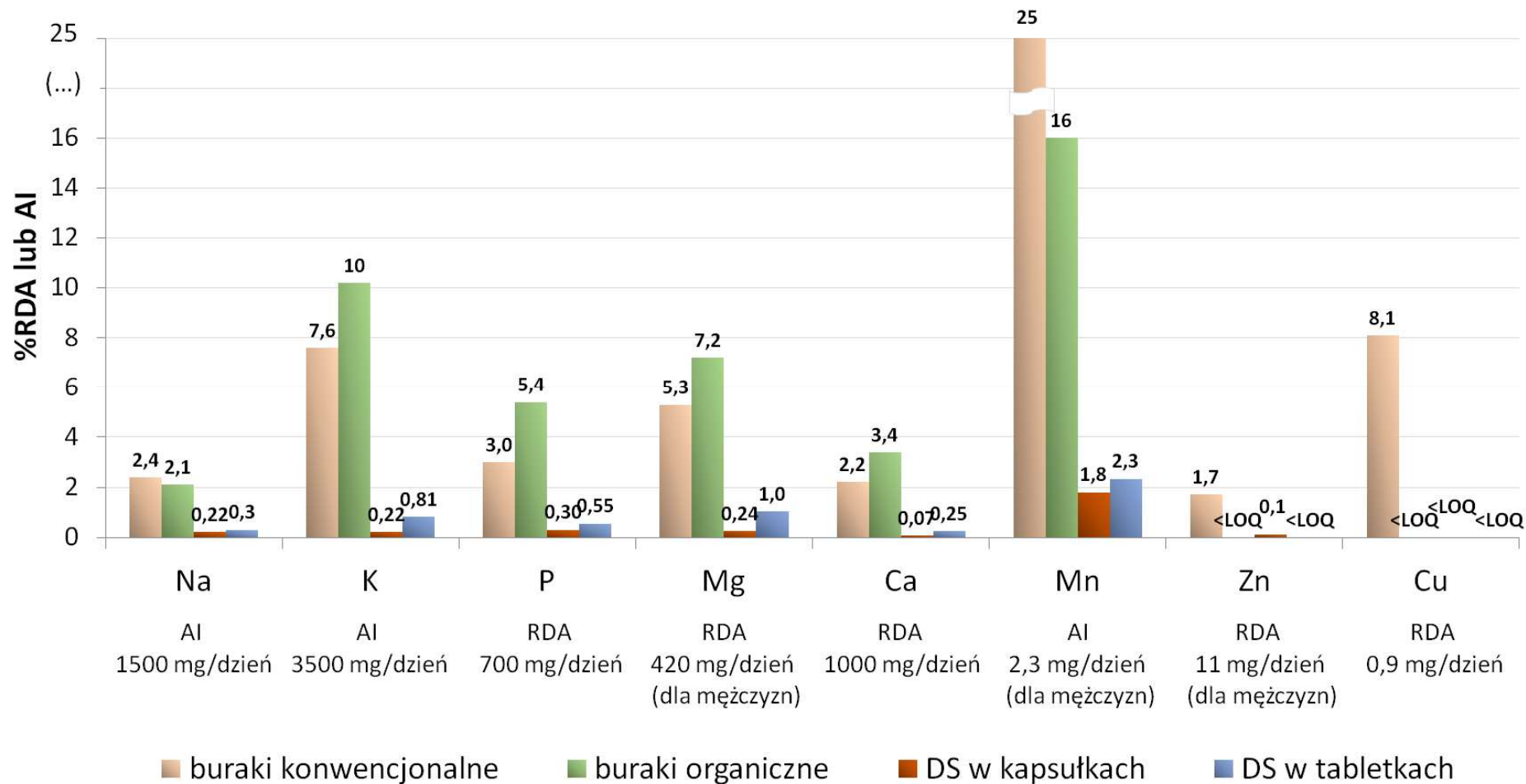
Analizowane suplementy charakteryzowały się niższą zawartością i uboższym profilem pierwiastkowym w dziennej porcji rekomendowanej przez producenta niż 100-gramowa porcja buraka konwencjonalnego lub organicznego (Tabela 3), z wyjątkiem produktów wzbogaconych w Fe. Tylko suplementy wzbogacone związkami Fe (1,28-2,80 mg/d.u.) charakteryzowały się wyższą zawartością tego pierwiastka niż świeże warzywo (0,50-0,88 mg/100 g ś.m.). W próbkach buraka konwencjonalnego zawartość Ag, Co, Cr, Li, Mo, Ni, Pb była <LOQ (wartości LOQ są podane w Publikacji D.5., Tabeli 3). Realizacja AI (dla Na i K) lub RDA (dla P, Mg i Ca) przez suplementy nie przekraczała 1%, natomiast dla buraka wahała się od 2,1 do 10% (Rycina 6). Tabletki dostarczały więcej tych makropierwiastków niż kapsułki, co może być związane z większą masą produktu odpowiadającą dziennej dawce (1,13-5,55 g/dzień i odpowiednio 1,19-1,35 g/dzień) [Publikacja D.5., Tabela 2]. Ponadto niektóre suplementy w tabletkach zawierały sole Mg i Ca jako substancje przeciwbrylające. Buraki były dobrym źródłem Mn (16-25% AI), a suplementy dostarczały niewielkiej ilości tego pierwiastka (do 2,3% AI). Kapsułki zawierały śladowe ilości Zn (0,01% RDA) w porównaniu z burakami konwencjonalnymi (1,7%). Warzywa uprawiane konwencjonalnie zapewniały też istotną dawkę Cu (8,1%) w odróżnieniu od pozostałych produktów.

Na rynku dostępne są suplementy wzbogacone w Fe i witaminę C (będącą związkiem ułatwiającym wchłanianie tego pierwiastka), których celem ma być uzupełnienie diety niedoborowej w te związki. Przeanalizowane suplementy wzbogacone w Fe pozwalały na realizację zalecanego dziennego spożycia dla mężczyzn (RDA 10 mg) w zakresie od 36 do 179% [Publikacja D.3.] oraz od 45 do 88% [Publikacja D.5.]. Natomiast suplementy niewzbogacone dostarczały znacznie mniej tego pierwiastka (nie więcej niż 4,1% RDA [Publikacja D.3., D.5.], a buraki od 5,01 do 8,8% RDA [Publikacja D.5.]. W analizowanych produktach występowały fumaran lub glukonian żelaza(II), które są najczęściej wykorzystywanymi solami tego pierwiastka, jednak w literaturze wskazuje się ich słabą stabilność, silne podrażnienie przewodu pokarmowego, niską biodostępność (10-35%) oraz potencjalne toksyczne skutki uboczne [62–64].

Tabela 3 Zawartość pierwiastków w próbkach buraków i suplementach diety zawierających buraka (zmodyfikowane Tabele 4 i 5 z Publikacji D.5.).

pierwiastek	Próbki buraka						Suplementy diety zawierające buraka					
	konwencjonalnego			organicznego			w kapsułkach			w tabletkach		
	n ¹	(mg/100 g ś.m.)		n ¹	(mg/100 g ś.m.)		n ¹	(µg/d.u.)		n ¹	(µg/d.u.)	
		\bar{x}	SD		\bar{x}	SD		\bar{x}	SD		\bar{x}	SD
Na	12	35	16	9	32	25	10	1625	2576	7	1108	1012
K	12	266	37	9	356	149	10	3510	2440	7	5421	2677
P	12	20,8	5,3	9	37,54	0,56	6	871	137	6	724	249
Mg	12	22,4	4,7	9	30,2	7,4	10	410	416	7	806	749
Ca	12	21,7	3,2	9	34	14	10	330	154	7	626	530
Fe	12	0,68	0,14	9	0,82	0,11	10	1004	1312	7	457	736
Se	3	0,541	0,032	9	<LOQ		10	<LOQ		10	<LOQ	
Zn	6	0,380	0,039	9	<LOQ		2	4,21	0,46	10	<LOQ	
Cu	9	0,097	0,013	9	<LOQ		10	<LOQ		10	<LOQ	
Mn	12	0,58	0,71	9	0,36	0,10	4	17,1	2,9	6	10,9	5,8
Sr	12	0,138	0,030	9	0,24	0,23	3	3,00	0,26	2	2,14	0,27
Ba	12	0,175	0,054	9	0,217	0,022	10	<LOQ		10	<LOQ	
Al	9	0,65	0,18	9	0,85	0,92	9	50,4	1,2	6	37	71
As	3	3,246	0,047	3	3,68	0,11	3	93,9	1,2	10	<LOQ	
Cd	3	0,06387	0,00013	9	<LOQ		3	22	34	2	2,518	0,019

\bar{x} - średnia wartość, SD - odchylenie standardowe, n¹ - liczba próbek z oznaczoną zawartością >LOQ, d.u. - jednostka dawkowania; Se LOQ 0,30 mg/kg, Zn LOQ 0,96 mg/kg, Cu LOQ 0,21 mg/kg, Ba LOQ 0,063 mg/kg, As LOQ 0,30 mg/kg, Cd LOQ 0,69 mg/kg.



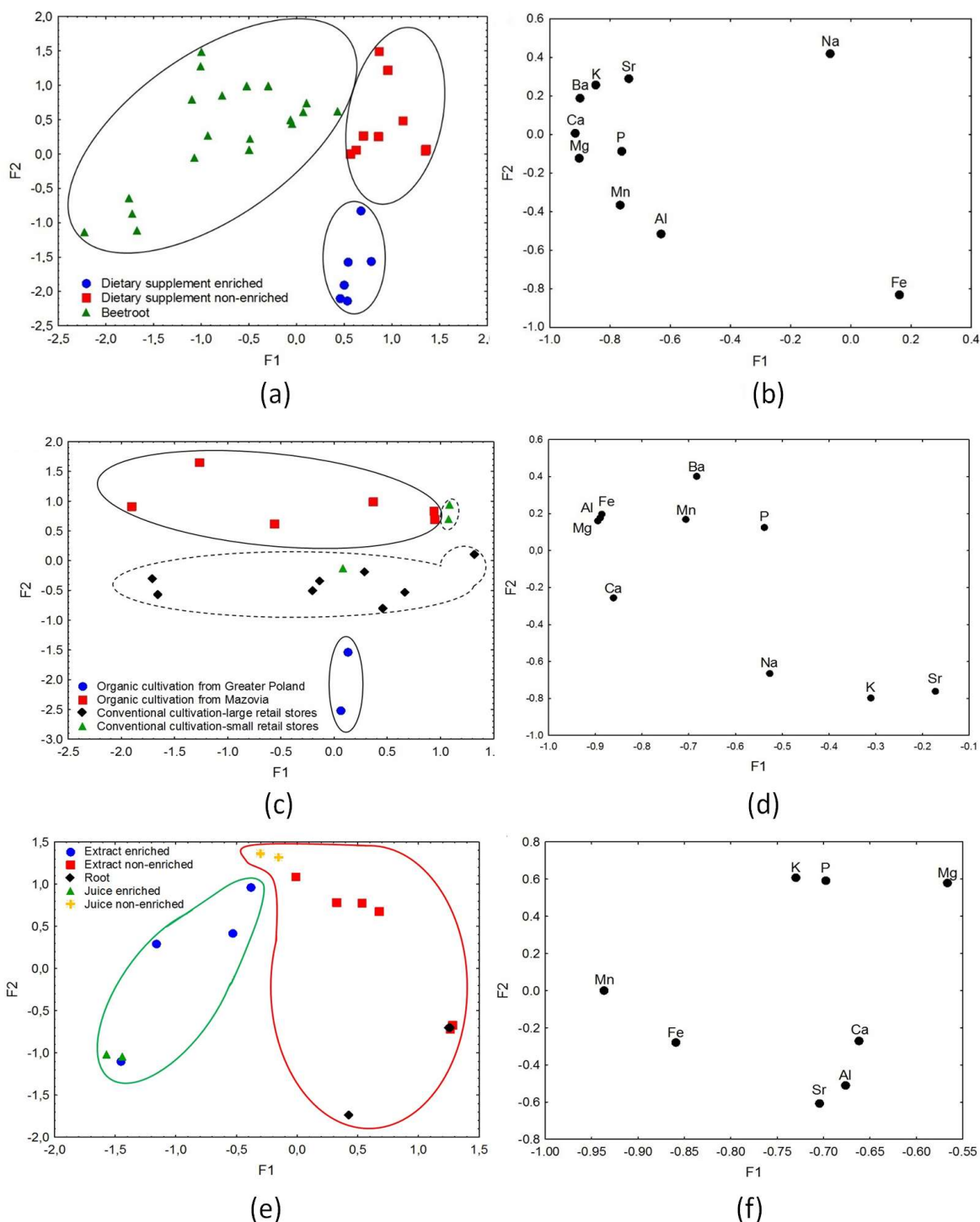
Rycina 6 Realizacja rekomendacji żywieniowych przez 100-gramową porcję buraka konwencjonalnego, organicznego oraz dzienną dawkę suplementów w tabletkach i kapsułkach wg rekomendacji producenta. Wykresy zostały przygotowane na podstawie danych opublikowanych w Publikacji D.5. Zn LOQ 0,96 mg/kg, Cu LOQ 0,21 mg/kg.

Biodostępność Fe jest zmienna dla różnych związków [65]. Przykładowo wynosi 12% dla glukonianu Fe [65], co oznacza, że konsument powinien przyjąć 83 mg tego związku, żeby zapewnić realizację RDA (10 mg/dzień dla mężczyzn) [66]. Wykazano, że suplementacja 60-80 mg Fe/dzień przez 12 tygodni może być efektywna w leczeniu niedoboru tego pierwiastka u zdrowej populacji [67]. Uwzględniając rekomendowane dzienne spożycie analizowanych wzbogaconych suplementów, zapewniały one od 4,5 do 8,8 mg Fe, co oznacza, że mogą nie mieć istotnego wpływu w zapobieganiu niedokrwistości z niedoboru Fe. Ponadto analizowane suplementy diety dostarczały nie więcej niż 0,42% RDA dla Zn (11 mg) [Publikacja D.3.]. Jednocześnie zawartość Zn była na tyle niska, że nie będzie ograniczała wchłaniania Fe. Oceniono także zgodność zawartości żelaza z deklaracją producenta, która powinna mieścić się w zakresie -20%/+45% składnika mineralnego [68,69]. Jeden z sześciu produktów (6HeB) nie spełnił tego wymogu [Publikacja D.5., Tabela 6].

Na podstawie wyników zawartości wybranych pierwiastków w próbkach, została przeprowadzona analiza chemometryczna. Analiza czynnikowa (FA) dla wszystkich próbek buraków i suplementów diety pozwoliła na odróżnienie próbek buraków od suplementów i suplementów wzbogaconych solami Fe (Rycina 7a i b). Próbki warzyw opisane były przez K, Ca, Mg, P, Mn, Al, Ba, Sr. Natomiast za wyodrębnienie suplementów niewzbogaconych odpowiadał Na, a Fe było deskryptorem suplementów wzbogaconych w ten pierwiastek.

W kolejnym etapie (Rycina 7c i d), wykorzystana FA pozwoliła na zróżnicowanie próbek buraków zarówno ze względu na typ uprawy (konwencjonalna i ekologiczna), jak i próbek buraków uprawianych ekologicznie ze względu na pochodzenie geograficzne (województwo mazowieckie i wielkopolskie). Wyróżniono również próbki uprawiane konwencjonalnie z dużych (>400 m²) i małych sklepów (detaliczne, warzywnicze).

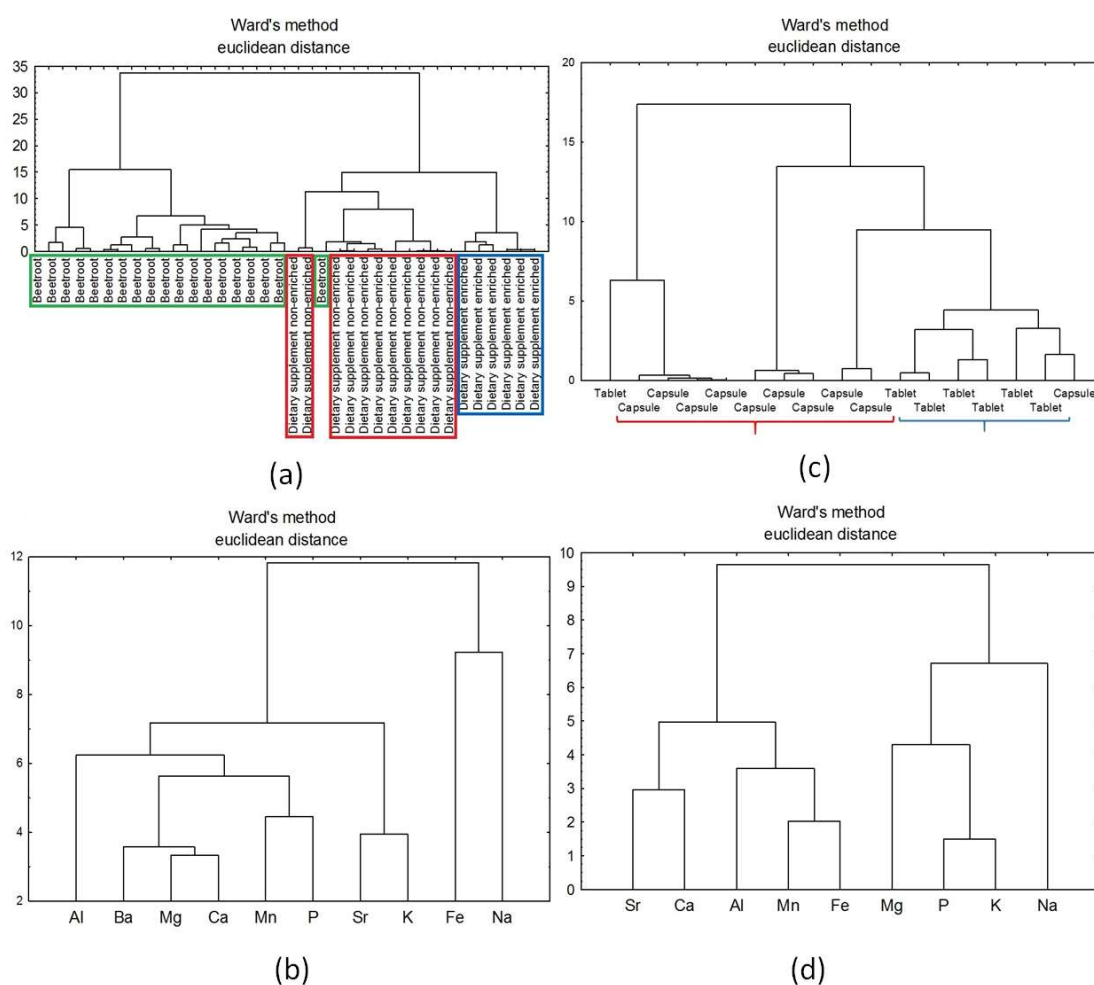
Analiza czynnikowa danych dotyczących suplementów diety umożliwiła wyodrębnienie grup pod względem różnego rodzaju głównego składnika (ekstraktu, sproszkowanego korzenia i soku) oraz wzbogacenia w Fe (Rycina 7e, f). Stwierdzono, że suplementy diety zawierające sok z buraków są opisane przez Fe, Mn, P, K i Mg. Natomiast Ca, Al i Sr były deskryptorami suplementów ze sproszkowanym korzeniem. Analiza ta potwierdziła zróżnicowanie materiału faktograficznego w zależności od stopnia przetworzenia głównego składnika.



Rycina 7 Rozmieszczenie punktów w układzie współrzędnych czynnikowych F1-F2 odpowiadających poszczególnym próbkom buraków, suplementów diety wzbogaconych związkami żelaza i niewzbogaconych (a, c, e) oraz odpowiadających im ładunków czynnikowych dla poszczególnych pierwiastków (b, d, f). Ryciny oryginalne pochodzące z Publikacji D.5.

Analiza skupień (CA) została przeprowadzona w celu pogrupowania analizowanych produktów ze względu na skład mineralny. W pierwszej kolejności przeanalizowano dane dotyczące wszystkich produktów (Rycina 8a, b). Wyodrębniono dwa skupienia, z których jedno obejmowało próbki buraków, a drugie suplementy diety. Następnie

wykonano CA tylko dla suplementów diety (Rycina 8c, d) celem oceny zależności między formą aplikacyjną a składem pierwiastkowym. Na drugim dendrogramie (Rycina 8c, d) można zaobserwować dwa główne skupienia odpowiadające suplementom w tabletkach i kapsułkach. Za wyodrębnienie grupy suplementów w postaci kapsułek odpowiedzialne były pierwiastki Sr, Ca, Al, Mn i Fe, a w przypadku tabletek – Mg, P, K i Na. Jeden z produktów w kapsułkach został niewłaściwie przypisany do grupy tabletek ze względu na wysoką zawartość Na. Natomiast jeden produkt w tabletkach został przypisany do grupy kapsułek, co może być związane z błędną informacją na etykiecie odnośnie formy aplikacyjnej.



Rycina 8 Dendrogram dla badanych próbek buraków i suplementów diety (a, b) oraz różnych postaci suplementów diety (c, d). Ryciny oryginalne pochodzące z Publikacji D.5.

4.3. Oszacowanie ryzyka zdrowotnego konsumenta

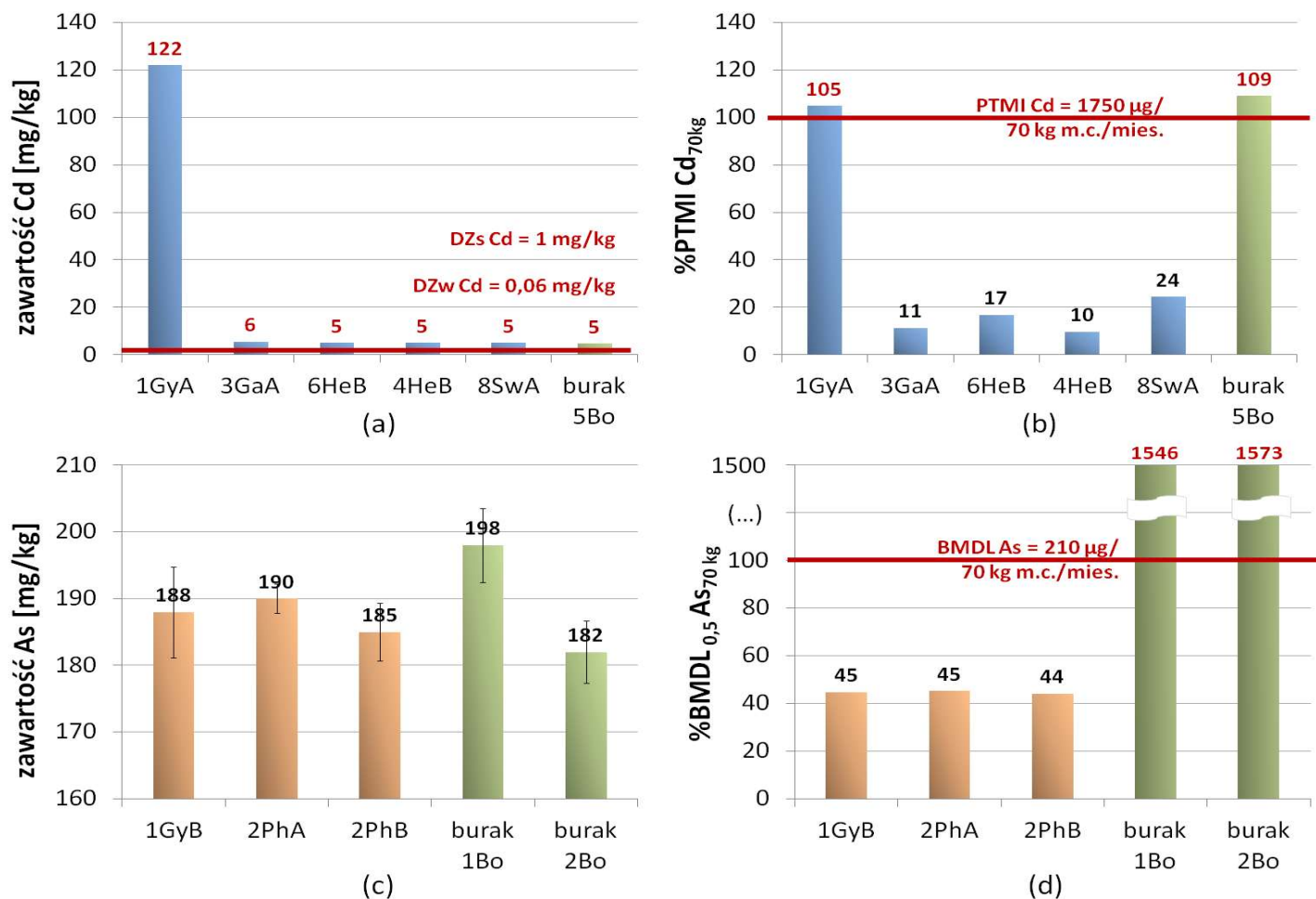
Celem ochrony konsumentów ustalono dopuszczalną zawartość substancji potencjalnie toksycznych w produktach żywnościowych oraz ich tolerowanie pobranie. Dopuszczalne limity zanieczyszczeń metalami ciężkimi w warzywach wynoszą 0,06 mg Cd/kg i 0,10 mg Pb/kg, a w suplementach diety – 0,10 mg THg/kg, 1 mg Cd/kg

i 3 mg Pb/kg [70,71]. Dopuszczalny limit THg w warzywach nie został ustalony. Ponadto w oszacowaniu ryzyka narażenia człowieka na metale ciężkie wykorzystuje się tymczasowe tolerowane pobranie tygodniowe (PTWI) i miesięczne (PTMI). Tolerowane tymczasowe miesięczne pobranie dla Cd wynosi 25 µg/kg m.c./miesiąc [72], a PTWI dla Hg 4 µg/kg m.c./tydzień [73]. Ze względu na wysoką toksyczność i brak możliwości określenia dawki niezagrażającej zdrowiu człowieka, wartości PTWI dla Pb i As zostały wycofane [74,75]. Do oceny ryzyka narażenia na As wykorzystano wartość najniższej dawki związanej ze wzrostem prawdopodobieństwa rozwoju raka płuc o 0,5% ($BMDL_{0,5} As = 3 \mu g/kg m.c.$) [75].

4.3.1. Zawartość arsenu (As), kadmu (Cd), ołowiu (Pb) i platyny (Pt)

Zawartość As, Cd, Pb i Pt została oznaczona metodą MP-AES w 17 suplementach diety oraz 20 próbkach surowca uprawnego (buraka zwyczajnego) we współpracy z Katedrą Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej (zespół prof. dr hab. inż. Piotra Konieczki) [Publikacja D.5.]. W żadnej z próbek nie stwierdzono obecności Pb powyżej LOQ (0,69 mg/kg). Ocena ekspozycji konsumenta na związki Cd i As została oszacowana na podstawie PTMI Cd oraz $BMDL_{0,5} As$ oraz dopuszczalnych limitów zanieczyszczeń w żywności.

Zanieczyszczenie Cd zostało stwierdzone w jednej serii buraków, trzech suplementach diety w kapsułkach i dwóch w tabletkach (Rycina 9a) i we wszystkich przypadkach wiązało się ze znacznym przekroczeniem dopuszczalnych limitów (501-12233% dopuszczalnej zawartości Cd). Uwzględniając rekomendowaną dzienną dawkę suplementów i 100-gramową porcję buraka, analizowane produkty dostarczały 10-109% dawki PTMI dla Cd (Rycina 9b), więc nie powinny być spożywane przez konsumentów ze względu na potencjalny szkodliwy wpływ na zdrowie. Przeprowadzone badania wykazały, że dwie serie buraków były w znacznym stopniu zanieczyszczone As (182-198 mg/kg As) (Rycina 9c), co mogło być związane np. ze skażeniem gleby, na której rosły warzywa [76]. Zakładając spożycie 100 g tych warzyw, zostałyby dostarczona dawka As odpowiadająca 1546% i 1573% $BMDL_{0,5} As$. W przypadku suplementów, trzy produkty były zanieczyszczone w stopniu odpowiadającym 44-45% $BMDL_{0,5} As$ (Rycina 9d).



Rycina 9 Zawartość Cd w suplementach diety i próbkach buraka (a). Realizacja PTMI Cd w wyniku spożycia dziennej dawki suplementu lub 100 g buraków (b). Zawartość As w suplementach diety i próbkach buraka (c). Stosunek zawartości As w dziennej dawce suplementu lub 100 g warzywa do BMDL_{0,5As} (d). Wykresy zostały przygotowane na podstawie danych opublikowanych w Publikacji D.5. DZs Cd – dopuszczalna zawartość Cd w suplementach [77], DZw Cd – dopuszczalna zawartość Cd w warzywach [77], m.c. – masa ciała, mies. - miesiąc

4.3.2. Zawartość rtęci (THg)

Rtęć została oznaczona w 54 suplementach (42 producentów) oraz 20 próbkach surowca uprawnego (buraka zwyczajnego) metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej w środowisku zimnych par, która uprzednio została zwalidowana (dokładność 93-102%, precyzja 4,7%) [Publikacja D.6., Tabela 3]. Oznaczenie zostało przeprowadzone we współpracy z Katedrą Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej (zespół prof. dr hab. inż. Piotra Konieczki).

Nie stwierdzono przekroczenia dopuszczalnego limitu zanieczyszczenia THg (0,10 mg/kg) w badanych suplementach. Produkty w tabletkach ($2,6\pm 3,9$ ng/g) zawierały więcej THg w porównaniu do kapsułek ($0,64\pm 0,39$ ng/g) i proszków ($0,65\pm 0,32$ ng/g). Wyjaśniono to tym, że tabletki zawierają również substancje pomocnicze, które mogą być dodatkowym źródłem zanieczyszczenia THg. Stwierdzono, że trzy produkty w tabletkach (T4, T5, T8A) były istotnie zanieczyszczone THg (12%; 9,4%; 10% dopuszczalnego limitu). Uwzględniając dzienne spożycie rekomendowane przez producentów, żaden z produktów nie stanowił bezpośredniego zagrożenia dla konsumentów (0,00053-0,18% PTWI, 0,000037-0,013 THQ). Jednak należy uwzględnić je jako potencjalne źródło THg przy szacowaniu narażenia konsumentów na metale toksyczne w diecie.

Wykazano zróżnicowanie zawartości THg (test Kruskala-Wallisa, $p < 0,05$) w zależności od części surowca roślinnego (buraka zwyczajnego) [Publikacja D.6., Rycina 2]. Najwyższy poziom THg oznaczono w skórkach (28 ± 22 ng/100 g ś.m.). Zalecana porcja któregośkolwiek z analizowanych suplementów diety zawierała mniej THg niż próbki buraków. Wyjaśniono to, niższą sumaryczną masą dziennej porcji suplementów (nie więcej niż 5 g w przypadku tabletek i kapsułek lub 15 g w przypadku proszków) niż 100-gramowa porcja buraka.

4.3.3. Ryzyko związane z zawartością azotanów(III) i (V)

Zawartość azotanów(III) nie stanowiła ryzyka związanego z zatruciem tymi związkami ($< 2\%$ ADI NO_2^-). Porcja buraka dostarczała więcej azotanów(V) (15-20% ADI) niż suplementy w tabletkach (3,2% ADI) i kapsułkach (5,1% ADI). Zawartość NO_3^- zapewniana przez dzienną porcję suplementów w proszkach była porównywalna do buraka. Najwyższą dawkę spośród wszystkich produktów zapewniał P9 (48% ADI NO_3^-). Producent dedykował ten produkt sportowcom i zalecał przyjmowanie 2-3 miarek przed treningiem (11-16,5 g). Na opakowaniu została umieszczona informacja, że produkt zawiera azotany w ilości 4 g/100 g, jednak analiza wykazała zawartość 1,02 mg $\text{NO}_3^-/100$ g oraz 0,17 mg $\text{NO}_2^-/100$ g. Ponadto produkt był niekompletnie oznakowany i nie została dołączona miarka umożliwiająca

odmierzenie zalecanej porcji, co może prowadzić do niezrozumienia przez konsumenta kluczowych informacji i przyjęcia nieodpowiedniej dawki produktu. Przyjęcie ok. 25 g tego produktu będzie wiązało się z przekroczeniem poziomu uznanego za bezpieczny dla 70 kg osoby dorosłej ($ADI = 259 \text{ mg NO}_3^-/70 \text{ kg/dzień}$) [78].

Warto zaznaczyć, że dawki azotanów(V) (400-500 mg) wykorzystywane w badaniach z udziałem sportowców, po których występował istotny oczekiwany efekt (np. obniżenie ciśnienia tętniczego, poprawa tolerancji wysiłku fizycznego, itd.), zwykle przekraczały ten poziom [22,23]. Należy rozważyć ponowną weryfikację potencjalnych zagrożeń dla zdrowia i korzyści związanych ze źródłami azotanów(III) i (V) w żywności, w kontekście dawek wywołujących działanie ochronne na naczynia krwionośne, poprawiające wydolność organizmu i obniżające ciśnienie krwi [79]. Szczególnie jest to istotne z tego powodu, że nie wiadomo, czy każde źródło azotanów (warzywa, mięso, woda) ma taki sam stosunek korzyści do szkód dla konsumenta [80]. Niektóre źródła wskazują na brak wzrostu ryzyka rozwoju nowotworów przy przyjmowaniu dawek przekraczających $ADI \text{ NO}_3^-$ ze źródeł roślinnych [81].

5. Wnioski

Najważniejsze osiągnięcia mojej rozprawy doktorskiej to:

1. Wykazanie, że znaczna część (64%) analizowanych produktów posiadała niekompletne oznakowanie, co może prowadzić do przyjmowania suplementów niezgodnie z rekomendacjami producenta.
2. Stwierdzenie znacznego zróżnicowania parametrów fizycznych analizowanych suplementów diety z buraka w postaci tabletek i kapsułek oraz wykazanie, że część z nich może stanowić zagrożenie dla konsumentów ze względu na niespełnianie kryteriów jakości określonych przez USP oraz kształt i wielkość jednostki dawkowania.
3. Wykazanie znacznego zróżnicowania suplementów diety z buraka w postaci tabletek, kapsułek i proszków oraz próbek buraka pod względem TPC, TAC, zawartości azotanów(III), (V) i składu mineralnego. Ponadto stwierdzono, że większość analizowanych suplementów diety dostarczała mniej składników bioaktywnych niż 100-gramowa porcja świeżego warzywa.
4. Wykazanie zróżnicowania zawartości TPC, TAC oraz THg w zależności od części morfologicznych korzenia buraka (najwyższe wartości oznaczono w skórkach).
5. Zróżnicowanie próbek buraków i suplementów diety z buraka ze względu na typ (warzywo, suplement, suplement wzbogacony związkami żelaza), pochodzenie, rodzaj uprawy buraka (ekologiczna, konwencjonalna), formę aplikacyjną (kapsułka,

tabletki) na podstawie składu mineralnego dzięki zastosowaniu technik wielowariancyjnych, takich jak FA i CA.

6. Wykazanie, że część analizowanych produktów może stanowić bezpośrednie zagrożenie dla życia spożywających je osób ze względu na znaczne zanieczyszczenie Cd (sześć produktów) i As (pięć produktów). Jednocześnie, potwierdzono, że analizowane produkty nie stanowiły bezpośredniego zagrożenia dla konsumenta w kontekście zanieczyszczenia THg oraz żaden produkt nie dostarczał dawki azotanów(III) i (V) przekraczającej ADI.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na zasadność wprowadzenia kontroli suplementów diety zawierających buraka zwyczajnego na rynku polskim pod względem: poprawności oznakowania, parametrów fizycznych, TPC, TAC, zawartości azotanów(III), (V), składu mineralnego, i zanieczyszczeń pierwiastkami toksycznymi. Dodatkowo wskazują na konieczność wprowadzenia wytycznych odnośnie parametrów fizycznych, które obowiązują w Farmakopei Stanów Zjednoczonych.

Literatura

1. Najwyższa Izba Kontroli. *Wprowadzenie do obrotu suplementów diety. LLO.430.005.2021. Nr ewid. 160/2021/P/21/078/LLO*; 2021;
2. Łysak, J. Raport Nawyki żywieniowe Polaków. Badanie przeprowadzone na reprezentatywnej próbie osób. Termin realizacji: lipiec 2018 r. Metoda: CAWI. Dostępne na: <https://cheers.com.pl/wiedza/nawyki-zywieniowe-polakow/> (udostępniono kwi 2, 2023).
3. PMR Market Experts. Rynek suplementów diety przeżywa drugą młodość Dostępne na: <https://mypmr.pro/whitepapers/19456#tabs>.
4. Kancelaria Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej *Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia Dz.U. 2006 r. Nr 171 poz. 1225 z późn. zm.*; 2006;
5. Minister Zdrowia. *Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 9 października 2007 r. w sprawie składu oraz oznakowania suplementów diety. Dz. U. 2007 Nr 196 poz. 1425. z późn. zm.*; 2007;
6. Łata, M. W kwestii prawnego pojęcia suplementów diety. *Przegląd Prawa Rolnego* **2022**, 2, 119–135, doi:10.14746/ppr.2022.31.2.7.
7. Wawryk-Gawda, E.; Budzyńska, B.; Lis-Sochocka, M.; Chylińska-Wrzos, P.; Zarobkiewicz, M.; Jodłowska-Jędrych, B. Dietary supplements-consumer assessment based on questionnaire survey. *Przegl. Epidemiol.* **2018**, 72, 93–103.
8. Baraniak, J.; Kania, M. Suplementy diety, środki spożywcze specjalnego przeznaczenia żywieniowego a lek roślinny w świetle współczesnej fitoterapii. *Postępy Fitoter.* **2015**, 3, 177–183.
9. Kancelaria Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej. *Art. 20a Ustawy Prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001 r. (Dz.U.2022.2301)*; 2001;
10. Woroń, J. Niekorzystne interakcje leków oraz leków i suplementów diety jako przyczyna hospitalizacji pacjentów – o czym warto pamiętać. *Stany nagłe po dyplomie* **2018**, 2, 61–68.
11. Najwyższa Izba Kontroli. Suplementy diety w świetle kontroli NIK. **2017**.
12. Gawęda, M. Rola niektórych składników podłoża w ograniczaniu kumulacji ołowiu przez wybrane gatunki warzyw korzeniowych i liściowych oraz ich znaczenie dla zachowania wartości biologicznej roślin. *Zesz. Nauk. Akad. Rol. w Krakowie* **1998**, 240, 6–11.
13. Odoh, U.E.; Ezugwu, C.O.; Okoro, E.C. Quantitative phytochemical, proximate/nutritive composition analysis of *Beta vulgaris* Linnaeus (Chenopodiaceae). *Planta Med.* **2012**, 78, 3723–3728, doi:10.1055/s-0032-1320803.
14. Singh, B.; Hathan, B.S. Chemical composition, functional properties and processing of beetroot-a review. *J. Food Sci. Technol.* **2012**, 49, 22–32, doi:10.1007/s13197-011-0310-7.
15. Chhikara, N.; Kushwaha, K.; Sharma, P.; Gat, Y.; Panghal, A. Bioactive compounds of beetroot and utilization in food processing industry: A critical review. *Food Chem.* **2019**, 272, 192–200, doi:10.1016/j.foodchem.2018.08.022.
16. Kohen, R.; Nyska, A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* **2002**, 30, 620–650, doi:10.1080/01926230290166724.
17. Clifford, T.; Howatson, G.; West, D.J.; Stevenson, E.J. The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease. *Nutrients* **2015**, 7, 2801–2822.
18. Sadowska-Bartosz, I.; Bartosz, G. Biological properties and applications of betalains. *Molecules* **2021**, 26, 2520, doi:10.3390/molecules26092520.
19. Georgiev, V.G.; Weber, J.; Kneschke, E.M.; Denev, P.N.; Bley, T.; Pavlov, A.I. Antioxidant activity and phenolic content of betalain extracts from intact plants and hairy root cultures of the red beetroot *Beta vulgaris* cv. Detroit Dark Red. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2010**, 65, 105–111, doi:10.1007/s11130-010-0156-6.

20. Olumese, F.E.; Oboh, H.A. Antioxidant and antioxidant capacity of raw and processed nigerian beetroot (*Beta vulgaris*). *Niger. J. Basic Appl. Sci.* **2016**, *24*, 35–40.
21. Lundberg, J.O.; Carlstöröm, M.; Larsen, F.J.; Weitzberg, E. Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *89*, 525–532, doi:10.1093/cvr/cvq325.
22. Domínguez, R.; Cuenca, E.; Maté-Muñoz, J.L.; García-Fernández, P.; Serra-Paya, N.; Estevan, M.C.L.; Herreros, P.V.; Garnacho-Castaño, M.V. Effects of beetroot juice supplementation on cardiorespiratory endurance in athletes. A systematic review. *Nutrients* **2017**, *9*, 43, doi:10.3390/nu9010043.
23. Arazi, H.; Eghbali, E. Possible effects of beetroot supplementation on physical performance through metabolic, neuroendocrine, and antioxidant mechanisms: A narrative review of the literature. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 1–19, doi:10.3389/fnut.2021.660150.
24. Bonilla Ocampo, D.A.; Paipilla, A.F.; Marín, E.; Vargas-Molina, S.; Petro, J.L.; Pérez-Idárraga, A. Dietary nitrate from beetroot juice for hypertension: A systematic review. *Biomolecules* **2018**, *8*, 1–12, doi:10.3390/biom8040134.
25. Remington, J.; Winters, K. Effectiveness of dietary inorganic nitrate for lowering blood pressure in hypertensive adults: A systematic review. *JBI Database Syst. Rev. Implement. Reports* **2019**, *17*, 365–389, doi:10.11124/JBISRIR-2017-003842.
26. Aliahmadi, M.; Amiri, F.; Bahrami, L.S.; Hosseini, A.F.; Abiri, B.; Vafa, M. Effects of raw red beetroot consumption on metabolic markers and cognitive function in type 2 diabetes patients. *J. Diabetes Metab. Disord.* **2021**, *20*, 673–682, doi:10.1007/s40200-021-00798-z.
27. Karimzadeh, L.; Behrouz, V.; Sohrab, G.; Hedayati, M.; Emami, G. A randomized clinical trial of beetroot juice consumption on inflammatory markers and oxidative stress in patients with type 2 diabetes. *J. Food Sci.* **2022**, *87*, 5430–5441, doi:10.1111/1750-3841.16365.
28. Sauder, H.M.; Rawla, P. Beeturia. W *StatPearls [Internet]*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2023; T. 2.
29. Bailey, S.J.; Winyard, P.; Vanhatalo, A.; Blackwell, J.R.; DiMenna, F.J.; Wilkerson, D.P.; Tarr, J.; Benjamin, N.; Jones, A.M. Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* **2009**, *107*, 1144–1155, doi:10.1152/JAPPLPHYSIOL.00722.2009/ASSET/IMAGES/LARGE/ZDG0100987490006.JPG.
30. Luke, R.G.; Watson, W.C. Anaphylaxis with Beeturia. *Br. Med. J.* **1963**, *2*, 980, doi:10.1136/bmj.2.5363.980.
31. Oliveira, L.C.L. de; Genov, I.R.; Cabral, E. do C.; Mello, Y.A.M.; Mallozi, M.C.; Solé, D. Anaphylaxis to beetroot (*Beta vulgaris*): a case report. *Clin. Transl. Allergy* **2011**, *1*, P51, doi:10.1186/2045-7022-1-S1-P51.
32. Nuss, R.F.; Loewus, F.A.; Degree, M.S. Further studies on oxalic acid biosynthesis in oxalate-accumulating plants. *Plant Physiol.* **1978**, *61*, 590, doi:10.1104/PP.61.4.590.
33. Noonan, S.C. Oxalate content of foods and its effect on humans. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **1999**, *8*, 64–74, doi:10.1046/j.1440-6047.1999.00038.x.
34. Blázovics, A.; Sárdi, É.; Szentmihályi, K.; Váli, L.; Takács-Hájos, M.; Stefanovits-Bányai, É. Extreme consumption of *Beta vulgaris* var. *rubra* can cause metal ion accumulation in the liver. *Acta Biol. Hung.* **2007**, *58*, 281–286, doi:10.1556/ABiol.58.2007.3.4.
35. FMI Future Market Insights. Beetroot powder market outlook (2022-2032) Dostępne na: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/beetroot-powder-market> (udostępniom mar 24, 2023).
36. FMI Future Market Insights. Plant based iron supplements market outlook (2022-2032) Dostępne na: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/plant-based-iron->

- supplements-market (udostępniono mar 24, 2023).
37. Parlament Europejski i Rada (UE). *Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r. w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności* (Dz. Urz. UE L 304/18 z 22.11.2011, z późn. zm.); 2011;
 38. O'Dwyer, D.D. Navigating the maze of dietary supplements quality and efficacy. *Top. Clin. Nutr.* **2020**, *35*, 309–319, doi:10.1097/TIN.0000000000000214.
 39. GIS. Rejestr produktów objętych powiadomieniem o pierwszym wprowadzeniu do obrotu Dostępne na: <https://powiadomienia.gis.gov.pl/> (udostępniono luty 14, 2023).
 40. United States Pharmacopeial Convention <2091> Weight variation of dietary supplement. W *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF 38)*; United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, USA, 2021.
 41. <2040> Disintegration and dissolution of dietary supplements. W *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF 38)*; United States Pharmacopeial Convention, 2021.
 42. <1216> Tablet friability. W *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF 38)*; United States Pharmacopeial Convention, 2021.
 43. <1217> Tablet breaking force. W *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF 38)*; United States Pharmacopeial Convention, 2021.
 44. Anselmo, C.D.S.; Mendes, T.C.; Cabral, L.M.; De Sousa, V.P. Physicochemical quality profiles of commercial oral tablets and capsulecontaining lutein – impact of insufficient specific sanitary regulations. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2018**, *90*, 3063–3073, doi:10.1590/0001-3765201820170972.
 45. FDA. Size, shape and other physical attributes of generic tablets and capsules Dostępne na: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.html> (udostępniono luty 3, 2023).
 46. Kelly, J.; D'Cruz, G.; Wright, D. Patients with dysphagia: Experiences of taking medication. *J. Adv. Nurs.* **2010**, *66*, 82–91, doi:10.1111/j.1365-2648.2009.05145.x.
 47. Channer, K.S.; Virjee, J.P. The effect of size and shape of tablets on their esophageal transit. *J. Clin. Pharmacol.* **1986**, *26*, 141–146, doi:10.1002/j.1552-4604.1986.tb02922.x.
 48. Brotherman, D.P.; Bayraktaroglu, T.O.; Garofalo, R.J. Comparison of ease of swallowing of dietary supplement products for age-related eye disease. *J. Am. Pharm. Assoc.* **2004**, *44*, 587–593, doi:10.1331/1544-3191.44.5.583.Brotherman.
 49. Vallet, T.; Michelon, H.; Orlu, M.; Jani, Y.; Leglise, P.; Laribe-Caget, S.; Piccoli, M.; Fur, A. Le; Liu, F.; Ruiz, F.; i in. Acceptability in the older population: The importance of an appropriate tablet size. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 1–11, doi:10.3390/pharmaceutics12080746.
 50. Kabeya, K.; Satoh, H.; Hori, S.; Miura, Y.; Sawada, Y. Threshold size of medical tablets and capsules: Based on information collected by Japanese medical wholesaler. *Patient Prefer. Adherence* **2020**, *14*, 1251–1258, doi:10.2147/PPA.S253663.
 51. Wruss, J.; Waldenberger, G.; Huemer, S.; Uygun, P.; Lanzerstorfer, P.; Müller, U.; Höglinger, O.; Weghuber, J. Compositional characteristics of commercial beetroot products and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria. *J. Food Compos. Anal.* **2015**, *42*, 46–55, doi:10.1016/j.jfca.2015.03.005.
 52. Guldiken, B.; Toydemir, G.; Nur Memis, K.; Okur, S.; Boyacioglu, D.; Capanoglu, E. Home-processed red beetroot (*Beta vulgaris* L.) products: Changes in antioxidant properties and bioaccessibility. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17060858.
 53. Alam, M.N.; Bristi, N.J.; Rafiquzzaman, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.* **2013**, *21*, 143–152, doi:10.1016/j.jsps.2012.05.002.
 54. Gulcin, İ. *Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview*; 2020; T. 94;

ISBN 0123456789.

55. Schlesier, K.; Harwat, M.; Böhm, V.; Bitsch, R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic. Res.* **2002**, *36*, 177–187, doi:10.1080/10715760290006411.
56. Lo Scalzo, R. Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid. *Food Chem.* **2008**, *107*, 40–43, doi:10.1016/j.foodchem.2007.07.070.
57. Webb, A.J.; Patel, N.; Loukogeorgakis, S.; Okorie, M.; Aboud, Z.; Misra, S.; Rashid, R.; Miall, P.; Deanfield, J.; Benjamin, N.; i in. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. *Hypertension* **2008**, *51*, 784–790, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.103523.
58. Lidder, S.; Webb, A.J. Vascular effects of dietary nitrate (as found in green leafy vegetables and beetroot) via the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2013**, *75*, 677–696, doi:10.1111/j.1365-2125.2012.04420.x.
59. Ghosh, S.M.; Kapil, V.; Fuentes-Calvo, I.; Bubb, K.J.; Pearl, V.; Milsom, A.B.; Khambata, R.; Maleki-Toyserkani, S.; Yousuf, M.; Benjamin, N.; i in. Enhanced vasodilator activity of nitrite in hypertension: Critical role for erythrocytic xanthine oxidoreductase and translational potential. *Hypertension* **2013**, *61*, 1091–1102, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00933.
60. Velmurugan, S.; Gan, J.M.; Rathod, K.S.; Khambata, R.S.; Ghosh, S.M.; Hartley, A.; Van Eijl, S.; Sagi-Kiss, V.; Chowdhury, T.A.; Curtis, M.; i in. Dietary nitrate improves vascular function in patients with hypercholesterolemia: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2016**, *103*, 25–38, doi:10.3945/ajcn.115.116244.
61. Kapil, V.; Khambata, R.S.; Robertson, A.; Caulfield, M.J.; Ahluwalia, A. Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients: A randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. *Hypertension* **2015**, *65*, 320–327, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04675.
62. Liu, Y.; Ma, X.Y.; Si, X.X.; Lai, W.F. Preparation, characterization, and properties of wampee seed antioxidant peptides-iron chelate. *J. Food Process. Preserv.* **2022**, *46*, 1–9, doi:10.1111/jfpp.16513.
63. Churio, O.; Pizarro, F.; Valenzuela, C. Preparation and characterization of iron-alginate beads with some types of iron used in supplementation and fortification strategies. *Food Hydrocoll.* **2018**, *74*, 1–10, doi:10.1016/j.foodhyd.2017.07.020.
64. Martínez-Navarrete, N.; Camacho, M.M.; Martínez-Lahuerta, J.; Martínez-Monzó, J.; Fito, P. Iron deficiency and iron fortified foods - A review. *Food Res. Int.* **2002**, *35*, 225–231, doi:10.1016/S0963-9969(01)00189-2.
65. Fernández-Lázaro, D.; Mielgo-Ayuso, J.; Martínez, A.C.; Seco-Calvo, J. Iron and physical activity: Bioavailability enhancers, properties of black pepper (bioperine®) and potential applications. *Nutrients* **2020**, *12*, 1–12, doi:10.3390/nu12061886.
66. Jarosz, M.; Rychlik, E.; Stoś, K.; Charzewska, J. *Normy żywienia dla populacji Polski i ich zastosowanie*; Jarosz, M., Rychlik, E., Stoś, K., Charzewska, J., Red.; Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny: Warszawa, 2020; ISBN 9788365870285.
67. Seiler, C. Healthy persons at risk for iron substitution. *Swiss Med. Wkly.* **2017**, *147*, 7–8, doi:10.4414/smw.2017.14452.
68. Wawrzyniak, A.; Przybyłowicz, K.; Wądołowska, L.; Charzewska, J.; Górecka, D.; Lange, E.; Other Members of the Human Nutrition Science Committee of the Polish Academy of Sciences Statement of the Committee of Human Nutrition Science of the Polish Academy of Sciences on the use of dietary supplements containing vitamins and minerals by adults. *Rocz. Państw. Zakł. Hig.* **2021**, *72*, 321–326, doi:10.32394/rpzh.2021.0168.
69. Europe Food Supplements. Setting of tolerances for nutrient values declared on a label. Guidance for food supplements. Dostępne na: <https://foodsupplementseurope.org/wp->

- content/themes/fse-theme/documents/publications-and-guidelines/fse-setting-of-tolerances-for-nutrient-values-declared-on-a-label.pdf (udostępniono luty 24, 2023).
70. The Commission of the European Communities. *Commission Regulation (EC) No 1181/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*; 2006; ss. 5–24;.
 71. The Commission of the European Communities. *Commission regulation (EC) No 629/2008 of 2 July 2008 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*; 2008; T. 3.7.2008;
 72. JECFA. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) on cadmium Dostępne na: <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/Home/Chemical/1376> (udostępniono luty 24, 2023).
 73. Seventy-second meeting of the Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) Mercury. W *Safety evaluation of certain food additives and contaminants*; World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Geneva, Rome, 2011; ss. 605–684.
 74. JECFA. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) on lead Dostępne na: <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/Home/Chemical/3511> (udostępniono luty 24, 2023).
 75. Seventy-second meeting of the Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) Arsenic. W *Safety evaluation of certain food additives and contaminants*; World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Geneva, Rome, 2011; ss. 153–316.
 76. Warren, G.P.; Alloway, B.J.; Lepp, N.W.; Singh, B.; Bochereau, F.J.M.; Penny, C. Field trials to assess the uptake of arsenic by vegetables from contaminated soils and soil remediation with iron oxides. *Sci. Total Environ.* **2003**, *311*, 19–33, doi:10.1016/S0048-9697(03)00096-2.
 77. Komisja Europejska. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 629/2008 z dnia 2 lipca 2008 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych. *Dz. Urzędowy Unii Eur.* **2008**, *L173*, 6–9.
 78. Mortensen, A.; Aguilar, F.; Crebelli, R.; Di Domenico, A.; Dusemund, B.; Frutos, M.J.; Galtier, P.; Gott, D.; Gundert-Remy, U.; Lambré, C.; i in. Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. *EFSA J.* **2017**, *15*, doi:10.2903/j.efsa.2017.4786.
 79. Keller, R.M.; Beaver, L.; Prater, M.C.; Hord, N.G. Dietary nitrate and nitrite concentrations in food patterns and dietary supplements. *Nutr. Today* **2020**, *55*, 218–226, doi:10.1097/NT.0000000000000253.
 80. Bondonno, C.P.; Zhong, L.; Bondonno, N.P.; Sim, M.; Blekkenhorst, L.C.; Liu, A.; Rajendra, A.; Pokharel, P.; Erichsen, D.W.; Neubauer, O.; i in. Nitrate: The Dr. Jekyll and Mr. Hyde of human health? *Trends Food Sci. Technol.* **2023**, *135*, 57–73, doi:10.1016/J.TIFS.2023.03.014.
 81. Kotopoulou, S.; Zampelas, A.; Magriplis, E. Dietary nitrate and nitrite and human health: a narrative review by intake source. *Nutr. Rev.* **2022**, *80*, 762–773, doi:10.1093/nutrit/nuab113.

Spis rycin

Rycina 1 Charakterystyka materiału badawczego oraz koncepcja badań.	18
Rycina 2 Oznakowanie suplementu diety [fragment oryginalnej ryciny z Publikacji D.2].	19
Rycina 3a Zróżnicowanie wielkości i kształtów jednostek dawkowania analizowanych suplementów.	
Rycina 3b Sposób wymiarowania jednostek dawkowania. Grafiki oryginalne z Publikacji D.3.	22
Rycina 4 Wykres ramkowy obrazujący TPC oznaczony metodą FC (a) i TAC oznaczony metodą CUPRAC (b), w rekomendowanej dziennej porcji suplementów diety i 100-gramowej porcji buraków. Na rycinie oznaczono wyniki porównania poszczególnych grup suplementów ze 100-gramową porcją buraka (test U Manna-Whitneya). Wykresy zostały przygotowane na podstawie danych zawartych w Publikacji D.4.	24
Rycina 5 Wykres ramkowy obrazujący zawartość azotanów(III) (a) i (V) (b) w rekomendowanej dziennej porcji suplementów diety i 100-gramowej porcji buraków. Na rycinie oznaczono wyniki porównania poszczególnych grup suplementów ze 100-gramową porcją buraka (test U Manna-Whitneya). Wykresy zostały przygotowane na podstawie danych zawartych w Publikacji D.4.	26
Rycina 6 Realizacja rekomendacji żywieniowych przez 100-gramową porcję buraka konwencjonalnego, organicznego oraz dzienną dawkę suplementów w tabletkach i kapsułkach wg rekomendacji producenta. Wykresy zostały przygotowane na podstawie danych opublikowanych w Publikacji D.5. Zn LOQ 0,96 mg/kg, Cu LOQ 0,21 mg/kg.	30
Rycina 7 Rozmieszczenie punktów w układzie współrzędnych czynnikowych F1-F2 odpowiadających poszczególnym próbkom buraków, suplementów diety wzbogaconych związkami żelaza i niewzbogaconych (a, c, e) oraz odpowiadających im ładunków czynnikowych dla poszczególnych pierwiastków (b, d, f). Ryciny oryginalne pochodzące z Publikacji D.4.	32
Rycina 8 Dendrogram dla badanych próbek buraków i suplementów diety (a, b) oraz różnych postaci suplementów diety (c, d). Ryciny oryginalne pochodzące z Publikacji D.4.	33
Rycina 9 Zawartość Cd w suplementach diety i próbkach buraka (a). Realizacja PTMI Cd w wyniku spożycia dziennej dawki suplementu lub 100 g buraków (b). Zawartość As w suplementach diety i próbkach buraka (c). Stosunek zawartości As w dziennej dawce suplementu lub 100 g warzywa do BMDL _{0,5} (d). Wykresy zostały przygotowane na podstawie danych opublikowanych w Publikacji D.5. DZs Cd – dopuszczalna zawartość Cd w suplementach [77], DZw Cd – dopuszczalna zawartość Cd w warzywach [77], m.c. – masa ciała, mies. - miesiąc.	35

Spis tabel

Tabela 1 Porównanie leków i suplementów diety [Publikacja D.1.].	13
Tabela 2 Wyniki oceny poprawności oznakowania wybranych suplementów diety i produktów żywnościowych (opracowanie na podstawie wyników zawartych w Publikacji D.4.).	19
Tabela 3 Zawartość pierwiastków w próbkach buraków i suplementach diety zawierających buraka (zmodyfikowane Tabele 4 i 5 z Publikacji D.5.).	29