

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI AKRYLOAMIDU W PRODUKTACH ZIEMNIACZANYCH METODĄ GC-MS/MS ORAZ LC-MS/MS

DETERMINATION OF ACRYLAMIDE CONTENT IN POTATO PRODUCTS USING GC-MS/MS AND LC-MS/MS METHODS

Hanna Mojska, Iwona Gielecińska, Katarzyna Małecka

Zakład Bezpieczeństwa Żywności, Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa

Słowa kluczowe: akryloamid, frytki smażone, chipsy ziemniaczane, GC-MS/MS, LC-MS/MS

Key words: acrylamide, French fries, potato crisps, GC-MS/MS, LC-MS/MS

STRESZCZENIE

Celem pracy było sprawdzenie przydatności technik GC-MS/MS i LC-MS/MS do oznaczania akryloamidu w żywności oraz oznaczenie zawartości akryloamidu w produktach ziemniaczanych, pobranych na terenie całego kraju w latach 2007-2008. W wyniku przeprowadzonej walidacji stwierdzono, że obydwie stosowane metody charakteryzowały się niską granicą oznaczalności oraz dobrą precyzją i dokładnością. Najwyższą przeciętną zawartość akryloamidu stwierdzono w chipsach ziemniaczanych – 770 µg/kg (113 ÷ 1890 µg/kg), najniższą natomiast frytki smażone pobrane z zakładów gastronomicznych – 401 µg/kg (134 ÷ 679 µg/kg). W roku 2008 oznaczone zawartości akryloamidu w chipsach i frytkach gotowych do spożycia były wyższe w porównaniu z rokiem 2007, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie. W przypadku frytek smażonych w laboratorium z mrożonych półproduktów stwierdzono istotne ($p < 0,05$) obniżenie zawartości akryloamidu w 2008r. w porównaniu z rokiem 2007.

ABSTRACT

The aim of our study was to check a usefulness of GC-MS/MS and LC-MS/MS methods to determination of acrylamide in foodstuffs and determined acrylamide content in potato products randomly collected in Poland in 2007-2008. As a result of validation of these methods we found the both using methods were characterized by low quantification limit and well precision. The highest acrylamide level was in potato crisps – 770 µg/kg (113 ÷ 1890 µg/kg), but the lowest – was in French fries collected from bars and restaurants – 401 µg/kg (134 ÷ 679 µg/kg). Acrylamide content analyzed in 2008 in potato crisp and French fries ready to eat was higher than in 2007. The difference was not statistically significant. In French fries fried in laboratory from pre-cooked French fries in 2008 acrylamide level was lower than in these products analyzed in 2007.

WSTĘP

Akryloamid powstaje w czasie termicznego przetwarzania żywności wysokowęglowodanowej jako jeden z produktów reakcji *Maillarda*, w reakcji pomiędzy wolną asparaginą i cukrami redukującymi (glukozą i fruktozą) [7]. Głównym jego źródłem w diecie są przede wszystkim produkty z ziemniaków, takie jak frytki i chipsy, a także przetwory zbożowe m. in. pieczywo, płatki śniadaniowe, ciastka i herbatniki, a także kawa palona. Ze względu na doniesienia o neurotoksycznym, genotoksycznym i kancerogennym działaniu akryloamidu, obecność tego związku w żywności może stanowić ryzyko dla zdrowia człowieka [1,

3, 4]. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem w 1994 r. sklasyfikowała akryloamid jako związek „prawdopodobnie rakotwórczy dla ludzi” (grupa 2A) [5].

Z uwagi na potencjalnie niekorzystne działanie akryloamidu na zdrowie ludzi Komisja Unii Europejskiej wydała zalecenie dotyczące monitorowania, we wszystkich krajach członkowskich, zawartości akryloamidu w wybranych grupach produktów spożywczych, w latach 2007–2009 (2007/331/WE), w celu uzyskania wiarygodnych danych na temat narażenia na ten związek z diety.

Z związku z powyższym istnieje potrzeba monitorowania zawartości akryloamidu w produktach żywnościowych przy zastosowaniu metod analitycznych charakteryzujących się niską granicą oznaczalności, a

Adres do korespondencji: Hanna Mojska, Zakład Bezpieczeństwa Żywności, Instytut Żywności i Żywienia, 02-903 Warszawa, ul. Powsińska 61/63, tel 0 22 55 09 656, fax: 0 22 55 09 887, e-mail: hmojska@izz.waw.pl

z drugiej strony umożliwiających szybkie uzyskanie miarodajnych wyników.

Celem pracy było sprawdzenie przydatności technik GCQ-MS/MS i LC-MS/MS do oznaczania akryloamidu w żywności oraz oznaczenie zawartości akryloamidu w produktach ziemniaczanych pobranych na terenie Polski w latach 2007-2008 w ramach monitoringu Unii Europejskiej.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły próbki produktów ziemniaczanych pobierane przez pracowników stacji sanitarno-epidemiologicznych na terenie całego kraju, w latach 2007-2008, w ramach badań monitoringowych prowadzonych zgodnie z zaleceniem Komisji Unii Europejskiej w sprawie monitorowania poziomów akryloamidu w żywności (2007/331/WE). Łącznie przebadano 63 próbki produktów ziemniaczanych, w tym:

- chipsy ziemniaczane – 21 próbek;
- frytki smażone gotowe do spożycia, pobrane z zakładów gastronomicznych – 21 próbek;
- frytki smażone we frytownicy w laboratorium z mrożonych półproduktów – 21 próbek.

Jedną próbkę chipsów oraz frytek (mrożonych półproduktów) stanowiły co najmniej dwa opakowania handlowe produktu pochodzące z tej samej partii produkcyjnej, natomiast próbkę frytek smażonych (gotowych do spożycia) – produkty w ilości nie mniejszej niż 1 kg.

Frytki smażone w laboratorium przygotowano zgodnie z instrukcją podaną przez producenta na etykiecie opakowania produktu. Z każdego rodzaju frytek przygotowano po 1 porcji (około 200 g) do smażenia we frytownicy. Do czasu wykonania analiz próbki frytek przechowywano w temperaturze około -22°C , a próbki chipsów w zamkniętych opakowaniach handlowych w temperaturze pokojowej, nie wyższej niż 20°C .

Przed rozpoczęciem analiz próbki rozdrabniano (frytki w stanie zamrożonym) za pomocą malaksera, a następnie młynka.

Zawartość akryloamidu oznaczono dwoma metodami według własnych procedur badawczych:

- produkty pobrane z rynku w 2007 r. – metodą chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (GCQ-MS/MS);
- produkty pobrane z rynku w 2008 r. – metodą wysokosprawną chromatografią cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS).

Metoda chromatografii gazowej – GCQ-MS/MS

Do 3 g próbki żywności dodawano 100 μl roztworu wzorcowego – akryloamidu deuterowanego (2,3,3- d_3 akryloamid, 98% z Cambridge izotop Laboratories Inc.;

$c = 100 \mu\text{g/ml}$). Próbkę ekstrahowano wodą destylowaną i n-heksanem (cz.d.a., min. 99% firmy POCh S.A., Gliwice), odwirowywano (10.000 obr/min, 10 min), usuwano warstwę heksanową, a warstwę wodną ogrzewano w łaźni wodnej (temp. $\sim 60^{\circ}\text{C}$, 2 h) i poddawano całkowitemu bromowaniu (KBrO_3 , cz.d.a., min. 99,5%, firmy Chempur, Piekary Śląskie; HBr , 48%, firmy Fluka Chemie GmbH; nasycony roztwór wody bromowej, $\text{Br} \sim 4\%$, firmy Chempur, Piekary Śląskie) w temp. $\sim 0^{\circ}\text{C}$. Nadmiar bromu zobojętniano 1 M roztworem tiosiarczanu sodu (cz.d.a., min. 99%, firmy POCh S.A., Gliwice), a następnie 2-krotnie ekstrahowano octanem etylu (HPLC, firmy POCh S.A., Gliwice). Po rozdzieleniu się warstw, każdorazowo pobierano warstwę organiczną i przenoszono do ampułki szklanej. Po odparowaniu do sucha pod azotem, do próbki dodawano octan etylu (HPLC, firmy POCh S.A., Gliwice) i przenoszono do wialek do autosamplera (ryc. 1).

Oznaczenie zawartości dibromowych pochodnych akryloamidu wykonano metodą chromatografii gazowej z wykorzystaniem aparatu GCQ firmy Finnigan Matt wyposażonego w detektor masowy z pułapką jonową oraz dozownik typu eksa/splitless. Próbkę w ilości 1 μl analizowano techniką MS/MS z wykorzystaniem EI (70 eV). Analizę zawartości akryloamidu prowadzono na kolumnie chromatograficznej (DB-35MS): dł. 30 m, $\text{sr. } 0,25 \text{ mm}$, film 0,25 μm . Pierwszym krokiem było uzyskanie jonu prekursora $m/z 152$ pochodzącego od dibromopochodnej akryloamidu oraz $m/z 155$ pochodzącego od dibromopochodnej akryloamidu deuterowanego, a następnie w wyniku kolizji MS/MS, uzyskiwano jony potomne: $m/z 152 \rightarrow m/z 135$ i $m/z 155 \rightarrow m/z 137$. Do obliczeń ilościowych użyto stosunek pola powierzchni pod pikiem pochodzącym od jonów $m/z 135$ i $m/z 137$. Warunki analizy chromatograficznej:

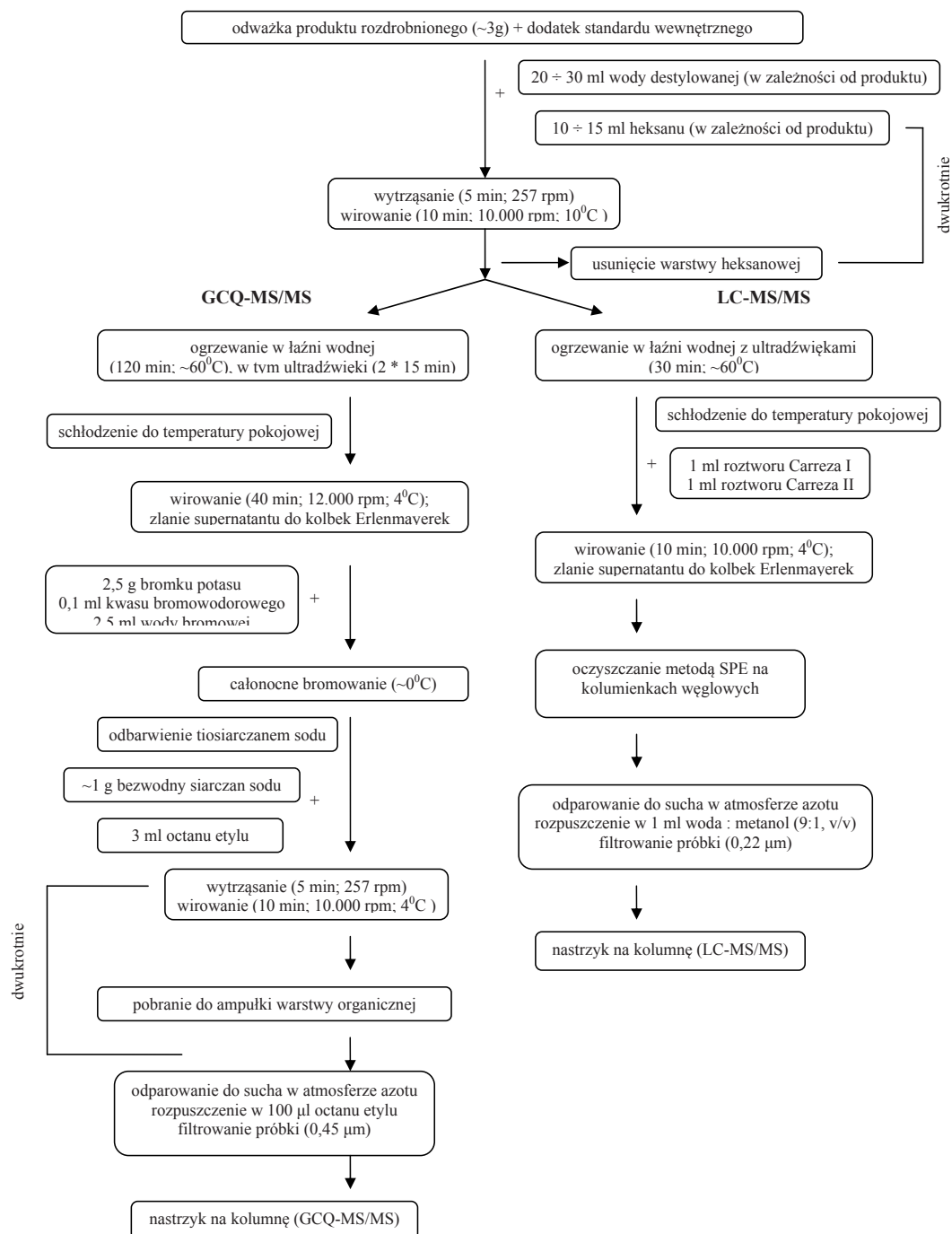
- gaz nośny: He, przepływ gazu stały: $40 \text{ cm}^3/\text{sek.}$,
- program temperaturowy pieca: temp. nastrzyku 65°C , wzrost temp. $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 250°C , czas analizy 23,33 min, linia transferowa: 250°C , temperatura źródła jonów: 180°C (2).

Wynik został przyjęty jako średnia z trzech równoległych oznaczeń.

Metoda chromatografii cieczowej – LC-MS/MS

Do 3 g próbki żywności dodano 600 μl roztworu wzorcowego – akryloamidu deuterowanego ($c = 200 \mu\text{g/L}$), a następnie próbkę ekstrahowano wodą destylowaną i n-heksanem, odwirowywano i usuwano warstwę heksanową podobnie jak w przypadku chromatografii gazowej.

Warstwę wodną ogrzewano w łaźni wodnej z ultradźwiękami (temp. $\sim 60^{\circ}\text{C}$, 30 min), a następnie dodawano roztwory Carreza I ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$; firmy POCh S.A., Gliwice) i Carreza II ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, firmy Sigma-Aldrich). Tak przygotowaną próbkę poddawano



Ryc. 1. Etapy oznaczania akryloamidu w żywności metodami: GCQ-MS/MS oraz LC-MS/MS
Stages of determination of acrylamide in food by GCQ-MS/MS and LC-MS/MS

oczyszczaniu metodą SPE wykorzystując kolumnki węglowe (Bakerbond Carbon). Zebrane po oczyszczeniu frakcje metanolowe odparowywano do sucha pod azotem, a następnie rozpuszczano w wodzie z metanolem (ryc. 1).

Oznaczenie zawartości akryloamidu wykonywano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem aparatu UltraMate 3000 firmy Dionex sprzężonego ze spektrometrem mas 3200 Qtrap firmy Applied Biosystems. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie HYPERCARB firmy Thermo Scientific: (150 x 2,1) mm, wielkość cząstki – 5 µm.

Warunki pracy chromatografu:

- skład fazy ruchomej – woda : metanol (9:1) z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego;
- przepływ – 0,35 mL/min;
- nastrzyk – 20 µL;
- czas analizy – 5 min.

Warunki pracy spektrometru MS/MS:

- technika MRM;
- temperatura źródła jonów – 600°C;
- gaz osłonowy – azot; CUR = 40;
- polaryzacja dodatnia;

- napięcie na kapilarze (IS) – 5000 V;
- pozostałe parametry dla poszczególnych badanych jonów podano w tabeli 1.

Tabela 1. Parametry spektrometru mas dla poszczególnych badanych jonów
Spectrometer mass parameters for researched ions

Badany związek	jony pierwotne [amu]	jony potomne [amu]	DP [V]	CE [V]	dwell time [msec]
akryloamid	72,1	55,2	26	14	150
	72,1	44,1	22	20	150
akryloamid deuterowany	75,1	58,1	24	16	150
	75,1	47,1	20	14	150

DP – różnica potencjałów pomiędzy kwadrupolem zerowym a wlotem do spektrometru;
CE – energia zderzeń.

Identyfikacja badanych związków została przeprowadzona na podstawie czasów ich retencji i widma masowego. Wynik został przyjęty jako średnia z dwóch równoległych oznaczeń.

Ocena statystyczna

Uzyskane wyniki badań obliczono za pomocą programu komputerowego Excel, a oceniono z wykorzystaniem pakietu statystycznego Statistica ver. 6.0 (Statsoft, Inc.).

WYNIKI I DYSKUSJA

Walidacja metod oznaczania akryloamidu

Walidacja obu metod została przeprowadzona zgodnie z procedurą walidacji PO-13 „Walidacja metod badawczych” obowiązującą w Laboratorium Referencyjnym Instytutu Żywności i Żywienia. Przy ocenie przydatności metody do oznaczania zawartości akryloamidu w żywności wyznaczono następujące parametry: zakres metody, granicę oznaczalności, precyzję, dokładność, współczynnik zmienności dla poszczególnych matryc i niepewność pomiaru.

Uzyskane wyniki walidacji obu metod przedstawiono w tabeli 2. Metody charakteryzują się szerokim zakresem oznaczalności, niską granicą oznaczalności poniżej 50 µg/kg, a także dobrą precyzją, gdyż współczynnik HORRAT ma wartość poniżej jedności. Dokładność metody GCQ-MS/MS sprawdzono przy użyciu certyfikowanego materiału odniesienia CRM ERM (BD 273 Toasted Bread; 425 ± 29 µg/kg) uzyskując odzysk średni na poziomie 96,5%. Potwierdzeniem biegłości analitycznej w zakresie obydwu metod były wyniki udziału w badaniach biegłości organizowanych przez FAPAS Food and Environment Research Agency (York, UK). Wykorzystywanie ww. metod pozwala na

realizację badań monitoringowych zawartości akryloamidu w żywności, prowadzonych w Polsce, podobnie jak w krajach Unii Europejskiej w latach 2007-2009, zgodnie z zaleceniem Komisji Nr 2007/331/WE.

Tabela 2. Wybrane parametry walidacji metod oznaczania akryloamidu w żywności (matryca – frytki smażone)
Selected method's validation parameters – analysis of acrylamide in food products (matrix: French fries)

Elementy walidacji	Metoda oznaczania	
	GCQ-MS/MS	LC-MS/MS
precyzja metody		
zawartość średnia – x [µg/kg]	155	356
rozrzut wyników [µg/kg]	150 ÷ 164	334 ÷ 373
odchylenie standardowe – SD [µg/kg]	5,0	16,2
współczynnik zmienności – RSD [%]	3,3	4,5
współczynnik HORRAT	0,16	0,24
zakres metody [µg/kg]	43 ÷ 3700* ¹	25 ÷ 3000* ² (ziemniaki)
granica oznaczalności – LOQ [µg/kg]	43 (płatki owsiane)	25 (ziemniaki)
badania biegłości (FAPAS) matryca: pieczywo chrupkie	PT 3015 z-score* = -1,5 (1179 µg/kg)	PT 3024 z-score* = -1,1 (271 µg/kg)
niepewność pomiaru [µg/kg]	± 36	± 43

*¹ wyznaczony na podstawie produktów o najniższej i najwyższej zawartości akryloamidu

*² wyznaczony na podstawie krzywej kalibracyjnej – gotowane ziemniaki wzbogacane akryloamidem w zakresie od 25 do 3000 µg/L (r = 0,9998)

*³ -2 < z-score < 2 – wynik satysfakcjonujący oznacza 95% prawdopodobieństwo, że wynik jest prawidłowy

Zawartość akryloamidu w produktach ziemniaczanych

Najwyższą przeciętną zawartość akryloamidu wśród wszystkich przebadanych produktów w latach 2007–2008, stwierdzono w chipsach ziemniaczanych – 770 µg/kg (113 do 1890 µg/kg) (tab. 3). Niewiele niższą zawartością, wynoszącą 740 µg/kg, charakteryzowały się frytki smażone w laboratorium z mrożonych półproduktów. Warto zwrócić uwagę, że w próbce produktu z tej grupy stwierdzono najwyższą zawartość akryloamidu (2175 µg/kg) ze wszystkich próbek przebadanych w latach 2007-2008.

We frytkach smażonych pobranych z barów i restauracji przeciętna zawartość badanego związku była blisko dwukrotnie niższa w porównaniu z frytkami smażonymi z mrożonych półproduktów i chipsami ziemniaczanymi. Stwierdzone różnice w zawartości akryloamidu pomiędzy dwoma badanymi grupami

Tabela 3. Zawartość akryloamidu w produktach ziemniaczanych losowo pobranych w Polsce w latach 2007-2008
The acrylamide content in potato products, randomly collected from Polish market in 2007 – 2008

Grupa produktów	Zawartość akryloamidu [$\mu\text{g}/\text{kg}$]					
	Ogółem (2007 – 2008)		2007 rok		2008 rok	
	$x \pm \text{SD}$	zakres	$x \pm \text{SD}$	zakres	$x \pm \text{SD}$	zakres
chipsy ziemniaczane	$770 \pm 488^{\text{ab}^*1}$	113 ÷ 1890	$581 \pm 521^{\text{ab}^*2}$	113 ÷ 1673	$865 \pm 460^{\text{a}^*2}$	320 ÷ 1890
frytki smażone (gastronomia)	$401 \pm 126^{\text{b}}$	134 ÷ 679	$334 \pm 126^{\text{a}}$	134 ÷ 518	$438 \pm 113^{\text{b}}$	235 ÷ 679
frytki smażone (laboratorium)	$740 \pm 515^{\text{a}}$	263 ÷ 2175	$1125 \pm 742^{\text{b}}$	347 ÷ 2175	$548 \pm 187^{\text{b}}$	263 ÷ 866

*¹ różnica istotna statystycznie ($p < 0,01$)

*² różnica istotna statystycznie ($p < 0,05$)

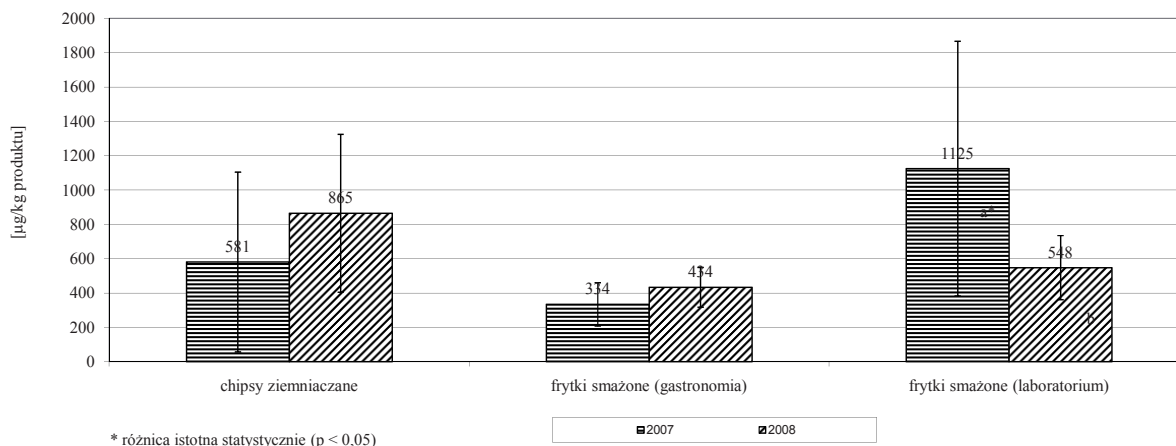
frytek mogą wynikać zarówno z różnic surowcowych (poziom asparaginy i cukrów redukujących), jak i innego sposobu smażenia w warunkach laboratoryjnych i w restauracjach oraz być może zastosowania obróbki wstępnej, np. moczenia i blanszowania surowych frytek. Z drugiej strony, jak wykazano we wcześniejszych badaniach [2], wstępne smażenie mrożonych półproduktów nie wpływało istotnie na zawartość akryloamidu w produkcie końcowych. Podobne wyniki do naszych stwierdzili *Pereschi* i wsp. [6] we frytkach smażonych w warunkach laboratoryjnych.

Porównując wyniki uzyskane w roku 2007 i 2008 w poszczególnych grupach produktów, należy stwierdzić, iż w przypadku chipsów ziemniaczanych i frytek smażonych pobranych w barach i restauracjach zawartość akryloamidu w tych dwóch grupach produktów była wyższa w 2008 r. w porównaniu z 2007 r., jednak stwierdzona różnica nie była istotna statycznie (ryc. 2). Natomiast frytki smażone w laboratorium z mrożonych półproduktów w 2008 r. charakteryzowały się ponad 2-krotnie niższą zawartością akryloamidu w porównaniu do tych samych rodzajów frytek pobranych w 2007 r. Różnica ta była istotna statystycznie ($p < 0,05$). Może to świadczyć o korzystnym zjawisku obniżania zawartości akryloamidu w produktach żywności-

wych na skutek podejmowanych przez producentów dobrowolnych działań opisanych w Toolbox'ie [8]. W przypadku frytek ziemniaczanych w postaci mrożonych półproduktów działania te polegają na stosowaniu różnych rodzajów obróbki wstępnej, m.in. moczenia w wodzie surowych frytek lub blanszowania.

WNIOSKI

1. Przeprowadzona walidacja potwierdziła przydatność technik badawczych GCQ-MS/MS i LC-MS/MS do oznaczania zawartości akryloamidu w żywności.
2. Obie metody charakteryzują się dobrą precyzją, a także dokładnością sprawdzoną przy użyciu certyfikowanego materiału odniesienia.
3. Zawartość akryloamidu w przebadanych w latach 2007-2008 produktach ziemniaczanych wahała się w zakresie od 113 do 2175 $\mu\text{g}/\text{kg}$.
4. Najwyższą przeciętną zawartość tej substancji stwierdzono we frytkach smażonych w laboratorium w 2007 r.
5. Pełną ocenę zmian w zawartości akryloamidu w produktach spożywczych będzie można przepro-



Ryc. 2. Porównanie średniej zawartości akryloamidu w produktach ziemniaczanych, pobranych na terenie Polski w latach 2007-2008 ($n = 63$)
Comparison of acrylamide content in potato products, randomly collected from Polish market in 2007 - 2008 ($n = 63$)

wadzić w 2010 r. po zakończeniu 3-letnich badań monitoringowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Bull R.J., Robinson M., Laurie R.D., Stoner G.D., Greisiger E., Meier J.R.J., Stober J.: Carcinogenic effects of acrylamide in Sencar and A/J mice. *Cancer Res.* 1984, 44, 107-111.
2. Gielecińska I., Mojska H.: Ocena zawartości akryloamidu we frytkach ziemniaczanych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2009, 42, 3, 486-490.
3. Granath F.N., Vaca C.E., Ehrenberg L.G., Tornqvist M.A.: Cancer risk estimation of genotoxic chemicals based on target dose and multiplicative model. *Risk Anal.* 1999, 19, 309-320.
4. HEATOX. Heat-generated food toxicants: identification, characterization and risk minimization. Final report. 2007. www.heatox.org
5. IARC. Some Industrial Chemicals. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France 1994. <http://www.iarc.fr/ENG/Databases/index.php>.
6. Pedreschi F., Kaack K., Granby K., Troncoso E.: Acrylamide reduction under different pre-treatments in French fries. *J. Food Engineering* 2007, 79, 1287-1294.
7. Stadler R.H., Scholz G.: Acrylamide. An update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation, and potential strategies of control. *Nutr. Rev.* 2004, 62, 449-467
8. The CIAA Acrylamide "Toolbox". http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/ciaa_acrylamide_toolbox.pdf

Otrzymano: 03.11.2009

Zaakceptowano do druku: 05.05.2010