

LC-MS/MS ile ambalajlanmış içme suyunda akrilamid tayini

Analysis of acrylamide in packaged drinking water by LC-MS/MS

Soner AĞÜN¹, İsmail SUNAR¹

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, ekstraksiyon yapmadan direkt enjeksiyon sıvı kromatografisi-üçlü dört kutuplu kütle spektrometresi (LC-MS/MS) cihazı ile 20 adet ambalajlanmış içme suyu örneğinde akrilamid analizi amaçlanmıştır.

Yöntem: İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan sulardan, 20 adet ambalajlanmış içme suyu kullanılarak ekstraksiyon yapmadan LC-MS/MS cihazına direkt enjeksiyonla 20 numunenin akrilamid analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz, bir turbo iyon sprej ara yüzü ile donatılmış bir üçlü dörtlü kütle analizörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yöntem; doğruluk, hassasiyet ve matris etkisi için doğrulanmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda, kullanılan metodun performansını göstermek amacıyla doğruluk, tespit ve tayin limiti, doğruluk, tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik ve geri kazanım parametreleri hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlik için % birleşik standart sapma değeri 3,291, tekrar üretilebilirlik için % birleşik standart sapma değeri 2,804 ve ortalama geri kazanım değeri %99,241 bulunmuştur. Kullanılan metod sayesinde 0,1 µg/L tayin limiti ile akrilamid

ABSTRACT

Objective: In this study, acrylamide analysis was aimed in 20 packaged drinking water samples with direct injection liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) device without extraction.

Methods: Acrylamide analysis of 20 samples was carried out by direct injection into LC-MS/MS device without extraction using 20 packaged drinking water from the waters with in the scope of the Regulation on Water for Human Consumption. The analysis was carried out using a triple quaternary mass analyzer equipped with a turbo ion spray interface. Method confirmed for linearity, precision and matrix effect.

Results: In our study, linearity, detection and determination limit, accuracy, repeatability, reproducibility and recovery parameters were calculated to demonstrate the performance of the method used. The combined pool RSD value of 3.291% forrepeatability, the combined pool RSD value of 2.804% forreproducibility and the average recovery value of 99.241%. Thanks to the method used, simultaneous analysis of the 0.1 µg/L determination

¹İSU Genel Müdürlüğü Çevre Koruma ve Kontrol Dairesi Başkanlığı Merkez Laboratuvarı, Kocaeli

İletişim / Corresponding Author : Soner AĞÜN

Serdar Mah. Salim Dervişoğlu Cad. No: 12 İzmit / Kocaeli - Türkiye

E-posta / E-mail : sonerakgun61@hotmail.com

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.76259

Ağün S, Sunar İ. LC-MS/MS ile ambalajlanmış içme suyunda akrilamid tayini. Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(EK4: Su ve Sağlık): 91-98

parametresinin eş zamanlı analizi gerçekleştirilmiştir.

Sonuç: Ülkeler geliştikçe sanayileşme artmakta ve buna bağlı olarak her geçen gün içme sularının karakteristik yapılarında da daha kompleks yapılar meydana gelmektedir. Gelişmişlik düzeyine bağlı olarak insanların daha temiz bir çevre yönünde duyarlılığı artmaktadır. Bu çalışma ile yapılan analizler sonucunda, uluslararası standartlarda yer alan Avrupa Birliği ve Çevre Koruma Ajansı tarafından belirlenen içme sularında akrilamid miktarının yönetmeliklerde sırasıyla belirtilmiş olan 0,1 µg/L ve 0,5 µg/L limit değerinin altında kaldığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda, ambalajlanmış sulara direkt enjeksiyonla ESI (+) (elektro sprey iyonizasyon pozitif) modunda LC-MS/MS cihazına direkt enjeksiyon ile akrilamid örneklerinin analizi yapılmıştır. Analiz edilen 20 adet ambalajlanmış içme suyu için metodun tayin limiti 2,114 ng/L olup, sekiz örnekte akrilamid tespit edilmiştir. Ambalajlanmış içme suyu örneklerinde akrilamid seviyesi 12,29 ng/L ile 35,31 ng/L arasında değiştiği belirlenmiştir. İçme suyu arıtımında, poliakrilamid kullanımı sonucu suda kalıntı olarak polimerin %5'i monomer çözülmüş halde kalır ve nihai suda akrilamid birikebilir. İçme suyu kalitesini arttırmak için su arıtım prosesinde sentetik polimer flokülantlar yerine doğal flokülantlar kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: LC-MS/MS, ambalajlanmış içme suyu, akrilamid, direkt enjeksiyon

limit and acrylamide parameter was performed.

Conclusion: As countries develop, industrialization increases and accordingly, more complex structures are formed in the characteristic structures of drinking water day by day. Depending on the level of development, people's sensitivity towards a cleaner environment increases. As a result of the analyzes made with this study, it was observed that the amount of acrylamide in the drinking water determined by the European Union and the Environmental Protection Agency, which is in the international standards, remained below the limit value of 0.1 µg/L and 0.5 µg/L respectively. In our study, the analysis of acrylamide samples was done by direct injection in packaged waters with direct injection to LC-MS/MS device in ESI (+)(electro spray ionization positive) mode. The determination limit of the method for 20 packaged potable water analyzed is 2.114 ng/L and acrylamide was detected in 8 samples. Acrylamide level in packaged drinking water samples ranged from 12.29 ng/L to 35.31 ng/L. As a result of the use of polyacrylamide in drinking water treatment, 5% of the polymer remains as dissolved in the water and acrylamide can accumulate in the final water. Instead of synthetic polymer flocculants, natural flocculants can be used in the water treatment process to improve drinking water quality.

Key Words: LC-MS/MS, packaged drinking water, acrylamide, direct enjection

GİRİŞ

Akrilamid (C₃H₅NO, 2-propenamid, Mw: 71,08 g/mol) ilk kez 1893 yılında kimyasal bir bileşik olarak Almanya'da Christian Moureau tarafından bulunmuştur (1). Şimdi esas olarak monomer için poliakrilamidleri ve bunun kopolimerlerini sentezlemek için kullanılmaktadır. Akrilamid

oluşurken, yüksek sıcaklıktaki pişirme sırasında Maillard reaksiyonu denilen bir süreç oluşur. Doğal olarak mevcut su, şeker ve aminoasitler bir gıda maddesinin karakteristik lezzetini, dokusunu, rengini ve kokusunu yaratmak için birleşirler. Bu süreç ayrıca akrilamid üretebilir. Akrilamid içme

suyu ve atık suyu arıtmak için ayrıca cevher ve kum madenciliğinde flokül olarak kullanılır (2,3). Akrlamid'in suda yüksek çözünürlüğü, akrilamid'in içme suyunda bulunmasına neden olur.

Avrupa Birliği (AB) sınıflandırma sistemine göre ise akrilamidin karsinojen, üreme sistemi ve mutajenler üzerinde toksik etkileri bulunmaktadır(4-6). Akrlamid genotoksik, karsinojenik, nörotoksik, üreme ve gelişim toksisitesi üzerine etkileri bulunmaktadır (7). Dünya Sağlık Örgüt'ü (WHO), içme suyunda maksimum akrilamid konsantrasyonu ile ilişkili olan kılavuz set değerinin 0,5 µg/L olduğunu belirtti (8-10). Ayrıca, insan tüketimine yönelik su için 0,1 µg/L olan kısıtlayıcı kalite gereksinim limitleri Avrupa Birliği'nde düzenlenmiş ve AB 98/83/EC İçme Suyu Yönetmeliğinde yer almaktadır (11). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmaların akrilamid'in sağlık üzerinde olumsuz bir etkisi olduğunu göstermiştir (12-17).

Bugüne kadar, akrilamid'in su içindeki analizi için çeşitli analitik yöntemler tipik olarak kromatografik (sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi) ayrılmasının ardından spektrofotometrik dedektör (UV dedektörü, diyot dizisi dedektörü, floresans dedektörü), elektron tutma dedektörünü içermektedir (ECD) (18-25). Yapılan çalışmalarda elde edilen akrilamid analizlerinin çoğu, türevlendirme veya türevlendirme olmadan yapılmıştır (18-20). Akrlamid analizi için sıvı kromatografisinin kullanılması, genellikle zahmetli olan ve değişken verimlerle sonuçlanan türevlendirme adımlarını önlemenin başka bir yoludur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyisel çalışmalarda analitik cihaz olarak Agilent 6470 sıvı kromatografisi-üçlü dört kutuplu kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılmıştır. Cihaz kontrolü, veri toplama, nitel ve nicel veri analizi Agilent MassHunter yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

Reaktif ve kimyasallar;

- 1) Merck marka yüksek saflıkta (%95'lik) metanol
- 2) Merck marka suprapur saflıkta (%98-100) formik asit
- 3) Dr. Ehrenstrofer Akrlamid, standart (%99,3'lük)
- 4) Ultra saf su
- 5) 1 µL ile 1000 µL arası otomatik pipet
- 6) 10 mL'lik balon jojeler 6 adet

Ambalajlanmış içme suyu numunelerinin hazırlanması

Çalışma kapsamında Kocaeli bölgesinde marketlerden 20 adet ambalajlanmış içme suyu numuneleri alınmıştır. Numuneler analizi yapılana kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Ambalajlanmış içme suyu numunelerinin analizi

Ambalajlanmış içme suyu numuneleri analiz kapsamında yapılan çalışmalarda, laboratuvar içi metot esas alınarak, farklı konsantrasyonlardaki sertifikalı referans malzeme (CRM) ile gerekli analitiksel hesaplamalar yapılarak 10 mL'lik hacimli balon joje içerisine uygun bir çözücü (genellikle metanol) ile çözülerek 100 µg/L olacak şekilde ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Çözelti tekrardan kullanılmak üzere -18 °C'de saklanmıştır.

Hazırlanan ara stok çözeltisinden farklı konsantrasyonlara sahip beş noktalı kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Kalibrasyon noktaları; 0,01 µg/L, 0,025 µg/L, 0,05 µg/L, 0,1 µg/L, 0,15 µg/L olacak şekilde hazırlanmıştır.

Ambalajlı içme suları çalkalanıp homojen hale getirildikten sonra, ön işlem yapmadan 0,2 µm'lik PTFE (politetrafloroetilen) filtreden süzölmüştür. Viallere yerleştirildikten sonra LC-MS/MS cihazına enjekte edilmiştir. Kromatografik çalışma koşulları Tablo 1 ve MS parametreleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Kromatografik koşullar

Parametre	Ayarlar
Analitik kolon	InfinityLab Poroshell SB-AQ, 4,6x100 mm, 2,7 µm
Kolon sıcaklığı	20 °C
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Analiz süresi	3 dk
Oto örnekleyici sıcaklığı	5±2 °C
Mobil faz A	Suda çözünmüş %1'lik formik asit
Mobil faz B	-
İğne yıkama süresi	10 sn

Tablo 2. MS parametreleri

Parametre	Ayarlar
MS yöntemi	Çoklu reaksiyon modu
İyon kaynağı çeşidi	Agilent Jet Stream ESI
Kurulama gaz sıcaklığı	350 °C
Kurulama gaz akışı	11 L/dk
Nebulizatör	60 psi
Kaplama gaz sıcaklığı	400 °C
Kaplama gaz akışı	11 L/dk
Kapiler	3000 V

Verifikasyon Çalışmaları

Metodun performansını test etmek için doğrusalılık, tespit limiti ve -tayin limiti, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik, geri kazanım çalışmaları yapılmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Doğrusallık çalışması için analizi yapılan akrilamid metanol içerisinde karışım çözeltisi hazırlanmış ve standart referans

madde olarak kullanılmıştır. Ana stok standardın konsantrasyonu 1 mg/L'dir. Stok çözeltilerden 100 µg/L ve 250 µg/L ara çözeltiler elde edilmiştir. Kalibrasyon standartlarını hazırlamak için 1-2,5-5-10-15 µg/L konsantrasyonlarında metanolde çalışma çözeltileri ve kalibrasyon standartları da 0-10-25-50-100-150 ng/L olarak matriste hazırlanmıştır.

Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ): Akrilamid'in tespit ve tayin limitini belirlemek için 10 ng/L konsantrasyonunda hazırlanan standart çözelti 10 defa cihaza verilmiş ve bulunan değerlerin standart sapması hesaplanmıştır. Tespit limiti standart sapma 3 ile çarpılarak, tayin limiti ise standart sapma 10 ile çarpılarak belirlenmiştir.

Tekrarlanabilirlik ve Tekrar üretilebilirlik: Kesinlik değerini hesaplamak için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik çalışmalarında, iki analist tarafından aynı laboratuarda, aynı cihazla ve aynı gün yedi bağımsız çalışma yapılarak, analiz sonuçlarının birbirlerine yakınlığı değerlendirilmiştir. Tekrar üretilebilirlik çalışmaları için iki analist tarafından düşük (10 ng/L) ve yüksek (150 ng/L) olmak üzere iki farklı konsantrasyonda aynı laboratuarda, aynı cihazla ve farklı günlerde yedi bağımsız çalışma yapılarak rastgele hata hesaplanmıştır.

Ölçülen değerle gerçek değerlerin yakınlığını gösteren doğruluk parametresi, geri kazanım çalışmalarıyla ortaya konmuştur. Bu çalışmada,

geri kazanımı belirlemek için kör su örneğine 50 ng/L olacak şekilde analiz edilen akrilamid karışım standardı eklenerek çalışılmıştır.

BULGULAR

Yapılan tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarında, elde edilen ortak bağıl standart sapma (RSD) değerleri %3,291 ve %2,804 olarak bulunmuştur. Geri kazanım değerlerinin ortalaması alınarak metodun geri kazanım değerleri %99,241 olarak belirtildi. Analitik yöntemlerin duyarlılığını belirlemek için tespit ve tayin limiti varyasyonları 2,114 ng/L - 9,945 ng/L bulundu.

Çeşitli ambalajlanmış içme suyu örneklerinde akrilamid içeriği Tablo 3'de belirtildi. İçme suyu örneklerinde akrilamid seviyesi 12,29 ng/L ile 35,31 ng/L arasında değişmekteydi. Halen çalışılan içme suyunda tespit edilen akrilamid konsantrasyonları Avrupa Birliği ve Çevre Koruma Ajansı'nın gerektirdiği 0,1 µg/L ve 0,5 µg/L limitlerinin çok altındaydı.

Tablo 3. Ambalajlanmış içme suyundaki akrilamid içeriği

Ambalajlanmış içme suyu	Akrilamid içeriği (ng/L)
1	12,92
2	19,62
3	35,31
4	17,76
5	19,16
6	25,24
7	12,29
8	16,89

TARTIŞMA

Akrilamid oluşumları yıllardır bilinmesine rağmen günümüze kadar yapılan çalışmaların birçoğu yerel ve laboratuvar değerlendirmelerine dayanmaktadır.

Kocaeli bölgesinde belirlenmiş marketlerden toplanan 20 adet ambalajlanmış içme suyu numuneleri üzerinde akrilamid'in miktarsal tayinleri analiz edilmiştir. Elde edilen çalışma sonuçları, çevre koşulları ve insan sağlığını olumsuz etkilemeyecek derecede değerler kaydedildi.

Yapılan farklı çalışmalarda, tespit limiti değerleri 1-200 ng/L aralığında bulunmuştur (18,20-26).

Backe ve ark. (24), katı-faz ekstraksiyon ve HPLC-MS/MS (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi) tarafından bildirilen tayin limiti sınırları 20-21 ng/L olmuştur. Yamini ve ark. (22), tarafından bildirilen katı-faz ekstraksiyon GC-MS (Gaz Kromatografisi) ile yapılan analizlerde tayin sınırı 17 ng/L olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda elde edilen tespit ve tayin değerleri sırasıyla 2,114 ng/L - 9,945 ng/L olup bulunmuş ve yapılan çalışmalardaki tespit edilen değer aralığı içinde bulunduğu; raporlama limitlerini de karşıladığı görülmüştür. ABD Çevre Koruma Ajansı ve Avrupa Birliği içme suyunda akrilamid referans limit değeri sırasıyla 0,5 µg/L ve 0,1 µg/L belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet Koby'a, Serap Laçın'e, İSU Merkez Laboratuvar'ına, Sem Laboratuvar Cihazları A.Ş. ve Spektrum Lab Yazılım Firması'na teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Kısabay A, Korkmaz T, Çakıroğlu E, Selçuki D. Kısa süreli akrilamid maruziyeti sonucu gelişmiş toksik polinoropati olgusu. *CausaPedia*, 2004; 3:701-2.
2. Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J Agric Food Chem*, 2003; 51(16):4504-26.
3. <https://www.anthrosources.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cuag.12003>, (2013).
4. Friedman M, Mothram D. Chemistry and Safety of Acrylamide in Food. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. USA: Springer. 2005.
5. Ruden C. Acrylamide and cancer risk-expert risk assessments and the public debate. *Food Chem Toxicol*, 2004; 42:335-49.
6. Zhi-Rong L, Zou HC, Park D, Shi L, Oh SH, Park YD. The effects of acrylamide on brain creatine kinase: Inhibition kinetics and computational docking simulation. *Int J Biol Macromol*, 2009; 44:128-32.
7. Abramsson-Zetterberg L, Vikstrom AC, Törnquist M, Hellenas KE. Differences in the frequency of micronucleate erythrocytes in humans in relation to consumption of fried carbohydrate-rich food. *Mutat Res*, 2008; 653:50-6.
8. Acrylamide Health And Safety Guide. Health And Safety Guide. No:45. Geneva: World Health Organization. 1991.
9. Guidelines For Drinking Water Quality Recommendations. Geneva: World Health Organization. Vol. 1, 2. 1993.
10. Acrylamide In Drinking-Water Background Document For Development of WHO Guidelines For Drinking Water Quality. Geneva: World Health Organization. 2011.
11. Council Directive 98/83/EC. Quality of Water Intended For Human Consumption. 3 November 1998.
12. Johnson KA, Gorzinski SJ, Bodner KM, Campell RA, Wolf CH, Friedman MA, et al. Chronic toxicity and on cogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1986; 85(2):154-68.
13. Alison RH, Capen CC, Prentice DE. Neoplastic lesions of questionable significance to humans. *Toxicol Pathol*, 1994; 22(2):179-86.
14. Neumann F. Early indicators for carcinogenesis in sex-hormone sensitive organs. *Mutat Res*, 1991; 248(2):341-56.
15. Beland FA, Mellick PW, Olson GR, Mendoza MC, Marques MM, Doerge DR. Carcinogenicity of acrylamide in B6C3F (1) mice and F344/Nrats from a 2-year drinking water exposure. *Food Chem Toxicol*, 2013; 51:149-59.
16. Friedman MA, Dulak LH, Stedham MA. A lifetime on cogenicity study in rats with acrylamide. *Fundam Appl Toxicol*, 1995; 27(1):95-105.
17. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans. *Endocr Rev*, 2008; 29:1-41.
18. Cavalli S, Polesello S, Saccani G. Determination of acrylamide in drinking water by large volume direct injection and ion-exclusion chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2004; 1039 (1-2):155-9.
19. Güven KC, Gezgin T. Determination of acetonitrile and detection of acrylamide in seawater by GCMS. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 2005; 47:15-20.
20. Alpmann A, Morlock G. Rapid and sensitive determination of acrylamide in drinking water by planar chromatography and fluorescence detection after derivatization with dansulfonic acid. *J Sep Sci*, 2008; 31:71-7.

21. Kepekci TS, Önal C, Önal A. A review of current methods for the determination of acrylamide in food products. *Food Anal Methods*, 2012; 5(1):29-39.
22. Yamini Y, Ghambarian M, Esrafilı A, Yazdanfar N, Moradi M. Rapid determination of ultratrace amounts of acrylamide contaminants in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-electron capture detector. *Int J Environ Anal Chem*, 2012; 92:1493-505.
23. Lim H, Shin H. Ultra-trace level determinations of acrylamide in surface and drinking water by GC-MS after derivatization with xanthidrol. *J Sep Sci*, 2013; 36(18):3059-66.
24. Backe WJ, Yingling V, Johnson T. The determination of acrylamide in environmental and drinking waters by large-volume injection hydrophilic- interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2014; 1334:72-8.
25. Sobhi HR, Ghambarian M, Behbahani M, Esrafilı A. Application of modified hollow fiber liquid phase microextraction in conjunction with chromatography-electron capture detection for quantification of acrylamide in wastewater samples at ultra-trace levels. *J Chromatogr A*, 2017; 1487:30-35.
26. Agilent Technologies Inc. 5994-0820 EN. Quantification of Acrylamide in a Variety of Food Matrices by LC/MS/MS Triple Quadrupole, 2019.