



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πτυχιακή Μελέτη

Κρεμμύδα Λευκοθέα Στέλλα

**Εκτίμηση της συγκέντρωσης της επικίνδυνης ουσίας ακρυλαμίδιο σε
τηγανιτές πατάτες υπό διαφορετικές συνθήκες τηγανίσματος**



Τριμελής Επιτροπή:

Γεώργιος Μπόσκου, Λέκτορας (Επιβλέπων)

Αντωνία Χίου, Λέκτορας

Αναστασία Μυλωνά, Επιστημονικός Συνεργάτης

Ανδρικόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής

Αθήνα, Ιούνιος 2005

Ο συγγραφέας και ο επιβλέπων της πτυχιακής διατριβής αυτής επιτρέπουν τη μελέτη και αντιγραφή του περιεχομένου της μόνο σε προσωπικό επίπεδο. Κάθε άλλη χρήση περιορίζεται από το δικαίωμα της πνευματικής ιδιοκτησίας και την υποχρέωση να γίνεται αναφορά της πηγής όταν παραθέτονται αποσπάσματα της διατριβής αυτής.

Αυθεντικά αντίγραφα φέρουν την υπογραφή του συγγραφέα και του επιβλέποντος

Ο συγγραφέας

Ο επιβλέπων

Στο μικρό μου αδελφό, Μιχαήλ Άγγελο...

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη με τίτλο «Εκτίμηση της συγκέντρωσης της επικίνδυνης ουσίας ακρυλαμίδιο σε τηγανιτές πατάτες υπό διαφορετικές συνθήκες τηγανίσματος», μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών συνθηκών τηγανίσματος στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου σε τηγανιτές πατάτες. Οι τηγανιτές πατάτες είναι ένα ευρέως διαδεδομένο τρόφιμο και ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου που έχει παρατηρηθεί κατά το τηγάνισμα αποτελεί έναν πιθανό κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου. Υπάρχουν λίγες έρευνες που να ελέγχουν την επίδραση της ποιότητας και του είδους του ελαίου στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Παράλληλα, δεν υπάρχουν μελέτες που να εξετάζουν την επίδραση του τρόπου τηγανίσματος στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου.

Στόχοι της μελέτης ήταν να ανιχνευτεί και να ποσοτικοποιηθεί το ακρυλαμίδιο στις τηγανιτές πατάτες καθώς και να προσδιοριστεί η επίδραση συγκεκριμένων παραμέτρων στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν το είδος του ελαίου τηγανίσματος, ο αριθμός των τηγανισμάτων στο ίδιο έλαιο και ο τρόπος τηγανίσματος. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά είδη ελαίου (ελαιόλαδο και Bonfrito) και δύο διαφορετικοί τρόποι τηγανίσματος (βαθύ και ρηχό). Για κάθε είδος ελαίου και τρόπο τηγανίσματος, το έλαιο χρησιμοποιήθηκε για 8 διαδοχικά τηγανίσματα οδηγώντας έτσι σε υποβάθμιση του.

Η πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε από τη φοιτήτρια Κρεμμύδα Λευκοθέα Στέλλα στα πλαίσια του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Τμήματος Επιστήμης Δαιτολογίας – Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου. Το πειραματικό μέρος της μελέτης διεκπεραιώθηκε στο Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας και Φυσικοχημείας Τροφίμων κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2004-2005 υπό την επίβλεψη του Λέκτορα κ. Γεωργίου Μπόσκου. Στη τριμελή επιτροπή συμμετείχαν η Λέκτορας κ. Αντωνία Χίου και η Δρ. Αναστασία Μυλωνά.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον Λέκτορα κ. Γεώργιο Μπόσκου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση αυτού του πολύ ενδιαφέροντος θέματος καθώς και για την καθοδήγησή του και τις χρήσιμες συμβουλές που μου προσέφερε κατά την διάρκεια της εργασίας μου.

Θεωρώ απαραίτητο να ευχαριστήσω θερμά την Λέκτορα κα Αντωνία Χίου για την υπομονή και την επιμονή της κατά την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους και τη

διόρθωση του θεωρητικού μέρους της παρούσας πτυχιακής μελέτης. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την εύρεση μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού του ακρυλαμιδίου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Αναστασία Μυλωνά για το ενδιαφέρον που έδειξε στη διόρθωση του θεωρητικού μέρους καθώς και την εξασφάλιση συνεργασίας με τον Όμιλο Εταιριών “Veterin A.B.E.E.”.

Παράλληλα, ευχαριστώ την κα Βάλια Γεωργίου και τον Όμιλο Εταιρειών “Veterin A.B.E.E.” (κτηνιατρικά προϊόντα) για την ευγενική τους συνεργασία με σκοπό τη λήψη των φασμάτων LC-MS.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Υποψήφια Διδάκτορα κα Φωτεινή Σάλτα, χωρίς τη βοήθεια και τις συμβουλές της οποίας δεν θα ήταν δυνατή η πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στην κα Μαργαρίτα Χρηστέα για την τεχνική υποστήριξη του εργαστηρίου, τις συμβουλές και τις εύστοχες υποδείξεις της ως προς τη χρησιμοποίηση του εργαστηριακού εξοπλισμού.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Βάιο Καραθάνο για την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μελέτης.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Φώτη και Ελισάβετ, και τα αδέρφια μου, Γεράσιμο και Μιχαήλ-Άγγελο, για την υπομονή και τη συμπαράστασή τους.

Τέλος, ευχαριστώ τους φίλους μου Ιωάννα Μπέη, Ντίνο Βασιλειάδη, Γιώτα Κεχαγίογλου, Ιωάννα Γουσέτη και Εύη Ζουμπούλη για την αγάπη και την κατανόηση τους.

Κρεμμύδα Λευκοθέα Στέλλα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ακρυλαμίδιο, μία νευροτοξική και πιθανώς καρκινογόνος ουσία για τον άνθρωπο, σχηματίζεται κατά τη θερμική επεξεργασία αμυλούχων κυρίως τροφίμων. Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη, εκτιμήθηκε η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου σε δείγματα πατάτας τηγανισμένης σε δύο διαφορετικά έλαια (Bonfrito και ελαιόλαδο) και με δύο διαφορετικούς τρόπους τηγανίσματος (βαθύ και ρηχό). Για κάθε έλαιο και τρόπο τηγανίσματος, πραγματοποιήθηκαν 8 διαδοχικά τηγανίσματα στο ίδιο έλαιο, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση του ελαίου. Η θερμοκρασία και η διάρκεια τηγανίσματος διατηρήθηκαν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια των τηγανισμάτων (170°C, 8 min). Με αυτόν τον τρόπο εξετάστηκε η επίδραση τριών παραγόντων (είδος ελαίου, αριθμός τηγανισμάτων και τρόπος τηγανίσματος) στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Τα δείγματα τηγανιτής πατάτας εκχυλίστηκαν με διάφορες μεθόδους για την παραλαβή του ακρυλαμιδίου. Ως μέθοδος εκχύλισης επιλέχθηκε η εκχύλιση με νερό. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου στα εκχυλίσματα τηγανιτής πατάτας χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού σειράς φωτοδιοδίων (HPLC-DAD). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή φάσματος μάζας (HPLC-MSD) για την επιβεβαίωση της παρουσίας του ακρυλαμιδίου στο εκχύλισμα τηγανιτής πατάτας, κατά την οποία διαπιστώθηκε η ύπαρξη προσμίξεων στο δείγμα. Τα κλάσματα με χρόνο κατακράτησης αυτό του ακρυλαμιδίου που προέκυψαν από την HPLC-DAD, συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν, για τον διαχωρισμό του ακρυλαμιδίου από τις προσμίξεις καθώς και για την ποσοτικοποίησή του με δεύτερη χρωματογραφική στήλη ανάλυσης. Με αυτή τη μέθοδο, επιτεύχθηκε εκλεκτικός διαχωρισμός του ακρυλαμιδίου. Οι συγκεντρώσεις του ακρυλαμιδίου που προσδιορίστηκαν κυμαίνονταν μεταξύ 11-411 $\mu\text{g/Kg}$. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το είδος του ελαίου τηγανίσματος και ο αριθμός τηγανισμάτων στο ίδιο έλαιο δεν επιδρούν στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου, παρά μόνο σε ακραίες εφαρμογές τηγανίσματος. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στις βαθέως τηγανισμένες πατάτες ήταν υψηλότερη από εκείνη στις ρηχά τηγανισμένες πατάτες. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την επαλήθευση αυτού του ευρήματος.

ABSTRACT

Acrylamide, a neurotoxin and a probable human carcinogen, is formed during thermal treatment mostly of starchy food. In the present thesis research, the concentration of acrylamide was determined in potato samples fried in two different frying oil types (Bonfrito and olive oil) and with two different ways of frying (deep and shallow frying). For each oil type and way of frying, the same oil was used for 8 sequential fryings, resulting in oil degradation. The temperature and duration of frying were the same in all frying procedures (170°C, 8 min). In this way, the effect of three factors (oil type, number of fryings and way of frying) on the formation of acrylamide was examined. Various methods of extraction were examined in order to extract acrylamide. Extraction of acrylamide with water was considered to be the best and was finally chosen to extract acrylamide. High pressure liquid chromatography with ultraviolet-visible diod array detector (HPLC-DAD) was used to determine the concentration of acrylamide in the fried potato extracts. In addition, liquid chromatography with mass spectrometry detector (HPLC-MSD) was used to verify the presence of acrylamide in the fried potato extract, during which the presence of interference compounds was discovered. The fragments, collected from HPLC-DAD, with the same retention time as that of the standard acrylamide were analyzed with a different column of analysis for the separation and quantification of acrylamide. Through this method, satisfying acrylamide separation was achieved. The concentration of acrylamide in fried potatoes varied between 11-411 µg/Kg. According to the results, oil type and number of fryings in the same oil do not affect the formation of acrylamide, but for extreme frying procedures. On the contrary, significant difference was observed in potato samples fried in a different way, as the concentration of acrylamide in deep-fried potatoes was significantly higher than that in shallow-fried potatoes. Further research is required for the verification of this finding.

Περιεχόμενα

	Σελίδα
Κεφάλαιο 1° Τα τηγανιτά τρόφιμα	1
1.1 Γενικά για το τηγάνισμα	1
1.2 Φυσικές και χημικές μεταβολές στο τρόφιμο και το έλαιο κατά το τηγάνισμα	3
1.2.1 Εισαγωγή	3
1.2.2 Φυσικές μεταβολές	5
I) Μεταφορά μάζας και θερμότητας μεταξύ του τροφίμου και του ελαίου ή του λίπους τηγανίσματος	6
II) Βασικές μεταβολές που συμβαίνουν στο τρόφιμο: Πρόσληψη λίπους και απώλεια ύδατος	6
III) Παράγοντες που επηρεάζουν την πρόσληψη λίπους και την απώλεια ύδατος από το τρόφιμο στο τηγάνισμα	8
IV) Σύγκριση της σύνθεσης των τηγανισμένων ελαίων και των ελαίων που απορροφώνται από το τηγανισμένο τρόφιμο	10
V) Μεταφορά συστατικών από το τρόφιμο στο έλαιο τηγανίσματος	11
1.2.3 Χημικές μεταβολές και αντιδράσεις	12
I) Υδρόλυση	13
II) Θερμική Οξειδωση	14
III) Πολυμερισμός	16
IV) Ισομερισμός	18
V) Προϊόντα αποικοδόμησης	19
A) Πτητικά προϊόντα αποικοδόμησης	20
B) Μη πτητικά προϊόντα αποικοδόμησης	21
1.2.4 Άλλες μεταβολές και αντιδράσεις	22
I) Αντιδράσεις μη ενζυμικής αμαύρωσης	22
A) Αντίδραση <i>Maillard</i>	22
B) Καραμελοποίηση	24
II) Αλλαγή χρώματος	25
III) Μετουσίωση πρωτεϊνών	26
IV) Υδρόλυση κολλαγόνου και ζελατινοποίηση	27
V) Αλλαγή της οσμής	27

VI) Ελάττωση των βιταμινών	29
VII) Αλλαγή των ιδιοτήτων του τροφίμου ως προς την πέψη	29
VIII) Καταστροφή του λιπώδους ιστού	29
1.2.5 Συμπεράσματα	29
1.3 Μέθοδοι ελέγχου της ποιότητας των τηγανισμένων ελαίων	30
1.3.1 Παραδοσιακές και τυποποιημένες μέθοδοι	30
1.3.2 Ταχείες δοκιμασίες	32
1.3.3 Οργανοληπτική δοκιμασία	33
1.3.4 Ολικά πολικά συστατικά (TPM)	33
1.3.5 Πολυμερισμένα τριγλυκερίδια (PT)	34
1.3.6 Πρόβλεψη της σταθερότητας του ελαίου τηγανίσματος	34
1.3.7 Κριτήρια που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των τηγανισμένων ελαίων	34
1.4 Επικίνδυνες ουσίες που παράγονται κατά το τηγάνισμα	35
Κεφάλαιο 2^ο Το ακρυλαμίδιο	38
2.1 Γενικά για το ακρυλαμίδιο	38
2.2 Κίνδυνοι που προκύπτουν από τη διαιτητική πρόσληψη του ακρυλαμιδίου στον άνθρωπο και τα πειραματόζωα	39
2.2.1 Εισαγωγικά	39
2.2.2 Χρήσιμη ορολογία	41
2.2.3 Νευροτοξικότητα	41
2.2.4 Βλάβες στο αναπαραγωγικό σύστημα και τη γονιμότητα	42
2.2.5 Γονιδιοτοξικότητα	44
2.2.6 Καρκινογένεση	44
2.2.7 Μελέτες σε ανθρώπους	46
2.2.8 Σημαντικά στοιχεία που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την αξιολόγηση των επιπτώσεων του ακρυλαμιδίου στην υγεία του ανθρώπου.	47
2.3 Μηχανισμός σχηματισμού του ακρυλαμιδίου κατά το μαγείρεμα των τροφίμων	47
2.4 Τεχνικές/ μέθοδοι ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα	52
2.4.1 Ανασκόπηση των μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί	52
2.4.2 Ανάλυση με Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)	54

I) Αέρια χρωματογραφία χωρίς παραγωγοποίηση του ακρυλαμιδίου	54
A) Αεριοχρωματογραφική ανάλυση του ακρυλαμιδίου	54
B) Παραλαβή του ακρυλαμιδίου από τα τρόφιμα για την ανάλυση με αεριοχρωματογραφία	55
II) Αέρια χρωματογραφία με δημιουργία διβρωμου παραγώγου του ακρυλαμιδίου	56
A) Γενικά για την παραγωγοποίηση	56
B) Διαχωρισμός και ποσοτικός προσδιορισμός του ακρυλαμιδίου.	57
Γ) Καθαρισμός του παραγώγου	57
2.4.3 Ανάλυση με Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)	60
A) Εκχύλιση	60
B) Καθαρισμός	61
Γ) Διαχωρισμός	62
Δ) Ανιχνευτές	63
2.5 Παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό και τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα	67
2.5.1 Θερμοκρασία και διάρκεια τηγανίσματος	68
2.5.2 Ποικιλία της πατάτας	72
2.5.3 Συνθήκες αποθήκευσης της ωμής πατάτας	74
2.5.4 Η επεξεργασία της πατάτας πριν το τηγάνισμα	76
I) Ζεμάτισμα και μούλιασμα της ωμής πατάτας σε νερό πριν το τηγάνισμα	76
II) Ασπαράγινη και Ανάγοντα Σάκχαρα	78
III) Η επίδραση του pH του τροφίμου	79
IV) Πρόσθετα	81
V) Η επικάλυψη της επιφάνειας του τροφίμου	81
2.5.5 Το σχήμα της πατάτας	82
2.5.6 Ανάπτυξη χρώματος στο τρόφιμο	83
2.5.7 Είδος του ελαίου τηγανίσματος	83
2.5.8 Ποιότητα του ελαίου τηγανίσματος	84
2.6 Τρόποι ελάττωσης και ελέγχου του σχηματισμού του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα κατά το τηγάνισμα	85
2.7 Επίπεδα του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα	87

2.8 Αξιολόγηση της διαιτητικής πρόσληψης του ακρυλαμιδίου στον πληθυσμό	89
Κεφάλαιο 3^ο Πειραματικό Μέρος	91
3.1 Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων	91
3.2 Διαδοχικά Τηγανίσματα στη Φριτέζα και στο Τηγάνι	91
3.2.1 Υλικά	91
3.2.2 Πορεία τηγανίσματος στη φριτέζα (βαθύ τηγάνισμα)	91
3.2.3 Πορεία τηγανίσματος στο τηγάνι (ρηχό τηγάνισμα)	92
3.2.4 Φύλαξη και συντήρηση των δειγμάτων	93
3.3 Εκχύλιση του ακρυλαμιδίου με νερό	93
3.3.1 Υλικά και αντιδραστήρια	93
3.3.2 Πειραματική πορεία	93
3.4 Μελέτη άλλων μεθόδων παραλαβής του ακρυλαμιδίου από την πατάτα	94
3.4.1 Εκχύλιση με Μεθανόλη	94
3.4.1.1 Υλικά και αντιδραστήρια	94
3.4.1.2 Πειραματική πορεία	94
3.4.2 Εκχύλιση του ακρυλαμιδίου με Αιθανόλη	95
3.4.2.1 Υλικά και αντιδραστήρια	95
3.4.2.2 Πειραματική πορεία	95
3.4.3 Εκχύλιση του ακρυλαμιδίου με 1-προπανόλη και ακετονιτρίλιο	95
3.4.3.1 Υλικά και αντιδραστήρια	95
3.4.3.2 Πειραματική πορεία	96
3.5 Δοκιμές αντίδρασης του ακρυλαμιδίου	97
3.5.1 Υλικά	97
3.5.2 Αντίδραση του ακρυλαμιδίου με α-ναφθόλη	97
3.5.3 Αντίδραση του ακρυλαμιδίου με 3,4-δι-υδροξυφαινυλο-1-προπανόλη	98
3.5.4 Αντίδραση του ακρυλαμιδίου με φαινυλαλανίνη	98
3.5.5 Αντίδραση του ακρυλαμιδίου με νινυδρίνη	98
3.6 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων ακρυλαμιδίου	98
3.6.1 Υλικά και αντιδραστήρια	98
3.6.2 Πειραματική πορεία	98
3.7 Μέθοδος ανάλυσης HPLC	99
3.7.1 Υλικά και αντιδραστήρια	99
3.7.2 Όργανα	99

Α΄ Μέθοδος	100
Β΄ Μέθοδος	100
Γ΄ Μέθοδος	101
Δ΄ Μέθοδος (LC-MS)	101
3.8 Ανάλυση Δειγμάτων	102
Α) Συλλογή και απομόνωση των κλασμάτων του ακρυλαμιδίου	102
Β) Ποσοτικοποίηση του ακρυλαμιδίου	103
Κεφάλαιο 4^ο Αποτελέσματα και συζήτηση	104
4.1 Παραλαβή του ακρυλαμιδίου από τις τηγανιτές πατάτες	104
4.2 Επιλογή μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού ακρυλαμιδίου	104
4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός του ακρυλαμιδίου σε τηγανιτές πατάτες	113
4.3.α Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς του Ακρυλαμιδίου	116
4.3.β Συγκέντρωση ακρυλαμιδίου στις τηγανιτές πατάτες	117
4.4 Σχολιασμός των αποτελεσμάτων	119
Κεφάλαιο 5^ο Συμπεράσματα	127
Βιβλιογραφία	129

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

Τα τηγανιτά τρόφιμα

1.1 Γενικά για το τηγάνισμα

Το τηγάνισμα είναι μία από τις αρχαιότερες μεθόδους παρασκευής φαγητού. Πιστεύεται ότι χρησιμοποιούνταν από το 1600 Π.Χ. από τους αρχαίους Αιγύπτιους. Στις μέρες μας, το τηγάνισμα αποτελεί μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους μαγειρέματος διεθνώς. Η κατανάλωση τηγανιτών τροφίμων αυξάνεται συνεχώς καθώς αποτελεί ένα εύκολο και γρήγορο τρόπο μαγειρέματος που ταιριάζει στους ρυθμούς της σύγχρονης ζωής των καταναλωτών. Παράλληλα, το τηγάνισμα χρησιμοποιείται ευρέως από τη βιομηχανία τροφίμων, τα εστιατόρια και τα ταχυ-εστιατόρια.

Κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος το έλαιο θερμαίνεται παρουσία αέρα και υγρασίας που προέρχεται από το τρόφιμο που πρόκειται να τηγανιστεί. Το έλαιο χρησιμοποιείται σαν μέσω μεταφοράς θερμότητας στο τρόφιμο. Στις συνθήκες τηγανίσματος συμβαίνουν πολύπλοκες αντιδράσεις που μεταβάλουν τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του ελαίου αλλά και του τροφίμου που τηγανίζεται. Κάποιες από αυτές τις αντιδράσεις έχουν σαν αποτέλεσμα τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τηγανιτών τροφίμων (χρώμα, άρωμα, γεύση, υφή). Παράλληλα όμως, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν αντιδράσεις που είναι ανεπιθύμητες από διατροφολογικής και τοξικολογικής άποψης.

Ένας από τους παράγοντες που συμβάλλουν στη ποιότητα του τελικού τηγανιτού προϊόντος είναι το ίδιο το έλαιο τηγανίσματος. Η αποικοδόμηση του ελαίου τηγανίσματος εξαρτάται από την σύνθεση του σε λιπαρά οξέα, την αρχική του κατάσταση και την παρουσία προοξειδωτικών ή αντιοξειδωτικών. Παρόλο που είναι γνωστές οι περισσότερες μεταβολές που συμβαίνουν στο έλαιο τηγανίσματος, είναι δύσκολο να προβλεφθεί ο βαθμός υποβάθμισης του ελαίου, εξαιτίας των πολλών και διάφορων παραγόντων που εμπλέκονται. Αυτοί οι παράγοντες δεν σχετίζονται αποκλειστικά με το έλαιο τηγανίσματος αλλά και με τη διαδικασία τηγανίσματος (θερμοκρασία, διάρκεια) και με το τρόφιμο που πρόκειται να τηγανιστεί.

Όταν εφαρμόζονται ορθές πρακτικές τηγανίσματος, το έλαιο που απορροφάται και παραμένει τελικά στο τηγανιτό τρόφιμο, μετά το πέρας του τηγανίσματος, διατηρεί τη θρεπτική του αξία και ένα μεγάλο ποσοστό των λιποδιαλυτών βιταμινών. Σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους τηγανίσματος, κατά το τηγάνισμα το τρόφιμο διατηρεί τις λιποδιαλυτές βιταμίνες, τα μέταλλα και τα υπόλοιπα θρεπτικά συστατικά του σε μεγαλύτερο βαθμό.

Παρακάτω θα αναφερθούν συνοπτικά τα τρόφιμα που τηγανίζονται, τα έλαια και λίπη που χρησιμοποιούνται κατά το τηγάνισμα καθώς και οι διάφοροι τρόποι τηγανίσματος (Boskou, 2002).

Τα τρόφιμα που συνήθως τηγανίζονται είναι:

- Τρόφιμα φυτικής προέλευσης με ή χωρίς επικάλυψη (όπως πατάτες, μελιτζάνες, καλαμπόκι, όσπρια, κρεμμύδια, κολοκυθάκια, ντομάτες, ρύζι, φρούτα)
- Τρόφιμα ζωικής προέλευσης με ή χωρίς επικάλυψη (όπως ψάρια, θαλασσινά, κρέας, κοτόπουλο, τυριά, αυγά, αλλαντικά)
- Τρόφιμα φτιαγμένα από ζύμη (λουκουμάδες, τηγανίτες, doughnuts, πίτες, sprig rolls)
- Κατεψυγμένα και προτηγανισμένα τρόφιμα από τις παραπάνω κατηγορίες

Το υλικό επικάλυψης που χρησιμοποιείται συνήθως είναι μίγμα νερού με αλεύρι, (κουρκούτι). Επίσης, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν υλικά όπως αυγό, ψίχα ψωμιού, τρίμα φρυγανιάς ή παξιμαδιού, σιμιγδάλι, και γάλα.

Είναι δυνατόν να διακρίνουμε τρεις διαφορετικές μεθόδους τηγανίσματος (Μπόσκου, 2005):

- **Βαθύ τηγάνισμά.** Το τρόφιμο είναι πλήρως εμβαπτισμένο στο έλαιο ή το λίπος τηγανίσματος. Το βαθύ τηγάνισμα πραγματοποιείται με επαγγελματικές ή οικιακές φριτέζες καθώς και με βαθιά τηγάνια. Οι θερμοκρασίες οι οποίες συνήθως αναπτύσσονται είναι μεταξύ 140-200°C. Το βαθύ τηγάνισμα είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος τηγανίσματος.

- **Ρηχό τηγάνισμα.** Η στάθμη του ελαίου τηγανίσματος δεν ξεπερνά το ύψος του τροφίμου. Το ρηχό τηγάνισμα πραγματοποιείται με τηγάνια και οι θερμοκρασίες που συνήθως αναπτύσσονται είναι 120-180°C.
- **Τηγάνισμα με λαδωμένο τηγάνι.** Ονομάζεται και Ασιατικό τηγάνισμα. Το τρόφιμο μαγειρεύεται σε κοίλο σκεύος όπου υπάρχει μία μικρή ποσότητα ελαίου στο κέντρο. Το ειδικό αυτό σκεύος ονομάζεται τηγάνι wok. Οι θερμοκρασίες που αναπτύσσονται είναι 120-180°C.

Έχει αναφερθεί από τον Bognar (1998) ότι το ψήσιμο στο φούρνο με λάδι μπορεί να θεωρηθεί ως μία μέθοδος τηγανίσματος στην οποία η θερμοκρασία φτάνει τους 220°C.

Τα λίπη και έλαια που χρησιμοποιούνται στο τηγάνισμα μπορεί να είναι υδρογονωμένα ή μη. Συγκεκριμένα είδη ελαίων που χρησιμοποιούνται στο τηγάνισμα είναι: ελαιόλαδο, σπορέλαια (ηλιανθέλαιο, αραβοσιπτελαιο, βαμβακοσπορέλαιο), μερικά υδρογονωμένα σπορέλαια, μερικά υδρογονομένο σογιέλαιο, μίγματα σπορελαίων, μίγματα υδρογονωμένων σπορελαίων, μερικά υδρογονωμένο φοινικοπυρηνέλαιο, φοινικέλαιο, μαργαρίνες, μαγειρικά λίπη, φρέσκο βούτυρο, λαρδί, ξύγκι, μερικά υδρογονομένο ζωικό λίπος από άλογο, πρόβατο ή χοίρο (Μπόσκου, 2005).

1.2 Φυσικές και χημικές μεταβολές στο τρόφιμο και το έλαιο κατά το τηγάνισμα

1.2.1 Εισαγωγή

Το βαθύ τηγάνισμα αποτελεί μία πολύ συχνή μέθοδο μαγειρέματος η οποία προσδίδει στο τρόφιμο επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως είναι η γεύση, το άρωμα, το χρυσαφί-καφετί χρώμα και η τραγανιστή υφή (Warner, 2002).

Το τρόφιμο είναι πλήρως εμβαπτισμένο μέσα στο έλαιο ή το λίπος τηγανίσματος με αποτέλεσμα να λαμβάνουν χώρα διάφορες αντιδράσεις και μεταβολές σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Τέτοιες αντιδράσεις είναι η αφυδάτωση της επιφάνειας του τροφίμου, η απορρόφηση λίπους, ο σχηματισμός ενώσεων που προσδίδουν γεύση και άρωμα, ο χρωματισμός της επιφάνειας του τροφίμου κ.α. Επίσης, εξαιτίας των ακραίων συνθηκών που επικρατούν στο βαθύ τηγάνισμα, το έλαιο ή το λίπος τηγανίσματος υποβαθμίζεται (Dobarganes *et al.*, 2000).

Κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος, σε θερμοκρασία περίπου 190° C, το έλαιο τηγανίσματος υπόκειται σε οξειδωτική και θερμική αποικοδόμηση με αποτέλεσμα το σχηματισμό πτητικών και μη πτητικών προϊόντων τα οποία μεταβάλλουν τις λειτουργικές, οργανοληπτικές και θρεπτικές ιδιότητες των ελαίων (Warner, 2002).

Τα τελευταία 30 χρόνια, έχουν μελετηθεί εκτενώς οι φυσικές και χημικές μεταβολές που συμβαίνουν στο τηγάνισμα καθώς και η μεγάλη ποικιλία των ενώσεων αποικοδόμησης που παράγονται στα έλαια τηγανίσματος (Warner, 2002). Παρ' όλα αυτά, οι αλλαγές που συμβαίνουν στο τρόφιμο κατά το τηγάνισμα έχουν μελετηθεί σε πολύ μικρότερο βαθμό. (Dobarganes *et al.*, 2000).

Θα μπορούσαμε να συνοψίσουμε τα φυσικά και τα χημικά φαινόμενα που συμβαίνουν μέσα στο τρόφιμο κατά την διάρκεια του τηγανίσματος:

- Φαινόμενα μεταφοράς που περιλαμβάνουν την μεταφορά θερμότητας, την αποβολή ύδατος, την ανταλλαγή λίπους, την απώλεια μάζας, τον σχηματισμό φυσαλίδων στο τρόφιμο κ.α.
- Μηχανικές παραμορφώσεις όπως συρρίκνωση, διόγκωση, διάνοιξη της μάζας του τροφίμου, δημιουργία πορώδους, σκλήρυνση της επιφάνειας του τροφίμου κ.α.
- Αντιδράσεις, όπως αντιδράσεις Maillard, μετουσίωση πρωτεϊνών κ.α.
- Φυσικοχημικές αλλοιώσεις, όπως ζελατινοποίηση, παλινόρθωση και υαλώδης μετάπτωση των υδατανθράκων, πρωτεϊνών κ.α. (Vitrac *et al.*, 2000).

Οι φυσικές και χημικές μεταβολές είναι δυνατόν να συνδεθούν. Τα μη πτητικά προϊόντα αποικοδόμησης προξενούν φυσικές μεταβολές στο έλαιο τηγανίσματος, όπως αύξηση του ιξώδους, του χρώματος και του αφρισμού του ελαίου (Perkins, 1967). Οι χημικές μεταβολές που συμβαίνουν στο τηγάνισμα αυξάνουν τη συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων, τις καρβονυλικές και πολυμερείς ενώσεις, ενώ μειώνουν την ακορεστότητα των λιπαρών οξέων. Παράλληλα, οι χημικές μεταβολές επηρεάζουν την ποιότητα της γεύσης, τη σταθερότητα, και τη θρεπτική αξία του ελαίου (Warner, 2002) .

Πίνακας 1.2.1 Η επίδραση των φυσικών και χημικών μεταβολών στο βαθύ τηγάνισμα (Warner, 2002)

Φυσικές Μεταβολές
Αύξηση: ιξώδους, χρώματος, αφρισμού Μείωση: σημείου καπνού
Χημικές Μεταβολές
Αύξηση: ελεύθερων λιπαρών οξέων, καρβονυλικών ενώσεων, ενώσεων μεγάλου M.B. Μείωση: ακορεστότητας, γευστικής ποιότητας, θρεπτικής αξίας (απαραίτητα λιπαρά οξέα)

Παρακάτω θα αναλυθούν:

- οι βασικές μεταβολές στα λίπη και έλαια τηγανίσματος οι οποίες οφείλονται στη φύση του τροφίμου που τηγανίζεται,
- καθώς και οι μεταβολές που συμβαίνουν στο τρόφιμο ως αποτέλεσμα του λίπους ή του ελαίου που χρησιμοποιείται σαν μέσο μεταφοράς της θερμότητας.

1.2.2 Φυσικές μεταβολές

Η μελέτη των φυσικών μεταβολών που συμβαίνουν στο τηγάνισμα είναι απαραίτητη για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τηγανίζεται το τρόφιμο και του τρόπου με τον οποίο το έλαιο τηγανίσματος και τα προϊόντα αποικοδόμησης του αλληλεπιδρούν με το τρόφιμο που τηγανίζεται (Warner, 2002). Στις βασικές φυσικές μεταβολές περιλαμβάνονται η αφυδάτωση της επιφάνειας του τροφίμου μέσω της συνεχούς εξάτμισης της υγρασίας του, η ανταλλαγή των λιπιδίων προς δύο κατευθύνσεις, δηλαδή από το έλαιο τηγανίσματος προς το τρόφιμο και από το τρόφιμο προς το έλαιο, καθώς και η απόσταξη με υδρατμούς ενώσεων που προσδίδουν γεύση και οσμή. Αυτές οι μεταβολές αποτελούν τις βασικές παραμέτρους που επηρεάζουν την ενεργειακή πυκνότητα, την υφή και την οσμή των τηγανισμένων τροφίμων (Dobarganes *et al.*, 2000).

Ι) Μεταφορά μάζας και θερμότητας μεταξύ του τροφίμου και του ελαίου ή του λίπους τηγανίσματος

Το βαθύ τηγάνισμα είναι μία διαδικασία μαγειρέματος και αφυδάτωσης σε καυτό έλαιο με ταυτόχρονη μεταφορά θερμότητας και μάζας (Warner, 2002). Η μεταγωγή θερμότητας από το έλαιο στο τρόφιμο και η αγωγή θερμότητας στο εσωτερικό του τροφίμου παίζουν καθοριστικό ρόλο για τις χημικές και φυσικές μεταβολές που συμβαίνουν στο έλαιο και στο τρόφιμο (Boskou, 2002). Η μεταφορά μάζας περιλαμβάνει την αφυδάτωση, την απόσταξη με υδρατμούς των πτητικών συστατικών και την εκχύλιση συστατικών από το τρόφιμο στο έλαιο (Boskou, 2002).

II) Βασικές μεταβολές που συμβαίνουν στο τρόφιμο: Πρόσληψη λίπους και απώλεια ύδατος

Όταν το τρόφιμο προστίθεται μέσα στο έλαιο τηγανίσματος, η θερμοκρασία του ελαίου μειώνεται ενώ παράλληλα μεταφέρεται στο τρόφιμο θερμότητα και απορροφάται από αυτό έλαιο (Fritsch, 1981). Καθώς η θερμότητα μεταφέρεται από το έλαιο προς το τρόφιμο, η υγρασία που περιέχεται στο τρόφιμο μετακινείται από το εσωτερικό προς την επιφάνεια του τροφίμου και η θερμοκρασία του αυξάνεται με αργό ρυθμό παραμένοντας κοντά στους 100 °C. Η υγρασία που βρίσκεται στην επιφάνεια του τροφίμου φτάνει στο σημείο βρασμού και εξατμίζεται με αποτέλεσμα το τρόφιμο να καλύπτεται με ατμό (Dobarganes *et al.*, 2000). Ο ατμός που εγκαταλείπει την επιφάνεια του τροφίμου μεταφέρει μαζί του πτητικά συστατικά και δημιουργεί μία ασπίδα προστασίας έναντι της επαφής με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο (Boskou, 2002). Παράλληλα, ο ατμός που δημιουργείται περιορίζει τη διείσδυση του ελαίου από την επιφάνεια του τροφίμου προς το εσωτερικό του, ώστε το τηγανισμένο τρόφιμο να παρουσιάζει δύο χαρακτηριστικές ζώνες:

- α) την αφυδατωμένη επιφάνεια του τροφίμου όπου λαμβάνουν χώρα οι βασικές μεταβολές,
- β) και το εσωτερικό ή πυρήνα του τροφίμου όπου η θερμοκρασία δεν υπερβαίνει τους 100 °C (Dobarganes *et al.*, 2000)

Πολλοί ερευνητές επιχείρησαν να εξηγήσουν το μηχανισμό απορρόφησης λίπους από το τρόφιμο προτείνοντας ότι εξαρτάται από την ποσότητα της υγρασίας που φεύγει από το τρόφιμο και από τον τρόπο με τον οποίο απομακρύνεται η υγρασία από το τρόφιμο (Kochhar *et al.*, 2004). Η πρόσληψη λίπους περιορίζεται στην επιφάνεια του

τροφίμου και σε βάθος μόλις μερικών κυττάρων (Keller *et al.*, 1986, Saguy *et al.*, 1997, Pedreschi *et al.*, 1999, Bouchon *et al.*, 2001). Αυτά τα αποτελέσματα ενισχύουν τα ευρήματα άλλων ερευνητών που αναφέρουν ότι η πρόσληψη λίπους είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει στην επιφάνεια του τροφίμου και προκύπτει από τον ανταγωνισμό μεταξύ αφυδάτωσης και απορρόφησης όταν το τηγανιτό τρόφιμο απομακρύνεται από το καυτό έλαιο και αφήνεται να κρυώσει (Gamble *et al.*, 1987, Ufheil *et al.*, 1996, Moreira *et al.*, 1997, Bouchon *et al.*, 2000). Τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν ξεκάθαρα ότι η πρόσληψη λίπους και η απώλεια ύδατος από το τρόφιμο δεν είναι ταυτόχρονα φαινόμενα (Pyle and co-workers, 2004).

Εξαιτίας του υψηλού ρυθμού μεταφοράς θερμότητας προς το τρόφιμο και της έλλειψης διαθέσιμης υγρασίας προς εξάτμιση από αυτό, η περίσσεια της ενέργειας (θερμότητας) χρησιμοποιείται για να αυξήσει τη θερμοκρασία στο τρόφιμο πάνω από το σημείο βρασμού. Με αυτό τον τρόπο εντείνονται οι χημικές αντιδράσεις όπως η αμαύρωση και η υποβάθμιση θρεπτικών συστατικών (Vitrac *et al.*, 2000).

Η μείωση του περιεχομένου της υγρασίας του τηγανιτού τροφίμου μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις διαφορετικές περιόδους ανάλογα με την θερμοκρασία που επικρατεί στο κέντρο του τροφίμου:

1^ο στάδιο: Αρχική αύξηση της θερμοκρασίας ως το σημείο βρασμού του ελεύθερου νερού που συνοδεύεται από επιφανειακό βρασμό.

2^ο στάδιο: Σταθεροποίηση της θερμοκρασίας (πλατώ) κοντά στο σημείο βρασμού. Στο στάδιο αυτό εξατμίζεται το μεγαλύτερο ποσοστό του ελεύθερου και του τριχοειδούς νερού.

3^ο στάδιο: Αύξηση της θερμοκρασίας του τροφίμου κοντά στην θερμοκρασία του ελαίου τηγανίσματος, με χαμηλό ρυθμό ξήρανσης (Τηγάνισμα σε πλήρως άνυδρες συνθήκες) (Vitrac *et al.*, 2000).

Τελικά, όταν το τρόφιμο που τηγανίζεται φτάσει τη θερμοκρασία του ελαίου, δεν υπάρχει δυνατότητα για περαιτέρω εξάτμιση και λαμβάνουν χώρα μόνο οι αντιδράσεις που ενεργοποιούνται σε υψηλή θερμοκρασία. Το τηγάνισμα των τροφίμων συνήθως δεν φτάνει σε αυτό το τελευταίο στάδιο (Vitrac *et al.*, 2000).

III) Παράγοντες που επηρεάζουν την πρόσληψη λίπους και την απώλεια ύδατος από το τρόφιμο στο τηγάνισμα

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την απώλεια ύδατος και την πρόσληψη λίπους από το τρόφιμο είναι:

- οι συνθήκες τηγανίσματος
- το ίδιο το τρόφιμο
- το λίπος ή το έλαιο τηγανίσματος (Dobarganes *et al.*, 2000)

Η βασικότερη παράμετρος που επηρεάζει την απώλεια ύδατος και την πρόσληψη λίπους στο τρόφιμο είναι οι συνθήκες τηγανίσματος, δηλαδή η θερμοκρασία και η διάρκεια τηγανίσματος (Dobarganes *et al.*, 2000). Έχει βρεθεί ότι ανάμεσα στους 150 και 180 ° C η θερμοκρασία δεν παίζει τόσο σημαντικό ρόλο (Varela, 1977). Γενικά όμως, στις υψηλότερες θερμοκρασίες η απορρόφηση λίπους στην επιφάνεια του τροφίμου συμβαίνει σε μικρότερο βαθμό. Αντίθετα, η υψηλή απορρόφηση λίπους μπορεί να είναι αποτέλεσμα της χαμηλής θερμοκρασίας τηγανίσματος. Παράλληλα, η θερμοκρασία και η διάρκεια τηγανίσματος είναι δυνατό να συσχετιστούν: όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία τόσο μικρότερη είναι η διάρκεια που χρειάζεται ώστε να ληφθεί ένα τηγανισμένο τρόφιμο συγκεκριμένης ποιότητας (Dobarganes *et al.*, 2000).

Όσον αφορά το τρόφιμο, πολλές μεταβλητές επηρεάζουν την τελική σύσταση του τηγανιτού τροφίμου. Ανάμεσα σε αυτές, έχουν αναφερθεί η σύνθεση του τροφίμου, η δομή και η συγκρότηση της επιφάνειάς του, η υγρασία του τροφίμου, το περιεχόμενό του σε λιπίδια, το σχήμα του, το μέγεθός του, ο λόγος της επιφάνειας προς το βάρος, το πορώδες και η επεξεργασία του τροφίμου πριν το τηγάνισμα (Pinthus *et al.*, 1995a,b, Saguy *et al.*, 1995, Moreira *et al.*, 1995, Fillon *et al.*, 1998). Για παράδειγμα, οι τηγανιτές πατάτες απορροφούν περισσότερο έλαιο σε σχέση με το κρέας, αφού η αρχική περιεκτικότητά τους σε λίπος είναι χαμηλότερη (Pokorný, 1989). Από πειράματα που έγιναν σε τηγανιτές πατάτες από τους Pyle και συνεργάτες (2004), προτάθηκε ότι η δομή της επιφανειακής κρούστας του τροφίμου που σχηματίζεται στο τηγάνισμα είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που σχετίζεται με το τρόφιμο και καθορίζει τη συνολική πρόσληψη λίπους από αυτό. Ακόμα, πολλά τρόφιμα τηγανίζονται αφού προηγουμένως η επιφάνειά τους έχει επικαλυφθεί με ψίχα ψωμιού ή κουρκούτι (νερό και αλεύρι), τα

οποία μεταβάλλουν την απώλεια ύδατος και την ανταλλαγή λιπιδίων στα λιπαρά τρόφιμα (Makinson *et al.*, 1987). Συνεπώς, υπάρχουν πολλές μεταβλητές που σχετίζονται με το τρόφιμο και που επηρεάζουν την περιεκτικότητα των τηγανισμένων τροφίμων σε λίπος, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο αυτές να ελεγχθούν. Η προσρόφηση λίπους μπορεί να ποικίλει από 6% (στην περίπτωση των καβουρντισμένων αμυγδάλων) έως περίπου 40% (στα πατατάκια) (Morton *et al.*, 1988).

Η επίδραση του λίπους ή του ελαίου τηγανίσματος έχει βρεθεί να είναι πολύ μικρότερη από την επίδραση που έχει το ίδιο το τρόφιμο στην απορρόφηση λίπους. Γενικά όμως αναφερόμενοι στο λίπος, η απορρόφηση λίπους εξαρτάται περισσότερο από την ποιότητα παρά από είδος του λίπους ή του ελαίου τηγανίσματος (Dobarganes *et al.*, 2000). Η επίδραση της ποιότητας του μέσου μεταφοράς θερμότητας έχει αποδοθεί στον σχηματισμό ενώσεων αποικοδόμησης που αυξάνουν την πολικότητα του μέσου. Παράλληλα, το ιξώδες του ελαίου αυξάνεται, με αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης του ελαίου στην επιφάνεια του τροφίμου (Alim *et al.*, 1974).

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, η σύνθεση του τροφίμου σε λιπαρά οξέα καθορίζεται από το λίπος που απορροφάται και παραμένει τελικά στο τρόφιμο. Η ποικιλία που εμφανίζεται στην απορρόφηση του λίπους από το τηγανισμένο τρόφιμο δημιουργεί δυσκολίες στο να προβλεφθεί η τελική σύνθεση του τροφίμου σε λιπαρά οξέα.

IV) Σύγκριση της σύνθεσης των τηγανισμένων ελαίων και των ελαίων που απορροφώνται από το τηγανισμένο τρόφιμο

Η μελέτη των διαφορών ανάμεσα στο τηγανισμένο έλαιο που παραμένει στο τηγάνι και στο έλαιο που κατακρατιέται μέσα στο τηγανισμένο τρόφιμο είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς μπορεί να δικαιολογήσει το γιατί χρησιμοποιείται ως μέθοδος αξιολόγησης η ανάλυση των λιπιδίων του τροφίμου αντί των λιπιδίων του ελαίου ή του λίπους τηγανίσματος (Dobarganes *et al.*, 2000). Στην βιβλιογραφία φαίνεται να μην υπάρχει συμφωνία σε αυτόν τον τομέα. Σε μερικές έρευνες, βρέθηκε παρόμοια σύσταση σε λιπαρά οξέα και σε παραγόμενες ενώσεις ανάμεσα στα δύο έλαια (από το τρόφιμο και από το τηγάνι) (Sébedio *et al.*, 1990, Pérez-Camino *et al.*, 1991, Jorge *et al.*, 1996). Εν αντιθέσει, σε άλλες έρευνες έχουν διαπιστωθεί πολύ μεγάλες διαφορές (Pokorný, 1998).

Έχουν διεξαχθεί αρκετές έρευνες για την παρατήρηση των διαφορών ανάμεσα στο τηγανισμένο έλαιο και στο έλαιο που παραλαμβάνεται από το τηγανισμένο τρόφιμο (Pérez-Camino *et al.*, 1991, Jorge *et al.*, 1996), αναλύοντας τα ολικά πολικά συστατικά (TPM) (Waltking *et al.*, 1981, Sébédio *et al.*, 1996), τις κύριες ομάδες παραγόμενων ενώσεων (πολυμερή, οξειδωμένες τριακυλογλυκερόλες, διακυλογλυκερόλες), τη σύσταση σε λιπαρά οξέα καθώς και περιεχόμενο των τοκοφερολών (Dobarganes *et al.*, 1988). Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών έδειξαν ότι δεν παρουσιάζεται καμία διαφορά ανάμεσα στο προφίλ του τηγανισμένου ελαίου και του λίπους που παραλήφθηκε από το τρόφιμο.

Στις παραπάνω μελέτες, τα πολικά συστατικά βρίσκονταν σε επίπεδο χαμηλότερο από 10%. Παρόλα αυτά, παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και σε μελέτες όπου αναλύθηκαν έλαια τηγανίσματος με επίπεδο πολικών συστατικών περίπου 20%. Μια από αυτές είναι η μελέτη των Jorge *et al.* (1996), στην οποία δε βρέθηκε καμία διαφορά που να υποδεικνύει ότι υπάρχει επιλεκτική προσρόφηση των πολικών συστατικών ή των φυσικών αντιοξειδωτικών (α- τοκοφερολών) πάνω στην επιφάνεια του τροφίμου.

Συνεπώς, τα δεδομένα που προκύπτουν από την ανάλυση της σύστασης των τηγανισμένων ελαίων μπορούν να θεωρηθούν αντιπροσωπευτικά της σύστασης του λίπους που απορροφάται από το τηγανισμένο τρόφιμο. Όσο υψηλότερο είναι το ποσό του λίπους που απορροφάται, τόσο πιο αντιπροσωπευτική είναι η τελική σύσταση των λιπιδίων του τροφίμου για τη σύσταση του λίπους τηγανίσματος (Dobarganes *et al.*, 2000).

Επεκτείνοντας, η ανασκόπηση των φυσικών και χημικών μεταβολών που συμβαίνουν στο τρόφιμο κατά το τηγάνισμα είναι σημαντικό να περιλαμβάνει τις αντιδράσεις που συμβαίνουν στο έλαιο τηγανίσματος αφού τα προϊόντα αυτών των μεταβολών απορροφούνται από το τρόφιμο παράλληλα με την απορρόφηση του ελαίου.

V) Μεταφορά συστατικών από το τρόφιμο στο έλαιο τηγανίσματος

Τα μικροσυστατικά καθώς και τα λιπίδια που υπάρχουν στο τρόφιμο και μεταφέρονται στο έλαιο τηγανίσματος μπορούν εύκολα να μεταβάλλουν την απόδοση και την ποιότητα του ελαίου (Pokorný, 1980, Stevenson *et al.*, 1984, Fillon *et al.*, 1998, Pokorný, 1998). Ανάμεσα στις κυριότερες ενώσεις που περιέχονται στα τρόφιμα και συμβάλουν στην τροποποίηση των φυσικών και των χημικών ιδιοτήτων των χρησιμοποιημένων ελαίων και λιπών τηγανίσματος ξεχωρίζουν οι παρακάτω:

A. Αμφιπολικές ενώσεις όπως φωσφολιποειδή και γαλακτοματοποιητές που μπορούν να συμβάλλουν στο πρόωρο αφρισμό.

B. Λιποδιαλυτές βιταμίνες και ιχνοστοιχεία που μεταφέρονται μέσα στο έλαιο τηγανίσματος και παρεμποδίζουν ή επιταχύνουν την οξείδωση των ελαίων, ανάλογα με το αν εμφανίζουν προοξειδωτικές ή αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Γ. Χοληστερόλη από λιπαρά τρόφιμα ζωικής προέλευσης που μπορεί να μεταφερθεί σε φυτικά έλαια τηγανίσματος και από αυτά σε μη λιπαρά τρόφιμα κατά τη διάρκεια διαδοχικών τηγανισμάτων.

Δ. Χρωστικές και προϊόντα που παράγονται από αντιδράσεις *Maillard* τα οποία μεταβάλλουν την ανθεκτικότητα των ελαίων έναντι της οξείδωσης και συμβάλλουν στην αμαύρωση.

Ε. Φαινολικές ενώσεις από τα τρόφιμα ή από τα μπαχαρικά που προστίθενται κατά το τηγάνισμα οι οποίες αυξάνουν την σταθερότητα του ελαίου τηγανίσματος.

ΣΤ. Πτητικές ενώσεις που προέρχονται από τρόφιμα με έντονο άρωμα (όπως ψάρια, κρεμμύδια) οι οποίες συμβάλλουν στην παραγωγή χαρακτηριστικών οσμών και αρωμάτων (Dobarganes *et al.*, 2000).

1.2.3 Χημικές μεταβολές και αντιδράσεις

Τα έλαια τηγανίσματος λειτουργούν ως μέσο μεταφοράς θερμότητας ενώ παράλληλα παίζουν ρόλο στην παραγωγή των χαρακτηριστικών οσμών του τηγανίσματος. Οι οσμές αυτές μπορεί να είναι ευχάριστες αλλά και δυσάρεστες, όπως στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται υποβαθμισμένα έλαια. Στο βαθύ τηγάνισμα λαμβάνουν χώρα διάφορες χημικές διαδικασίες υποβάθμισης (όπως υδρόλυση, οξείδωση και πολυμερισμός) καθώς το έλαιο τηγανίσματος αποικοδομείται προς σχηματισμό πτητικών και μη πτητικών (μονομερών και πολυμερών) ενώσεων (Warner, 2002). Με τη συνεχόμενη θέρμανση και το τηγάνισμα, αυτές οι ενώσεις αποικοδομούνται περαιτέρω μέχρι τα προϊόντα διάσπασής τους να συσσωρευτούν σε επίπεδα που παράγουν οσμές και δυνητικά τοξικά αποτελέσματα, καθιστώντας το έλαιο ακατάλληλο για τηγάνισμα (Warner, 2002). Οι ποσότητες αυτών των ενώσεων που δημιουργούνται καθώς και η χημική τους δομή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του τύπου του ελαίου και του τροφίμου, των συνθηκών τηγανίσματος και της διαθεσιμότητας σε οξυγόνο (Wessels, 1983). Ακόμα, τα προϊόντα των χημικών αντιδράσεων αλληλεπιδρούν παράγοντας ένα πολύπλοκο μείγμα προϊόντων (Warner, 2002). Οι χημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν στο έλαιο τηγανίσματος καθώς και στο τρόφιμο που τηγανίζεται περιγράφονται παρακάτω.

Ι) Υδρόλυση

Καθώς το τρόφιμο τοποθετείται μέσα στο έλαιο σε θερμοκρασία τηγανίσματος, ο αέρας και η υγρασία προκαλούν μία αλυσίδα αλληλένδετων αντιδράσεων. Η υγρασία και ο ατμός προκαλούν υδρόλυση των τριγλυκεριδίων μέσω της οποίας παράγονται μόνο- και διγλυκερίδια και τελικά ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη (Kochhar *et al.*, 2004). Η γλυκερόλη, που είναι πτητική άνω των 150°C, εξατμίζεται μερικώς και η ισορροπία της αντίδρασης μετατοπίζεται προς την παραγωγή περισσότερων προϊόντων υδρόλυσης (Pokorný, 1989). Παράλληλα, η γλυκερόλη αφυδατώνεται και προκύπτει μια ακόρεστη αλδεΐδη, η ακρολεΐνη, στην οποία οφείλεται η δυσάρεστη και δεικτική οσμή των λιπαρών υλών κατά το τηγάνισμα (Δημόπουλος και Ανδρικόπουλος, 1996). Τα

λιπαρά οξέα που παράγονται συμβάλλουν στο σχηματισμό πτητικών ενώσεων και στη μείωση του σημείου καπνού του ελαίου (Dobarganes *et al.*, 2000).

Η έκταση της υδρόλυσης είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία του ελαίου, η έκταση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης μεταξύ του ελαίου και της υγρασίας του τροφίμου, το ποσό της υγρασίας και του ατμού (η υγρασία υδρολύει το έλαιο πιο γρήγορα από ότι ο ατμός). Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και τα χαμηλού μοριακού βάρους όξινα προϊόντα της οξειδωσης του λίπους εντείνουν την υδρόλυση παρουσία ατμού (Pokorný, 1989). Ακόμα όμως και για την υδρόλυση, που είναι μια από τις πιο απλές αντιδράσεις στο τηγάνισμα, δεν υπάρχει απόλυτη συμφωνία ως προς τους παράγοντες που προωθούν το σχηματισμό των λιπαρών οξέων (Barbanti *et al.*, 1994, Pokorný, 1998). Κατά το τηγάνισμα της πατάτας σε καλά ελεγχόμενες συνθήκες στο εργαστήριο, τα προϊόντα υδρόλυσης αποτελούν ένα μικρό ποσοστό σε σχέση με τις καινούριες ενώσεις που λαμβάνονται, ακόμα κι αν το τρόφιμο έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό (Sébédio *et al.*, 1990, Pérez-Camino *et al.*, 1991, Dobarganes *et al.*, 1993, Arroyo *et al.*, 1995). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι άλλοι παράγοντες, που βασίζονται ή όχι στον τύπο του τροφίμου, έχουν πολύ μεγαλύτερη σημασία από ό, τι το περιεχόμενο του σε υγρασία (Masson *et al.*, 1997).

Τα προϊόντα της υδρόλυσης (π.χ. τα ελεύθερα λιπαρά οξέα), όπως και όλα τα προϊόντα υποβάθμισης των ελαίων, μειώνουν τη σταθερότητα των ελαίων τηγανίσματος και είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση της διάρκειας ζωής του ελαίου (Warner, 2002). Όμως, ένα μέρος των ελεύθερων λιπαρών οξέων χάνεται μέσω του ατμού κατά το τηγάνισμα. Έτσι, ο προσδιορισμός των διγλυκεριδίων μερικές φορές προτιμάται από την ανάλυση των ελεύθερων λιπαρών οξέων, αφού τα διγλυκερίδια κατακρατούνται από το έλαιο τηγανίσματος (Kochhar *et al.*, 2004).

II) Θερμική Οξείδωση

Το οξυγόνο, που είναι παρόν στο φρέσκο έλαιο και το οξυγόνο που εισάγεται μέσα στο έλαιο τηγανίσματος μέσω της επιφάνειας του ελαίου και μέσω της προσθήκης του τροφίμου, ενεργοποιεί μία αλυσίδα αντιδράσεων που προκαλούν σχηματισμό ελευθέρων ριζών, υπεροξειδίων του υδρογόνου, και συζυγιακών διενοϊκών οξέων (Warner *et al.*, 2001, Kochhar *et al.*, 2004). Οι χημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της οξειδωσης συμβάλουν στο σχηματισμό πτητικών και μη πτητικών προϊόντων αποικοδόμησης. Για παράδειγμα, η οξείδωση του αιθυλεστέρα του

λινελαϊκού οδηγεί στον σχηματισμό συζυγιακών υπεροξειδίων του υδρογόνου που μπορούν να σχηματίσουν μη κυκλικά προϊόντα μακράς αλύσου ή μπορούν να κυκλοποιηθούν και να σχηματίσουν πολυμερή υπεροξειδίων (Perkins, 1967). Η οξειδωτική υποβάθμιση παράγει οξειδωμένα τριγλυκερίδια που περιέχουν επόξυ-, υδροξυ- και κέτο- ομάδες καθώς και διμερή λιπαρών οξέων ή διμερή τριγλυκεριδίων (Wessels, 1983).

Ο μηχανισμός οξειδωσης στα έλαια τηγανίσματος είναι παρόμοιος με την αυτοοξειδωση που συμβαίνει στους 25°C. Όμως, τα ασταθή αρχικά προϊόντα της οξειδωσης – τα υπεροξειδία του υδρογόνου – αποικοδομούνται ταχύτατα στους 190°C σε δευτερογενή προϊόντα οξειδωσης, όπως αλδεΐδες και κετόνες. Τα δευτερογενή προϊόντα οξειδωσης που είναι πτητικά συμβάλουν κατά πολύ στην οσμή του ελαίου τηγανίσματος και στη γεύση και το άρωμα των τηγανιτών τροφίμων (Neff *et al.*, 2000, Warner *et al.*, 2001). Τα πτητικά συστατικά αρχικά αυξάνονται ενώ στη συνέχεια μειώνονται καθώς το τηγάνισμα συνεχίζεται (Boskou, 2002).

Τα πτητικά προϊόντα αποικοδόμησης είναι συνήθως κορεσμένα και μονοακόρεστα υδροξυλο-, αλδεϋδικά, κέτο- και δικαρβοξυλικά οξέα, υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες και αρωματικές ενώσεις (Perkins, 1996).

Αν τα δευτερογενή προϊόντα της οξειδωσης είναι ακόρεστες αλδεΐδες, όπως 2,4-δεκαδιενάλη, 2,4-εννεαδιενάλη, 2,4-οκταδιενάλη, 2-επτενάλη και 2-οκτενάλη, συμβάλουν στη χαρακτηριστική γεύση και οσμή τηγανίσματος των ελαίων που δεν έχουν υποβαθμιστεί και μπορούν να θεωρηθούν επιθυμητά προϊόντα (Warner *et al.*, 2001). Η 2-trans-4-trans-δεκαδιενάλη είναι η ένωση στην οποία οφείλεται κυρίως η ευχάριστη μυρωδιά που παράγεται στο τηγάνισμα (Boskou, 2002). Παρ' όλα αυτά, οι κορεσμένες και οι ακόρεστες αλδεΐδες, όπως εξανάλη, επτανάλη, οκτανάλη, εννεάλη και 2-δεκενάλη, έχουν χαρακτηριστικές δυσάρεστες οσμές στην ολφакτομετρική ανάλυση των καυτών ελαίων. Η φρουτώδης και πλαστική απωθητική οσμή των θερμασμένων ελαίων που έχουν υψηλό περιεχόμενο σε ελαϊκό οξύ, αποδίδεται πρωτίστως στις ενώσεις επτανάλη, οκτανάλη, εννεάλη και 2-δεκενάλη (Neff *et al.*, 2000).

Ο σχηματισμός μη πτητικών προϊόντων αποικοδόμησης οφείλεται στην οξειδωση και τον πολυμερισμό των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Αυτά τα προϊόντα λειτουργούν ως καταλύτες στις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών και επιταχύνουν την υποβάθμιση (Boskou, 2002).

Μεγάλο ενδιαφέρον αναπτύσσεται γύρω από την ομάδα των μονομερών των οξειδωμένων τριακυλογλυκερολών. Οι βασικές ενώσεις που ανήκουν σε αυτή την ομάδα είναι οι τριακυλογλυκερόλες που περιέχουν βραχείας αλύσου ακυλομάδες οι οποίες σχηματίζονται από β-ομολυτική σχάση των αλκόξυ ριζών που προέρχονται από άλλυλο υδροϋπεροξειδία (Velasco *et al.*, 2004).

III) Πολυμερισμός

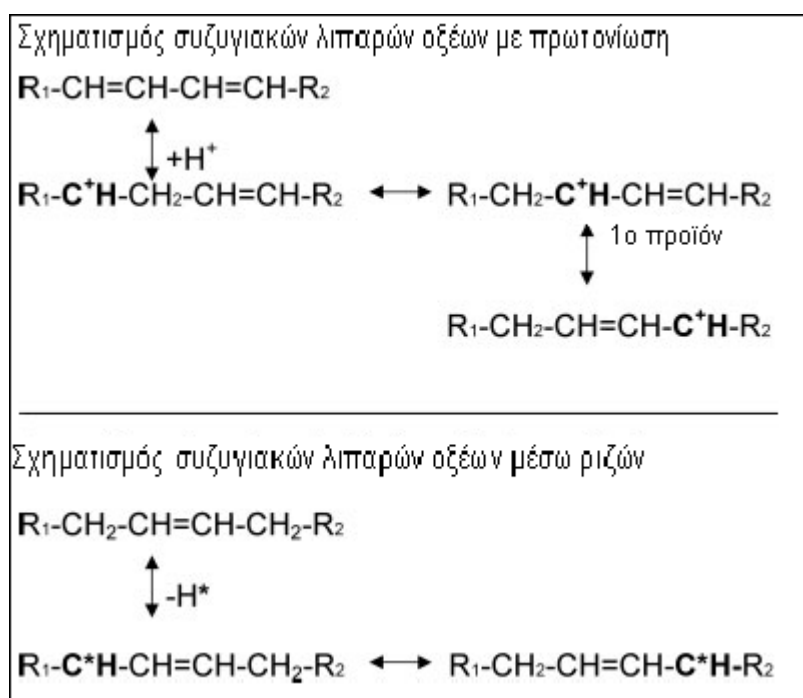
Ο πολυμερισμός συμβαίνει κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος, περιλαμβάνοντας μεγάλη ποικιλία χημικών αντιδράσεων που έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενώσεων με μεγάλο μοριακό βάρος και πολικότητα. Πολυμερή είναι δυνατόν να σχηματιστούν από ελεύθερες ρίζες ή από τριγλυκερίδια μέσω της αντίδρασης Diels – Alder (Warner, 2002). Τα πολυμερή διαχωρίζονται συνήθως σε πολικά διμερή, μη πολικά διμερή και ολιγομερή που έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος από τα διμερή (Boskou, 2002). Κυκλικά λιπαρά οξέα μπορούν να σχηματιστούν εντός ή μεταξύ των τριγλυκεριδίων. Διμερή λιπαρών οξέων μπορούν να σχηματιστούν μεταξύ δύο λιπαρών οξέων που ανήκουν στο ίδιο ή σε διαφορετικά τριγλυκερίδια. Καθώς τα παραπάνω μόρια συνεχίζουν να συνδέονται λαμβάνονται πολυμερή με μεγάλο μοριακό βάρος (Warner, 2002).

Καθώς τα πολυμερή αυξάνονται μέσα στο έλαιο τηγανίσματος αυξάνεται παράλληλα και το ιξώδες του ελαίου (Warner, 2002). Ο πολυμερισμός είναι η αιτία εμφάνισης κολλώδους υφής στα έλαια τηγανίσματος (Boskou, 2002) και προκαλεί μεταβολή του μοριακού βάρους, του χρώματος, και του δείκτη διάθλασης του ελαίου (Μπόσκου, 1997).

Η πλειοψηφία των διμερών και των πολυμερών των τριγλυκεριδίων σχηματίζονται ενδομοριακά με δεσμούς C-C και μόνο μία μειοψηφία διμερών σχηματίζεται με δεσμούς C-O-C. Φαίνεται ότι οι δεσμοί που δημιουργούνται μέσω οξειδωσης σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι C-O-C, ενώ εκείνοι που σχηματίζονται σε υψηλές θερμοκρασίες είναι C-C. Κατά την διάρκεια της αυτοοξειδωσης, τα διμερή και τα πολυμερή δημιουργούνται από την ένωση δύο ελευθέρων ριζών, την ενδομοριακή προσθήκη μίας ελεύθερης ρίζας στο μόριο ενός τριγλυκεριδίου ή ακολουθώντας την αντίδραση Diels – Alder. Όμως, τα πολικά διμερή στα έλαια τηγανίσματος σχηματίζονται κυρίως με δεσμούς C-C και όχι με δεσμούς C-O-C που θα αναμένονταν αν αυτές οι ενώσεις

σχηματίζονταν ακολουθώντας τον μηχανισμό των ελευθέρων ριζών. Κατά το τηγάνισμα, αφού το οξυγόνο είναι σχετικά περιορισμένο από την κάλυψη του τροφίμου με ατμό, κάποιος άλλος μηχανισμός πρέπει να είναι ο υπεύθυνος (Kochhar *et al.*, 2004).

Προτάθηκε, από τους Kochhar & Gertz (2004), ένας μηχανισμός για τον σχηματισμό μη οξειδωμένων διμερών, πολυμερών και κυκλικών τριγλυκεριδίων, ο οποίος δεν περιλαμβάνει ελεύθερες ρίζες και είναι πιθανόν πιο σημαντικός από το προϊόν της αυτοοξειδωσης. Η αρχική αντίδραση είναι ο σχηματισμός συζυγιακών λιπαρών οξέων, αφού αυτά είναι πιο ενεργά συστατικά από τα λιπαρά οξέα με μεμονωμένους *trans* διπλούς δεσμούς. Τα υδροϋπεροξειδία των ακόρεστων λιπαρών οξέων μετατρέπονται σε συζυγιακά λιπαρά οξέα (Kochhar *et al.*, 2004). Σε μία όξινη αντίδραση, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μπορούν να μετατραπούν απευθείας σε συζυγιακά λιπαρά οξέα (Brütting and Spitiller, 1994). Η πρωτονίωση των συζυγιακών ακόρεστων λιπαρών οξέων φαίνεται στο σχήμα 1.2.3.α.



Σχήμα 1.2.3.α σχηματισμός συζυγιακών λιπαρών οξέων με πρωτονίωση και με ρίζες (Kochhar *et al.*, 2004).

Ο διμερισμός των ακόρεστων λιπαρών οξέων μπορεί επίσης να ξεκινήσει μέσω ενός κατιονικού μηχανισμού που δεν περιλαμβάνει τον σχηματισμό προϊόντων της αντίδρασης Diels – Alder. Τα ενδιάμεσα κατιονικά προϊόντα της αντίδρασης σταθεροποιούνται με μεσομερή ώστε να λάβουν μέρος σε περαιτέρω αντιδράσεις σχηματισμού διμερών που δεν συνδέονται με δεσμούς C-O-C. Ένας ενδομοριακός μηχανισμός διμερισμού και κυκλοποίησης του λινελαϊκού οξέος παρουσιάζεται

$$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH} \quad (1)$$

$$\downarrow +\text{H}^+$$

$$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH}_2 - \text{CH}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH} \quad (2)$$

$$\downarrow + (1)$$

$$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$$

$$\downarrow - \text{H}^+$$

$$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH} - \text{CH}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$$

$$\downarrow - \text{H}^+$$

$$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$$

$$\downarrow$$

$$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{C} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$$

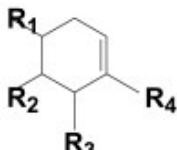
Διμερές

$$\xrightarrow{+\text{H}^+}$$

$$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_5 - \text{C}_6\text{H}_4^+ - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$$

$$\downarrow - \text{H}^+$$

$$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_5 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$$



και τα μερικώς υδρογονωμένα φυτικά έλαια, μετά από 3,5 και 7 ώρες τηγανίσματος στους 200°C.

Τα *trans* ισομερή σχηματίζονται κατά την διάρκεια του τηγανίσματος σε οικιακή ή σε βιομηχανική βάση (Chardigny *et al.*, 2001). Τα γεωμετρικά ισομερή είναι επίσης παρόντα στα εξευγενισμένα έλαια, ειδικά σε αυτά που έχουν υποστεί φυσικό εξευγενισμό, εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών που επικρατούν. Τα βασικά ισομερή που προσδιορίζονται και στις δύο περιπτώσεις είναι το 9,12-*cis-trans* και το 9,12-*trans-cis*-δεκαοκτανικό (στεατικό) οξύ, τα οποία στη συνέχεια δημιουργούν συζευγμένα *cis-trans*, *trans-cis*, *trans-trans* διένια. Κατά την θερμική επεξεργασία των ελαίων σχηματίζονται πολλά ισομερή τριένια. Ο Grandgirard και οι συνεργάτες του (1984) προσδιόρισαν δι-*trans* και μόνο-*trans* ισομερή, όπως 18:3 $\Delta^{9c, 12c, 15t}$, 18:3 $\Delta^{9t, 12c, 15c}$, 18:3 $\Delta^{9c, 12t, 15c}$ και 18:3 $\Delta^{9c, 12t, 15t}$.

V) Προϊόντα αποικοδόμησης

Όπως διατυπώθηκε και παραπάνω, κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος, τα έλαια υποβαθμίζονται σχηματίζοντας πτητικά και μη πτητικά προϊόντα αποικοδόμησης (πιν. 3). Τα τρόφιμα που τηγανίζονται σε υποβαθμισμένα έλαια είναι δυνατόν να περιέχουν σημαντικά ποσά προϊόντων αποικοδόμησης τα οποία έχουν αρνητική επίδραση στην ασφάλεια, τη γεύση, την οσμή, το χρώμα και την υφή των τηγανιτών τροφίμων. Ενώ τα πτητικά συστατικά είναι κυρίως υπεύθυνα για τη γεύση και την οσμή, τα θερμικά πολυμερή δεν τις επηρεάζουν άμεσα. Για αυτόν το λόγο, τα θερμικά πολυμερή μπορεί να υπάρχουν σε ένα εδωδιμο προϊόν, αλλά οι συνθήκες που οδηγούν στον σχηματισμό τους δεν λαμβάνονται συνήθως υπόψη στην μαζική εστίαση (Warner, 2002).

A) Πτητικά προϊόντα αποικοδόμησης

Μια ποικιλία ενώσεων που περιλαμβάνουν αλδεΐδες, κετόνες, υδρογονάνθρακες και αλκοόλες προέρχονται από την αποικοδόμηση των υπεροξειδίων του υδρογόνου στις υψηλές θερμοκρασίες (Nawar, 1998). Ακόμα και στα απλά μοντέλα τηγανίσματος, χωρίς τροφίμα, σχηματίζονται εκατοντάδες πτητικές ενώσεις, οι οποίες σε θερμοκρασία τηγανίσματος, εγκαταλείπουν το έλαιο με αποτέλεσμα η σύνθεση του διαλύματος να μεταβάλλεται συνεχώς (Dobarganes *et al.*, 2000).

Οι Selke *et al.* (1977) ανίχνευσαν πτητικά συστατικά που παράγουν οσμές καθώς και τις πρόδρομες ενώσεις αυτών που προκύπτουν από την θέρμανση του σογιέλαιου, χρησιμοποιώντας μοντέλα τριγλυκεριδίων [καθαρή τριελαΐνη, μείγμα τριελαΐνης (25%)-τριστεατίνης, και ένα τυχαία εστροποιημένο τριγλυκερίδιο από στεατικό και 25% ελαϊκό οξύ]. Το κάθε μοντέλο από τα παραπάνω παρήγαγε τις ίδιες ενώσεις, οι οποίες ήταν οι παρακάτω: επτάνιο, οκτάνιο, επτανάλη, οκτανάλη, εννεάλη, 2-δεκανάλη, 2-ενδεκανάλη. Αργότερα, ο Selke και οι συνεργάτες (1980), ανέλυσαν καθαρή τριλινολεΐνη και μείγματα τριλινελαΐνης-τριστεατίνης, τριλινελαΐνης-τριελαΐνης-τριστεατίνης, τα οποία θερμάνθηκαν. Στα βασικά πτητικά συστατικά περιλαμβάνονταν το επτάνιο, η ακρολεΐνη, η πενταλάλη, η 1-πεντανάλη, η εξενάλη, η 2-εξανάλη, η 3-εξανάλη, 2-επτενάλη, 2-οκτενάλη, 2,4-δεκαδιενάλη και 4,5-επόξυ-2-ενάλη.

Εκτός από το έλαιο τηγανίσματος, άλλες σημαντικές πηγές πτητικών ενώσεων αποτελούν η οξειδωτική και θερμική αποικοδόμηση των λιπιδίων του τροφίμου, τα προϊόντα διάσπασης άλλων κύριων συστατικών του τροφίμου και οι ενώσεις που παράγονται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών του τροφίμου και την αλληλεπίδραση μεταξύ του τροφίμου και του ελαίου τηγανίσματος (Dobarganes *et al.*, 2000).

Η υπάρχουσα δυσκολία επικεντρώνεται στο να καθοριστεί ο μηχανισμός σχηματισμού των εκατοντάδων πτητικών ενώσεων που βρίσκονται στα έλαια τηγανίσματος ή στα τηγανιτά τρόφιμα (Ho *et al.*, 1983, Pokorný *et al.*, 1989, Takeoka *et al.*, 1996). Για παράδειγμα 135 πτητικές ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί στο τηγανητό μπέικον και σε αυτές περιλαμβάνονται υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, κετόνες, αλδεΐδες, οξέα, εστέρες, φαινόλες, πυραζίνες, φουράνες, θειζόλες, οξαζόλες, πυρρόλες, πυριδίνες κ.α. (Takeoka *et al.*, 1996).

Τέτοια πολύπλοκα μείγματα ενεργών συστατικών σε υψηλές θερμοκρασίες έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή πολλών διαφορετικών οσμών ταυτόχρονα. Για όλους

αυτούς τους λόγους, η ταυτοποίηση των πτητικών ενώσεων που παράγονται από την αντίδραση του λίπους τηγανίσματος και συστατικών του τροφίμου αποτελεί μια δύσκολη διαδικασία (Dobarganes *et al.*, 2000).

B) Μη πτητικά προϊόντα αποικοδόμησης

Τα μη πτητικά προϊόντα αποικοδόμησης σε υπερβολικά χρησιμοποιημένα έλαια τηγανίσματος περιλαμβάνουν πολυμερή τριγλυκεριδίων, παράγωγα οξειδωμένων τριγλυκεριδίων, κυκλικές ενώσεις και προϊόντα διάσπασης (Perkins, 1996). Το μη πολυμερισμένο μέρος των ελαίων περιλαμβάνει κυρίως αναλλοίωτα τριγλυκερίδια σε συνδυασμό με τα οξειδωμένα παράγωγά τους. Παράλληλα, περιλαμβάνει μονο- και διγλυκερίδια, ατελή γλυκερίδια, τριγλυκερίδια με κυκλικά λιπαρά οξέα και με διμερή λιπαρών οξέων, καθώς και οποιοδήποτε άλλο μη πτητικό συστατικό (Warner, 2002).

Οι Rojo και Perkins (1987) κατηγοριοποίησαν τα μη πτητικά προϊόντα αποικοδόμησης σε πολικούς ή μη πολικούς πολυμερείς μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων και σε μονομερείς μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων με αναλλοίωτους, αλλοιωμένους (οξειδωμένους, ισομερισμένους, κυκλοποιημένους κ.λ.π.) ή ατελείς εστέρες λιπαρών οξέων. Οι Clark και Serbia (1991) σημείωσαν ότι απαιτούνται μεγάλες πτώσεις στον αριθμό ιωδίου για να σχηματιστεί ένα σημαντικό ποσό αυτών των πολυμερών.

Οι Chang *et al.* (1978) μελέτησαν τα μη πολικά προϊόντα αποικοδόμησης από καθαρή τριλινελαΐνη, τριελαΐνη και τριστεατίνη. Απέδειξαν την παρουσία διμερών και στα τρία μίγματα τριγλυκεριδίων. Στα διμερή και τα ανώτερα πολυμερή που απομονώθηκαν από θερμασμένο καλαμποκέλαιο περιλαμβάνονταν καρβονυλικές και υδροξυλικές ομάδες (Firestone *et al.*, 1961).

Πίνακας 1.2.3 Πτητικά και Μη Πτητικά Προϊόντα Αποικοδόμησης στα Έλαια Τηγανίσματος (Warner, 2002)

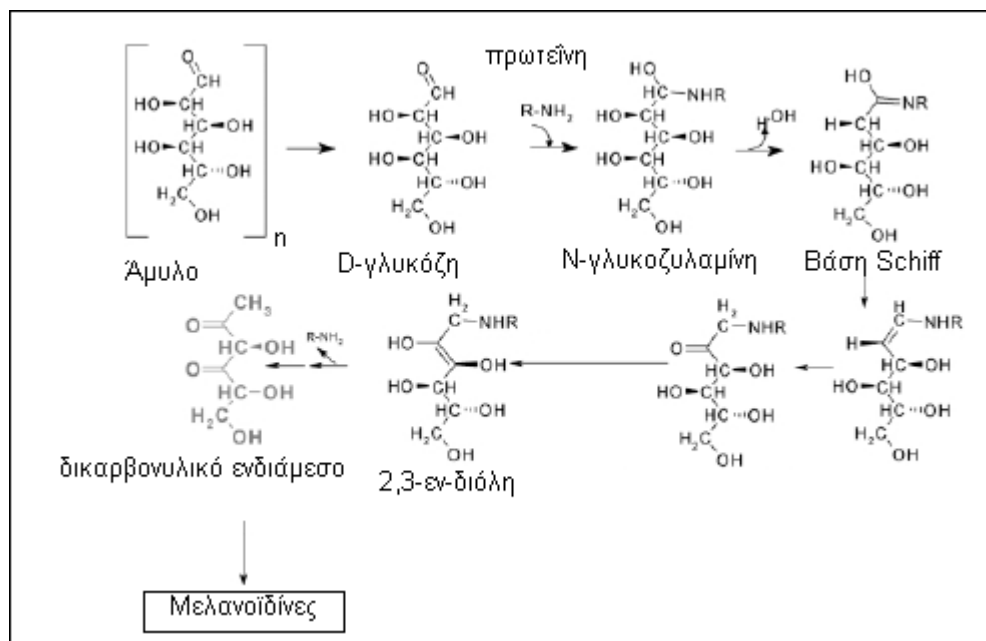
Μη Πτητικά Προϊόντα	Πτητικά Προϊόντα
Μονογλυκερίδια	Υδρογονάνθρακες
Διγλυκερίδια	Κετόνες
Οξειδωμένα τριγλυκερίδια	Αλδεΐδες
Διμερή τριγλυκεριδίων	Αλκοόλες
Τριμερή τριγλυκεριδίων	Εστέρες
Πολυμερή τριγλυκεριδίων	Λακτόνες
Ελεύθερα λιπαρά οξέα	

1.2.4 Άλλες μεταβολές και αντιδράσεις

Ι) Αντιδράσεις μη ενζυμικής αμαύρωσης

Α) Αντίδραση *Maillard*

Οι αντίδραση *Maillard* είναι γνωστή και ως αντίδραση αμαύρωσης καρβονυλίου – αμινομάδας. Είναι μία μη – ενζυμική αμαύρωση η οποία μπορεί να συμβεί σε όλα τα τρόφιμα που περιέχουν σάκχαρα και πρωτεΐνες ή αμινοξέα. Το πρώτο στάδιο της αντίδρασης περιλαμβάνει τον σχηματισμό μίας βάσης *Schiff* που είναι το προϊόν συμπύκνωσης της καρβονυλικής ομάδας και της αμινομάδας που προέρχονται από ένα ανάγον σάκχαρο και ένα ελεύθερο αμινοξύ ή μία πρωτεΐνη, αντιστοίχως. Το προϊόν της συμπύκνωσης κυκλοποιείται προς μία άζωτο-υποκατεστημένη γλυκοζυλαμίνη (Ανδρικόπουλος, 1999). Τα προϊόντα της συμπύκνωσης ενεργούν ως αυτοκαταλύτες για τις περαιτέρω αντιδράσεις ενολοποίησης, μετάθεσης *Amandori*, αφυδάτωσης, διάσπασης, κυκλοποίησης, πολυμερισμού, κλπ. Τα σκούρα έως μαύρα προϊόντα αυτής της σειράς των αντιδράσεων ονομάζονται μελανοΐδινες (Μπόσκου, 1997, Ανδρικόπουλος, 1999).



Σχήμα 1.2.4 Αντιδράσεις Maillard (Vattem *et al.*, 2003)

Όταν το τρόφιμο θερμαίνεται ή αφυδατώνεται η ενολοποίηση είναι ταχύτερη και γι' αυτό το λόγο οι προς άζωτο υποκατεστημένες γλυκοζυλαμίνες δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν. Έχουν όμως απομονωθεί οι ενώσεις Amadori, δηλαδή οι προς άζωτο υποκατεστημένες 1-αμινο-δεόξυ-2-κετόζες. Η πορεία της αντίδρασης είναι τέτοια ώστε ένα τμήμα της να οδηγεί από την 1,2-εν-αμινόλη στην υδροξυμεθυλοφουρφουράλη. Μια άλλη κατεύθυνση της αντίδρασης οδηγεί από τη 2,3-εν-διόλη με απομάκρυνση του αμινοξέος σε ένα α-δικαρβονυλικό ενδιάμεσο από το οποίο με μία νέα αμινική ομάδα προκύπτει μελανοΐδίνη, όπως ακριβώς συμβαίνει και με την 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (Μπόσκου, 1997).

Από τα ενδιάμεσα δικαρβονυλικά παράγωγα σχηματίζονται διάφορες ενώσεις όπως π.χ. η μαλτόλη. Τέτοιες αντιδράσεις γίνονται και στην καραμελοποίηση.

Το είδος των παρογόμενων τελικών προϊόντων εξαρτάται από το είδος του σακχάρου και το είδος του αμινοξέος ή της πρωτεΐνης που θα αντιδράσουν. Για παράδειγμα στις τηγανιτές πατάτες το είδος των αναγόντων σακχάρων είναι καθοριστικό (Ανδρικόπουλος, 1999). Η ταχύτητα αμαύρωσης ενός ανάγοντος σακχάρου σχετίζεται με την ευκολία διάνοιξης του δακτυλίου προς μία αναγωγική μορφή. Οι πεντόζες και η 2-δεόξυ-D-ριβόζη αμαυρώνονται ταχύτερα σε σχέση με τις εξόζες (Μπόσκου, 1997). Η σακχαρόζη ως μη ανάγουσα δεν συμμετέχει ενώ η λυσίνη και τα άλλα βασικά αμινοξέα έχουν μεγαλύτερη συμμετοχή λόγω των πλευρικών αμινομάδων

τους. Παράλληλα, στις αντιδράσεις *Maillard* παράγονται και πτητικά προϊόντα τα οποία επιδρούν στην οσμή του τελικού προϊόντος (Ανδρικόπουλος, 1999).

Μια άλλη κατεύθυνση στην αντίδραση *Maillard* είναι η αντίδραση Strecker. Σε υψηλές θερμοκρασίες α-δικαρβονυλικές ενώσεις όπως π.χ. η γλυοξάλη, η πυρουβική αλδεΐδη, το δεϋδρο-ασκορβικό οξύ κλπ. δίνουν με αμινοξέα αντιδράσεις τρανσαμίνωσης. Παράλληλα με την πυραζίνη που σχηματίζεται προκύπτει και μια αλδεΐδη (από το αμινοξύ) (Μπόσκου, 1997).

Οι αλδεΐδες που σχηματίζονται από την αντίδραση Strecker αλλά και οι πυραζίνες σε συνδυασμό με τα ενδιάμεσα προϊόντα αποικοδόμησης των σακχάρων δίνουν χαρακτηριστικά αρώματα στα τρόφιμα και γι' αυτό η αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται στην πράξη για την ανάπτυξη αρώματος στο ψωμί, το μέλι, τη σοκολάτα κλπ. (Μπόσκου, 1997).

Όσον αφορά τη σύνταξη των μελανοϊδινών, αυτή δεν είναι απόλυτα γνωστή. Γενικά η αντίδραση *Maillard* και τα προϊόντα της είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο και μερικώς μόνο γνωστό (Μπόσκου, 1997).

Παράγοντες που επιδρούν στην αντίδραση *Maillard* είναι το pH, η θερμοκρασία, η υγρασία του τροφίμου, η ενεργότητα του νερού καθώς και οι ποσότητες των σακχάρων και των πρωτεϊνών που περιέχονται στο τρόφιμο. Η αμαύρωση του αυτού τύπου δεν απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες αλλά ενισχύεται με την αύξηση της θερμοκρασίας (Ανδρικόπουλος, 1999).

Αποτέλεσμα της αντίδρασης *Maillard* φαίνεται να είναι και το ακρυλαμίδιο του οποίου ο σχηματισμός θα περιγράψει στο επόμενο κεφάλαιο.

B) Καραμελοποίηση

Είναι μια πολύπλοκη μεταβολή που προκαλείται στα σάκχαρα κατά την θέρμανση και μπορεί αν οφείλεται σε μία σειρά από αντιδράσεις, όπως ιμβερτοποίηση (του καλαμοσακχάρου), ενδομοριακή ή διαμοριακή συμπύκνωση, ισομερισμό αλδοζών προς κετόζες, αφυδάτωση, αμαύρωση κλπ. (Μπόσκου, 1997). Η καραμελοποίηση απαιτεί μόνο την παρουσία ενός σακχάρου, ανάγοντος ή μη, και υψηλές θερμοκρασίες (>186°C), μεγαλύτερες από το σημείο τήξης της ζάχαρης. Συνεπώς, πραγματοποιούνται διάφορες αντιδράσεις αφυδάτωσης υπό παραγωγή προϊόντων φουρφουράλης τα οποία μετά από μία σειρά ενδιάμεσων αντιδράσεων πολυμερίζονται προς τα τελικά σκουρόχρωμα προϊόντα της καραμελοποίησης. Στον μηχανισμό αυτό, ο οποίος δεν

είναι απολύτως γνωστός, συμμετέχουν και μικρές ποσότητες από ορισμένα οργανικά οξέα και άλατα. Ο καθοριστικός παράγοντας ελέγχου του φαινομένου είναι η θερμοκρασία (Ανδρικόπουλος, 1999).

Κατά την καραμελοποίηση από τη γλυκόζη σχηματίζονται τα ανυδρικά παράγωγα γλυκοζάνη και λαιβογλυκοζάνη, δηλ. η 1,2-ανυδρο- και 1,6-ανυδρο-α-D-γλυκόζη. Κατά τη θέρμανση, παρατηρείται υδρόλυση και αφυδάτωση η οποία συνοδεύεται από πολυμερισμό. Ένα χαρακτηριστικό προϊόν αυτών των μεταβολών είναι η ισοσακχαροζάνη, ανυδρικό παράγωγο με ελαφρώς πικρή γεύση. Όταν κατά τη θέρμανση έχει χαθεί το 9% του νερού του μορίου της σακχαρόζης έχει πλέον σχηματιστεί η χρωστική καραμελάνη ($C_{24}H_{36}O_{18}$) με απόσπαση τεσσάρων μορίων ύδατος από δύο μόρια σακχαρόζης. Περαιτέρω αφυδάτωση οδηγεί στην καραμελένη ($C_{36}H_{50}O_{25}$) και στην καραμελίνη, ένωση με πολύ πικρή γεύση (Μπόσκου, 1997).

Γενικά οι αντιδράσεις της καραμελοποίησης είναι πολύπλοκες και τα προϊόντα τους εξαρτώνται από τις συνθήκες και το pH. Πιστεύεται ότι το χαρακτηριστικό άρωμα της καραμέλας οφείλεται στον σχηματισμό αλκυλενολών, ισοκυκλικών (π.χ. μεθυλοκυκλοπεντενολόνη) ή ετεροκυκλικών (π.χ. μεθυλοφουρενολόνη) (Μπόσκου, 1997).

II) Αλλαγή χρώματος

Η επίδραση της θερμότητας στη δομή των χρωστικών, έχει σαν φυσικό επακόλουθο την αλλαγή του χρώματος των συστατικών του τροφίμου.

Για παράδειγμα, στο κρέας γίνονται μετατροπές της αίμο-, και μύο-γλοβίνης και των παραγώγων της, σε μέτα-μυογλοβίνη και μέθαιμο-γλοβίνη που έχουν καφέ χρώμα. Για την περίπτωση των τροφίμων που περιέχουν υδατάνθρακες, οι χρώσεις που εμφανίζονται οφείλονται κυρίως σε καραμελοποίηση των υδατανθράκων. Τέλος, στις λιπαρές ύλες του τροφίμου προκαλείται μεταβολή του χρώματος λόγω διασπάσεων, οξειδώσεων και πολυμερισμών που συμβαίνουν κατά τη θέρμανση (Δημόπουλος και Ανδρικόπουλος, 1996).

Παρόλο που οι κυριότερες αντιδράσεις που συμβάλλουν στο χαρακτηριστικό χρυσαφί χρώμα των τηγανισμένων τροφίμων θεωρούνται ότι είναι αντιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και υδατανθράκων (αντιδράσεις *Maillard*), τα λιπίδια μπορούν να παίξουν επίσης σημαντικό ρόλο στη μη ενζυμική αμαύρωση. Ειδικότερα, η αντίδραση μεταξύ

των προϊόντων οξειδωσης των λιπιδίων με αμίνες, αμινοξέα, και πρωτεΐνες έχει συσχετιστεί με την αμαύρωση που παρατηρείται σε πολλά τρόφιμα κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση (Dobarganes *et al.*, 2000).

Υπάρχουν ολοκληρωμένες πληροφορίες για την πολυπλοκότητα των αντιδράσεων μεταξύ των ενεργών ομάδων των πρωτεϊνών και των οξειδωμένων λιπιδίων (Pokorný, 1980, Pokorný, 1981, Hidalgo *et al.*, 2000). Η ένταση της αμαύρωσης είχε αρχικά συσχετισθεί με απώλειες λυσίνης, ιστιδίνης και μεθειονίνης ενώ ως δραστικές ενώσεις των λιπιδίων θεωρούνταν οι αλδεΐδες, τα εποξειδία, οι υδροξυκετόνες και οι δικαρβονυλικές ενώσεις (Pokorný, 1981). Ο πρώτος μηχανισμός που περιγράφηκε για την μη ενζυμική αμαύρωση είναι ο παρακάτω. Καρβονυλικές ενώσεις που προέρχονται από ακόρεστα λιπίδια συμπυκνώνονται με ελεύθερες αμινομάδες για να παράγουν ίμινο βάσεις *Schiff* οι οποίες πολυμερίζονται μέσω συμπύκνωσης με αλδόλες παράγοντας μελανόχρωμα μακρομόρια. Ένας πολύ πιο πρόσφατος μηχανισμός έχει προταθεί. Βασίζεται στην αλληλεπίδραση των επόξυ αλκεναλών και των ενεργών ομάδων των πρωτεϊνών, η οποία εξηγεί τον σχηματισμό πολύ πυρρολικών πολυμερών καθώς και τον σχηματισμό ετεροκυκλικών πτητικών ενώσεων (Hidalgo *et al.*, 2000).

III) Μετουσίωση πρωτεϊνών

Γίνεται κατά κύριο λόγο διάσπαση των δισουλφιδικών ($-S-S-$) δεσμών, οπότε καταστρέφεται η τριτοταγής δομή του πρωτεϊνικού μορίου, ενώ δεν παρατηρείται σημαντική αλλαγή του μοριακού βάρους.

Για την περίπτωση του κρέατος, οι αλβουμίνες του χυμού του κρέατος, οι οποίες έχουν μετουσιωθεί σχηματίζουν αφρώδεις νιφάδες. Στο αυγό η μετουσίωση έχει ως αποτέλεσμα τα γνωστά μορφολογικά αποτελέσματα (Δημόπουλος και Ανδρικόπουλος, 1996).

IV) Υδρόλυση κολλαγόνου και ζελατινοποίηση

Η διεργασία αυτή λαμβάνει χώρα στο κρέας με αποτέλεσμα να γίνεται περισσότερο μαλακό. Μεγάλη περιεκτικότητα σε υδρολυμένο κολλαγόνο έχουν οι σάλτσες που παρασκευάζονται με τηγάνισμα και περιέχουν διάφορα μέρη σώματος που είναι πλούσια σε κολλαγόνο, όπως μέρη του πεπτικού συστήματος (Δημόπουλος και Ανδρικόπουλος, 1996).

V) Αλλαγή της οσμής

Μέσω του τηγανίσματος, το τρόφιμο γίνεται περισσότερο εύοσμο . Οι οσμές που αναπτύσσονται οφείλονται σε διασπάσεις μορίων ή αντιδράσεις που καταλύονται από τη θερμοκρασία. Για παράδειγμα, πιστεύεται ότι η οσμή του κρέατος οφείλεται σε πολύπλοκο μίγμα ενώσεων που περιέχει ετεροκυκλικές ενώσεις, ακόρεστες αλκοόλες κλπ. Οι ενώσεις αυτές εξαρτώνται από το είδος του ζώου. Στα ψάρια η οσμή οφείλεται στην τριμεθυλαμίνη, τη διμεθυλαμίνη, την αμμωνία, τα πτητικά λιπαρά οξέα κλπ. Στα λίπη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατά το τηγάνισμα, σχηματίζονται ελεύθερα λιπαρά οξέα, διασπώνται διπλοί δεσμοί, σχηματίζονται μικρομοριακές ενώσεις, αλλά και προϊόντα πολυμερισμού, οξειδωσης κλπ. που όλα μαζί συμβάλλουν στην οσμή η οποία αναπτύσσεται. Η αλλαγές στην οσμή οφείλονται και στην μη ενζυμική αμαύρωση (Δημόπουλος και Ανδρικόπουλος, 1996).

Οι βασικές χημικές διεργασίες που έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ουσιών με χαρακτηριστική οσμή έχουν περιγραφεί από τον Pokorný (1999) και παρουσιάζονται στο σχήμα 1.2.8.α.

Πίνακας 1.2.4 Η συμβολή των τηγανιτών τροφίμων στην παραγωγή της χαρακτηριστικής οσμής του τηγανίσματος (Pokorný, 1999).

Αρχικό συστατικό του τροφίμου	Μεταβολή που συμβαίνει κατά το τηγάνισμα	Προϊόντα με χαρακτηριστική οσμή
Σάκχαρα	Πυρόλυση (Καραμελοποίηση), Σχηματισμός προϊόντων <i>Maillard</i> και θερμική αποικοδόμηση αυτών	Παράγωγα φουρανών, Παράγωγα πυρρολίου
Αμινοξέα και πρωτεΐνες	Άμεση πυρόλυση, Απαμίνωση, Αλληλεπίδραση με πτητικές αλδεϋδες, Αντιδράσεις <i>Maillard</i> και <i>Stecker</i>	Αλδεϋδες, Πυραζίνες, Αλδεϋδικά και αμινικά παράγωγα
Θειούχες ενώσεις	Πυρόλυση, Οξειδωση, Αλληλεπίδραση με πτητικές αλδεϋδες	Θειόλες, Σουλφίδια, Θειαζίνες, Τριθειολάνες
Λιπίδια του τροφίμου	Οξειδωση και διάσπαση, Αλληλεπίδραση με αμίνες και με θειούχες ενώσεις	Αλδεϋδες, Πυρρόλες, Θειόλες, Σουλφίδια
Φαινόλικά συστατικά	Οξειδωση, Πυρόλυση	Αρωματικά παράγωγα
Τερπένια	Οξειδωση, Συμπύκνωση και Πολυμερισμός	Οξυγονωμένα προϊόντα

VI) Ελάττωση των βιταμινών

Κατά το τηγάνισμα καταστρέφονται τα αντιοξειδωτικά και οι βιταμίνες σε μεγαλύτερη έκταση από ότι κατά το βράσιμο. Πιστεύεται όμως ότι η μείωση της θρεπτικής αξίας του τροφίμου κατά το τηγάνισμα, είναι παρόμοια με εκείνη κατά το ψήσιμο. Σε γενικές γραμμές, οι λιποδιαλυτές βιταμίνες (A, D, E, K) δεν καταστρέφονται τόσο εύκολα όσο οι υδατοδιαλυτές (βιταμίνες του συμπλέγματος B και η βιταμίνη C). Ωστόσο, οι λιποδιαλυτές βιταμίνες εκχυλίζονται πιο εύκολα στην λιπαρή ύλη που χρησιμοποιείται για το τηγάνισμα (Δημόπουλος και Ανδρικόπουλος, 1996).

VII) Αλλαγή των ιδιοτήτων του τροφίμου ως προς την πέψη

Όπως για κάθε τρόπο μαγειρέματος, έτσι και κατά το τηγάνισμα το τρόφιμο γίνεται πιο εύπεπτο, διότι διασπώνται τα θρεπτικά συστατικά του, με αποτέλεσμα να μπορεί πιο εύκολα ο οργανισμός να τα διασπάσει περαιτέρω στο πεπτικό σύστημα μέσω της πέψης. Επίσης, μειώνεται κατά κάποιο τρόπο η θρεπτική αξία των πρωτεϊνών, αφού από τις αντιδράσεις που γίνονται ανάμεσα στα σάκχαρα και τις πρωτεΐνες (αντιδράσεις *Maillard*) καταστρέφονται κάποια αμινοξέα (Δημόπουλος και Ανδρικόπουλος, 1996).

VIII) Καταστροφή του λιπώδους ιστού

Επειδή μετουσιώνονται οι πρωτεΐνες στα λιπώδη κύτταρα, η κυτταρική τους μεμβράνη καταστρέφεται και το λίπος καθώς και τα υπόλοιπα συστατικά που περιέχονται μέσα τους μεταφέρονται στους γύρω ιστούς. Όπως έχει αναφερθεί, ένα μέρος του λίπους αυτού μεταφέρεται στα έλαια τηγανίσματος.

1.2.5 Συμπεράσματα

Συμπεραίνοντας, θα λέγαμε ότι είναι σημαντικό να γίνουν περαιτέρω έρευνες που να μελετούν την πολυπλοκότητα των αντιδράσεων και των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος. Πρέπει να μελετηθεί η ταυτόχρονη επίδραση πολλών διαφορετικών παραγόντων που σχετίζονται με τη διαδικασία τηγανίσματος, το έλαιο τηγανίσματος και το τρόφιμο (Dobarganes *et al.*, 2000). Σκοπός είναι η βελτιστοποίηση της διαδικασίας τηγανίσματος μέσα από ελεγχόμενες συνθήκες,

η παραγωγή τηγανιτών τροφίμων καλύτερης ποιότητας και η δημιουργία ελαίων τηγανίσματος με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (Warner, 2002).

1.3 Μέθοδοι ελέγχου της ποιότητας των τηγανισμένων ελαίων

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ποιότητας των ελαίων τα οποία έχουν υποστεί θερμική κατεργασία μέσω του τηγανίσματος μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει σχετικά απλές και τυποποιημένες μεθόδους όπως το χρώμα, ο αριθμός υπεροξειδίων, ο αριθμός ανισιδίνης, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, ο αφρισμός, το σημείο καπνού, το ιξώδες καθώς και άλλους ταχείς προσδιορισμούς που βασίζονται στη μέτρηση της διηλεκτρικής σταθεράς και σε χρωματικούς δείκτες. Οι μέθοδοι αυτής της κατηγορίας είναι εύχρηστοι και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αναλύσεις ρουτίνας. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει πιο πολύπλοκες μεθόδους που βασίζονται στις τεχνικές της αέριας και υγρής χρωματογραφίας καθώς και σε άλλες, λιγότερο ή περισσότερες πολύπλοκες, διαδικασίες απαραίτητες για να προσδιοριστούν συγκεκριμένα προϊόντα της υδρόλυσης και της θερμικής οξειδωσης (Boskou, 2002).

1.3.1 Παραδοσιακές και τυποποιημένες μέθοδοι (Boskou, 2002)

Ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων συμβαίνει, μέχρι ενός βαθμού, παράλληλα με άλλες διαδικασίες αποικοδόμησης. Η μέτρηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων από μόνη της δεν αποτελεί αντικειμενική μέθοδο ελέγχου της ποιότητας του ελαίου τηγανίσματος.

Αριθμός ιωδίου. Ο αριθμός ιωδίου αποτελεί μέτρο της ακορεστότητας του ελαίου ή λίπους τηγανίσματος. Η πτώση του αριθμού ιωδίου σχετίζεται με μείωση του πλήθους των διπλών δεσμών στο έλαιο καθώς αυτό οξειδώνεται.

Χρώμα. Κατά την διάρκεια του τηγανίσματος το έλαιο γίνεται πιο σκούρο. Η μεταβολή του χρώματος μπορεί να μετρηθεί με χρωματόμετρο Lovibond. Για την γρήγορη αξιολόγηση του χρώματος είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν χρωματικά εργαλεία σύγκρισης (comparison kits). Όπως και στη περίπτωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων, το χρώμα του ελαίου τηγανίσματος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από μόνο του για την αξιολόγηση της ποιότητας των τηγανισμένων ελαίων.

Αριθμός υπεροξειδίων. Αποτελεί ένα δείκτη οξείδωσης ο οποίος πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή εξαιτίας του γεγονότος ότι σε υψηλές θερμοκρασίες τα υδροϋπεροξειδία αποκοδομούνται με πιο γρήγορους ρυθμούς από ότι σχηματίζονται. Συνεπώς η υποβάθμιση του ελαίου δεν μπορεί να μετρηθεί με τον αριθμό υπεροξειδίων.

Σημείο καπνού. Το σημείο καπνού είναι μία πολύ σημαντική παράμετρος για τα εστιατόρια καθώς συμβάλει στον προσδιορισμό του σημείου στο οποίο πρέπει να αντικατασταθεί το έλαιο τηγανίσματος. Η μέτρηση αυτή βασίζεται στο σχηματισμό πτητικών ενώσεων.

Δοκιμασία αφρισμού. Τις περισσότερες περιπτώσεις ο υπερβολικός αφρισμός του ελαίου κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος υποδεικνύει την ανάγκη αντικατάστασης του. Ο αφρισμός οφείλεται στην αύξηση του ιξώδους, σε γαλακτοματοποιητές και σταθεροποιητές που σχηματίζονται από το έλαιο και το τρόφιμο κατά το τηγάνισμα.

Ιξώδες. Κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος το ιξώδες αυξάνεται λόγω του σχηματισμού ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους. Το έλαιο που χαρακτηρίζεται από αυξημένο ιξώδες απορροφάται πιο εύκολα από το τρόφιμο με αποτέλεσμα αυτό να είναι περισσότερο λιπαρό.

Αριθμός ανισιδίνης. Αυτή η δοκιμασία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αλδεϋδών, οι οποίες αποκοδομούνται σχετικά δύσκολα. Συνεπώς, αυτή η μέτρηση είναι περισσότερο σημαντική από τον αριθμό υπεροξειδίων.

Δοκιμασία totox. Ο αριθμός αυτός ισούται με (2x αριθμό υπεροξειδίων) + αριθμός ανισιδίνης.

Συζυγικά διένια. Αυτή η δοκιμασία αποτελεί μέτρο των συζυγιακών διπλών δεσμών. Η δοκιμασία πραγματοποιείται με μέτρηση της απορρόφησης στα 232 και 268 nm.

Αριθμός καρβονυλίου. Αποτελεί μέθοδο μέτρησης των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης και πραγματοποιείται με τη μέθοδο της 2,4-δινιτροφαινυλο-υδραζίνης.

Δείκτης διάθλασης. Αποτελεί έναν απλό τρόπο ελέγχου της υποβάθμισης του ελαίου τηγανίσματος. Η μέτρησή του συνήθως προγραμματίζεται σε θερμοκρασία 40°C.

Σύνθεση σε λιπαρά οξέα. Η προσδιορισμός της σύνθεσης του ελαίου σε λιπαρά οξέα πραγματοποιείται με αεριοχρωματογραφικό προσδιορισμό των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με σκοπό να ελεγχθούν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα.

1.3.2 Ταχείες δοκιμασίες

Οι ταχείες δοκιμασίες βασίζονται σε χημικές αντιδράσεις και σε φυσικές ιδιότητες. Οι ταχείες χημικές διαδικασίες που χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία είναι δυνατόν να προσδιορίζουν το χρώμα, τον αφρισμό ή τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Αυτές οι δοκιμασίες είναι χρήσιμες όταν η αρχική σύνθεση του ελαίου και του τροφίμου που τηγανίζεται σε αυτό είναι ίδιες και οι συνθήκες τηγανίσματος δεν μεταβάλλονται.

Οι δύο πιο σημαντικές ταχείες δοκιμασίες που βασίζονται σε φυσικές ιδιότητες είναι η μέτρηση της μεταβολής του ιξώδους και της διηλεκτρικής σταθεράς. Στον πίνακα 1.3.2 παρουσιάζονται περιληπτικά οι διάφορες ταχείες δοκιμασίες για τα χρησιμοποιημένα λίπη και έλαια (Boskou, 2002).

Πίνακας 1.3.2 Ταχείες δοκιμασίες για τα λίπη και έλαια (Stier, 1996)

Φυσικές δοκιμασίες χωρίς όργανα
Αφρισμός Ανάπτυξη Χρώματος Διαύγεια
Φυσικές δοκιμασίες με όργανα
Ιξώδες Fri-Check, Fri-Check Eco (ιξώδες, πυκνότητα, επιφανειακή τάση) Optifry (διηλεκτρική σταθερά) Food Oil Sensor (διηλεκτρική σταθερά) FOM 200 (διηλεκτρική σταθερά) Frotty (διηλεκτρική σταθερά) Testo 265 (διηλεκτρική σταθερά) Φάσμα εγγύς υπερύθρου Electronic nose
Χημικές δοκιμασίες με όργανα COAT (Cooking Oil Analysis Technique) RULER (Remaining Useful Life Evaluation Routine) CPT 120 (ολικά πολικά συστατικά)
Γρήγορες χημικές δοκιμασίες
Oxifrit (χρωστική) Fritest (χρωστική) ACM (Alcaline Contaminant Materials) PCM (Polar Contaminant Materials) TPM, FFA, WET AV-Chech (οξύτητα) LRSM (οξύτητα)

1.3.3 Οργανοληπτική δοκιμασία

Η οργανοληπτική δοκιμασία των τηγανιτών τροφίμων πραγματοποιείται από εξειδικευμένους γευσιγνώστες οι οποίοι εξετάζουν το χρώμα, την υφή, το άρωμα και τη γεύση του τηγανιτού τροφίμου (Boskou, 2002).

1.3.4 Ολικά πολικά συστατικά (TPM)

Σε πολλές χώρες, ο έλεγχος των χρησιμοποιημένων ελαίων τηγανίσματος πραγματοποιείται με ποσοτικοποίηση των ολικών πολικών συστατικών. Η μέθοδος προσδιορισμού βασίζεται στην προσρόφηση των πολικών συστατικών πάνω σε στήλη από silica gel. Για τον προσδιορισμό των ολικών πολικών συστατικών έχουν αναπτυχθεί συγκεκριμένες εγκεκριμένες μέθοδοι (IUPAC, AOAC) (Boskou, 2002).

1.3.5 Πολυμερισμένα τριγλυκερίδια (PT)

Τα πολυμερισμένα τριγλυκερίδια αποτελούν ένα σημαντικό κλάσμα των πολικών συστατικών και χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση των μεταβολών που συμβαίνουν κατά το τηγάνισμα. Ο προσδιορισμός τους πραγματοποιείται με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης και έχουν αναπτυχθεί συγκεκριμένες εγκεκριμένες μέθοδοι (IUPACK, AOAC) (Boskou, 2002).

1.3.6 Πρόβλεψη της σταθερότητας του ελαίου τηγανίσματος

Οι Gertz *et al.* (2000) πρότειναν μία μέθοδο προσδιορισμού της οξειδωτικής σταθερότητας σε υψηλές θερμοκρασίες (oxidative stability at elevated temperatures, OSET). Το έλαιο θερμαίνεται στους 170°C για 2 ώρες αφού προηγουμένως έχει αναμιχθεί με silica gel. Στη συνέχεια ακολουθεί προσδιορισμός των πολυμερισμένων τριγλυκεριδίων (κυρίως μη πολικά διμερή και ολιγομερή) χρησιμοποιώντας HPLC και υπολογίζεται ο αριθμός OSET.

1.3.7 Κριτήρια που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των τηγανισμένων ελαίων

Ανάμεσα στις διαφορές μεθόδους ελέγχου των ελαίων τηγανίσματος, πιο αξιόπιστες θεωρούνται: ο προσδιορισμός των ολικών πολικών συστατικών (TPM), των αδιάλυτων σε πετρελαϊκό αιθέρα οξειδωμένων λιπαρών οξέων (OXF), και των πολυμερισμένων τριγλυκεριδίων (PT). Αυτές οι μέθοδοι είναι διεθνώς αποδεκτές. Τα όρια που έχουν τεθεί

διαφοροποιούνται από χώρα σε χώρα. Παρόλα αυτά ευρέως αποδεκτά είναι τα δύο παρακάτω κριτήρια:

1. TPM < 24%
2. PT < 12% (DGF, 2000)

Στον πίνακα 1.3.7 συνοψίζονται οι μέθοδοι προσδιορισμού των προϊόντων αποικοδόμησης σε έλαια τηγανίσματος.

Πίνακας 1.3.7.α Σύνοψη των μεθόδων προσδιορισμού των προϊόντων αποικοδόμησης σε έλαια τηγανίσματος (Warner, 2002).

Προσδιορισμός μη πτητικών συστατικών
Αριθμός ιωδίου Σύνθεση σε λιπαρά οξέα Ολικά πολικά συστατικά Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης Ελεύθερα λιπαρά οξέα Διηλεκτρική σταθερά Χρώμα Ιξώδες Σημείο καπνού Αφρισμός
Προσδιορισμός μη πτητικών συστατικών
Αριθμός υπεροξειδίων Συζυγιακά διένια Οργανοληπτική ανάλυση (άρωμα, γεύση)

1.4 Επικίνδυνες ουσίες που παράγονται κατά το τηγάνισμα

Το ενδιαφέρον για κινδύνους που σχετίζονται με τις επικίνδυνες ουσίες που παράγονται κατά το τηγάνισμα συνεχώς αυξάνεται. Έχουν διεξαχθεί πολλές δοκιμές σε πειραματόζωα για τον προσδιορισμό των κινδύνων που προκύπτουν από την κατανάλωση υποβαθμισμένων λιπών και ελαίων τηγανίσματος (Paul and Mittal, 1997). Έχει διαπιστωθεί ότι η θέρμανση των λιπών έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό δυνητικά επικίνδυνων ενώσεων για την υγεία του ανθρώπου. Οι ενώσεις αυτές μπορεί να είναι αναστολείς ενζύμων, ουσίες που συμβάλλουν στη διάσπαση βιταμινών, προϊόντα οξειδωσης του λίπους, ουσίες που προκαλούν ερεθισμό του γαστρεντερικού συστήματος, δυνητικά μεταλλαξογόνες ουσίες κ.α. (Clark and Serbia, 1991). Τα υπερβολικά θερμασμένα έλαια έχουν αποδειχθεί τοξικά σε πειραματόζωα. Παράλληλα έχουν παρατηρηθεί υψηλοί δείκτες θνησιμότητας (Billek, 2000). Τα ολικά πολικά

συστατικά των τηγανισμένων ελαίων, σε υπερβολικά μεγάλες δόσεις, οδηγούν στην εμφάνιση των παρακάτω συμπτωμάτων: καθυστέρηση της ανάπτυξης, διόγκωση των νεφρών και του ήπατος, διαταραχή των ενζυμικών συστημάτων (Billek, 2000).

Οι ενώσεις των υποβαθμισμένων ελαίων που έχουν χαρακτηριστεί ως τοξικές είναι οι παρακάτω (Sanders, 1989):

- Υδροϋπεροξειδία
- Υδρόξυ λιπαρά οξέα
- Καρβονυλικές ενώσεις
- Κυκλικά μονομερή
- Διμερή και πολυμερή
- Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
- Προϊόντα οξείδωσης και οξειδωμένες στερόλες

Ο σχηματισμός υδροϋπεροξειδίων κατά το τηγάνισμα είναι πολύ σημαντικός από τοξικολογικής άποψης (Viola and Bianchi, 1988). Τα υδροϋπεροξειδία είναι δυνατόν να ενεργοποιήσουν ή να καταστείλουν κάποια ένζυμα (Sanders, 1989). Τα υδροϋπεροξειδία του λινελαϊκού έχουν αναφερθεί ότι μπορούν να αναστείλουν ή να ενεργοποιήσουν *in vitro* τη δραστηριότητα της ριβονουκλεάσης, της πεψίνης, της θρυψίνης και της παγκρεατικής λιπάσης (Matsushitta, 1975).

Τα υδρόξυ λιπαρά οξέα είναι κυρίως υπεύθυνα για οξέα συμπτώματα, όπως είναι η διάρροια (Alexander, 1986). Έχει αναφερθεί ότι τα υδροξυλιωμένα έλαια προκαλούν διαταραχή της ηπατικής λειτουργίας, αύξηση των λιπιδίων και της χοληστερόλης του αίματος καθώς και διαταραχές στη σπερματογένεση (Lang *et al.*, 1963).

Έχει αποδειχθεί οι καρβονυλικές ενώσεις παρουσιάζουν ήπια μεταλλαξογόνο δράση (Takeoka, 1996). Η μαλοναλδεΐδη έχει χαρακτηριστεί ως μεταλλαξογόνος και καρκινογόνος ουσία (Sanders, 1989).

Τα κυκλικά μονομερή, που δεν σχηματίζονται μόνο σε ακραίες συνθήκες τηγανίσματος, εμφανίζουν τοξική δράση σε πειραματόζωα μόνο όταν χορηγούνται σε μεγάλες δόσεις. Αντίθετα, η χορήγηση των ελαίων τηγανίσματος που περιέχουν κυκλικά μονομερή δεν έχει φανεί να προκαλεί παρόμοια συμπτώματα (Artman, 1972).

Τα πολυμερισμένα συστατικά των ελαίων τηγανίσματος απορροφούνται ελάχιστα από το γαστρεντερικό σύστημα αλλά είναι δυνατόν να αλληλεπιδράσουν με το περιεχόμενο του γαστρεντερικού αυλού και να επηρεάσουν την απορρόφηση των

λιποδιαλυτών βιταμινών (Sanders, 1989). Η υδρόλυση των διμερών και των πολυμερών των τριγλυκεριδίων από την παγκρεατική λιπάση δυσχεραίνεται καθώς αυξάνεται το μοριακό βάρος αυτών των ενώσεων (Marquez-Ruiz *et al.*, 1992). Γενικά τα πολυμερή και διμερή των τριγλυκεριδίων δεν παρουσιάζουν τοξικές δράσεις στον οργανισμό (Leonard, 1979).

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες είναι δυνητικά τοξικοί και καρκινογόνοι (Sanders, 1989).

Αυξημένο ενδιαφέρον παρουσιάζεται για τα προϊόντα οξειδωσης των στερολών επειδή παρουσιάζουν αρνητικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Τα προϊόντα οξειδωσης της χοληστερόλης έχουν εξεταστεί για πιθανή μεταλλαξογόνο, κυτταροτοξική και καρκινογόνο δράση. Πιστεύεται ότι οι οξυστερόλες, σε δόσεις μεγαλύτερες από αυτές που λαμβάνονται μέσω της τροφής, καταστέλλουν τη βιοσύνθεση της ενδογενούς χοληστερόλης και προκαλούν καταστροφή των αρτηριών (Boskou, 2002).

Οι Kaliora *et al.* (2003) έδειξαν ότι η *trans-trans*-2,4-δεκαδιενάλη προκαλεί *in vitro* οξείδωση της LDL χοληστερόλης. Παράλληλα, έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η *trans-trans*-2,4-δεκαδιενάλη παρουσιάζει γονιδιοτοξική και κυτταροτοξική δράση σε A-549 κύτταρα (που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα) και προκαλεί οξειδωτικές βλάβες στο DNA (Wu and Yen, 2004). Επίσης η *trans-trans*-2,4-δεκαδιενάλη έχει συσχετιστεί με αθηροσκλήρυνση σε επιδημιολογικές μελέτες. Έχει βρεθεί ότι η *trans-trans*-2,4-δεκαδιενάλη προκαλεί καθυστέρηση της ανάπτυξης των επιθυλιακών κυττάρων του πνεύμονα καθώς και οξειδωτικό στρες σε αυτά (Tung *et al.*, 2001).

Το ακρυλαμίδιο είναι άλλη μία δυνητικά επικίνδυνη ουσία που παράγεται κατά το τηγάνισμα των πλούσιων σε υδατάνθρακες τροφίμων. Οι επιπτώσεις του ακρυλαμιδίου στην υγεία θα αναλυθούν εκτενώς στο επόμενο κεφάλαιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Το ακρυλαμίδιο

2.1 Γενικά για το ακρυλαμίδιο

Το ακρυλαμίδιο (ή 2- προπτεναμίδιο, χημικός τύπος $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$) είναι μία άχρωμη και άοσμη κρυσταλλική ένωση με σημείο τήξης $84,5^\circ\text{C}$, θερμοκρασία στην οποία πολυμερίζεται. Είναι διαλυτό στο νερό, την ακετόνη και τις αλκοόλες. Εμφανίζει τη μέγιστη διαλυτότητά στο νερό. Χρησιμοποιείται στο τσιμέντο, στη σύνθεση πολυμερών (πολυακρυλαμίδιου) και πηκτών. Το πολυακρυλαμίδιο χρησιμοποιείται στη βιομηχανική παραγωγή χάρτου για την αύξηση της ανθεκτικότητας του χαρτιού και ως πρόσθετο για τον καθαρισμό του προς πόσιν ύδατος. Επίσης, το πολυακρυλαμίδιο χρησιμοποιείται από τα εργαστήρια σαν υλικό ηλεκτροφόρησης (Friedman *et al.*, 2003).

Οι αναθυμιάσεις του ακρυλαμίδιου προκαλούν ερεθισμό στα μάτια και το δέρμα καθώς και παράλυση του νευρικού συστήματος. Έχει αποδειχθεί ότι έχει καρκινογόνο δράση στα ζώα (Johnson *et al.*, 1984). Ο IARC (International Agency for Research in Cancer) έχει χαρακτηρίσει το ακρυλαμίδιο σαν ένα «πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο» (IARC, 1994) και το έχει ταξινομήσει στην Κατηγορία III A2.

Το γεγονός ότι το ακρυλαμίδιο ήταν ανιχνεύσιμο στο αίμα ατόμων που δεν εκτίθεντο επαγγελματικά ή περιβαλλοντικά (μέσω του καπνού του τσιγάρου) στο ακρυλαμίδιο οδήγησε σε στην αναζήτηση άλλων πιθανών πηγών ακρυλαμίδιου. Η υπόθεση ότι το ακρυλαμίδιο μπορεί να σχηματίζεται κατά τη θερμική επεξεργασία των τροφίμων διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τους Σουηδούς επιστήμονες Tareke *et al.* (2000), του Πανεπιστημίου της Στοκχόλμης. Η παρατήρησή τους όμως δεν λήφθηκε σοβαρά υπόψη μέχρι τον Απρίλιο του 2002, οπότε οι ίδιοι ερευνητές μαζί με τον Swedish National Food Authority ανακοίνωσαν ότι το ακρυλαμίδιο ανιχνεύτηκε σε ένα εύρος μαγειρεμένων τροφίμων (Swedish National Food Authority, 2002, Tareke *et al.*, 2002). Αυτά τα τρόφιμα ήταν κυρίως αμυλούχα και πλούσια σε υδατάνθρακες, όπως τηγανιτές πατάτες, μπισκότα και δημητριακά. Τα επίπεδα που αναφέρθηκαν ήταν της τάξης των ppb ($\mu\text{g}/\text{Kg}$).

Δεν έχουν τεθεί ανώτατα επιτρεπτά επίπεδα πρόσληψης για το ακρυλαμίδιο. Τα μόνα όρια που υπάρχουν αναφέρονται στο πόσιμο νερό. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχει θέσει ως όριο τα 0,5 μg/L νερού, για τις περισσότερες χώρες (WHO 1985, 1996). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση το νόμιμο όριο που έχει οριστεί είναι 0,1 μg/L. Ακόμα, στον τομέα των τροφίμων, στην Ευρωπαϊκή Ένωση έχουν τεθεί όρια για τη μετανάστευση του ακρυλαμιδίου από το πλαστικό της συσκευασίας στα τρόφιμα (<10 μg/Kg) (ECC, 1992).

Στις επόμενες παραγράφους θα αναπτυχθούν τα σημαντικότερα θέματα που αφορούν το ακρυλαμίδιο.

2.2 Κίνδυνοι που προκύπτουν από τη διαιτητική πρόσληψη του ακρυλαμιδίου στον άνθρωπο και τα πειραματόζωα

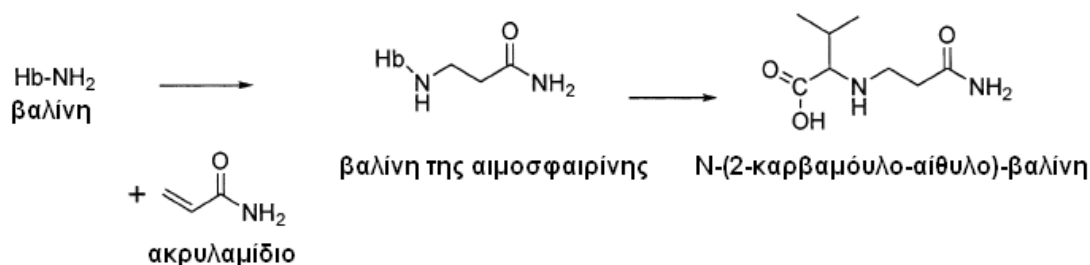
2.2.1 Εισαγωγικά

Στους ανθρώπους και τα ζώα, το ακρυλαμίδιο απορροφάται μέσω της εντερικής και τις αναπνευστικής οδού καθώς και από το δέρμα (Friedman, 2003). Στα πειραματόζωα, κατανέμεται ευρέως στους ιστούς καθώς και στο έμβρυο κατά την κύηση. Έχει επίσης βρεθεί στο ανθρώπινο μητρικό γάλα. Το ακρυλαμίδιο μεταβολίζεται σε ένα χημικά δραστήριο επόξυ-παράγωγο, το γλυκιδαμίδιο (glycidamide), με μία αντίδραση που καταλύεται από το κυτόχρωμα P450 2E1. Το ακρυλαμίδιο και οι μεταβολίτες του αποβάλλονται ταχύτατα από τα ούρα, κυρίως συζευγμένοι με μερκαππουρικό οξύ. Η βιοδιαθεσιμότητα του ακρυλαμιδίου έχει υπολογιστεί μεταξύ 23-48% σε τρωκτικά στα οποία χορηγήθηκε μία δόση 0,1 mg/Kg σωματικού βάρους από το στόμα και η μέτρηση έγινε μετά από διάστημα 30 min (JECFA, 2005).

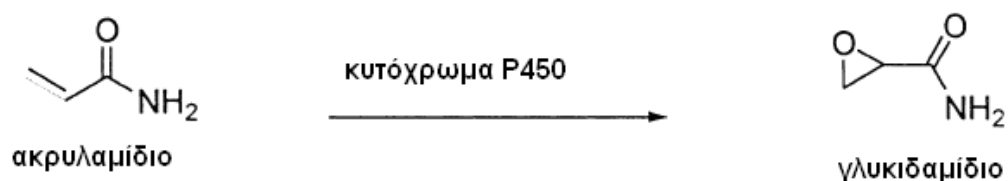
Το γλυκιδαμίδιο αντιδρά πιο έντονα από το ακρυλαμίδιο με το DNA και έχουν ανιχνευτεί *in vitro* αρκετά σύμπλοκα του με πουρίνες. Τα σύμπλοκα του γλυκιδαμιδίου με το DNA έχουν ανιχνευτεί στο ήπαρ, τους πνεύμονες, τους όρχεις, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα νεφρά ποντικών και στο ήπαρ, το θυρεοειδή αδέν, τους όρχεις, τους μαστικούς αδένες, το μυελό των οστών, τα λευκά αιμοσφαίρια και τον εγκέφαλο αρουραίων που εκτέθηκαν σε ακρυλαμίδιο (JECFA, 2005).

Το ακρυλαμίδιο και το γλυκιδαμίδιο συνδέονται ομοιοπολικά με αμινοξέα που βρίσκονται στην αιμοσφαιρίνη (JECFA, 2005). Τα σύμπλοκα σχηματίζονται σαν αποτέλεσμα της αντίδρασης της α-NH₂ ομάδας της βαλίνης, που βρίσκεται στο αμινοτελικό (N-τελικό) άκρο της αιμοσφαιρίνης, με το ακρυλαμίδιο [N-(2-καρβαμόυλο-

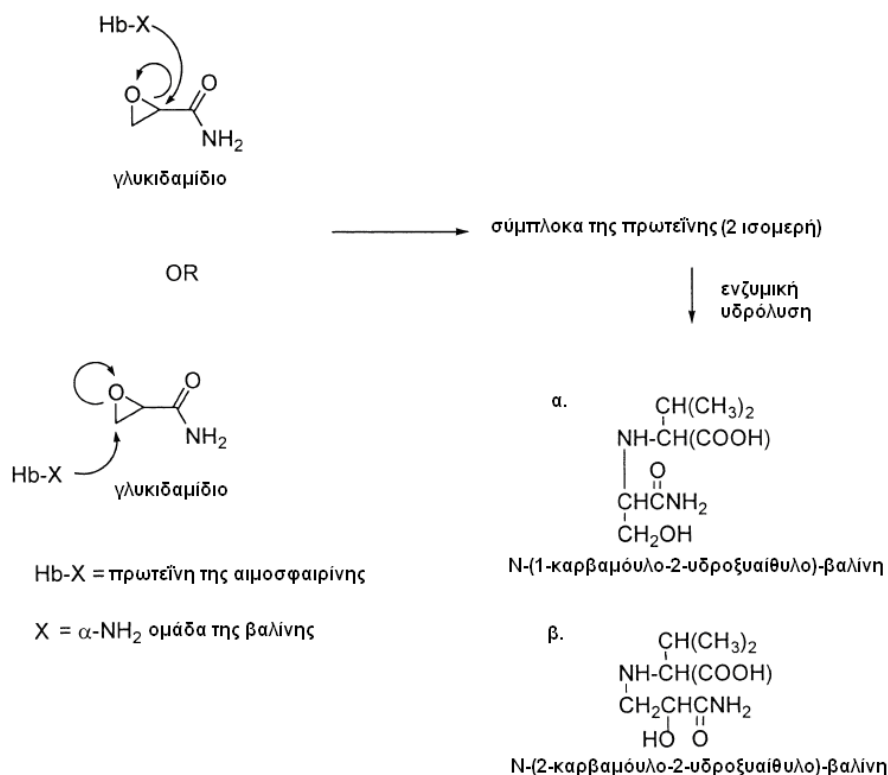
αίθυλο)-L-βαλίνη] ή το γλυκιδαμίδιο [N-(2-καρβαμόυλο-2-υδροξυαίθυλο)-RS-βαλίνη]. Τα σύμπλοκα αυτά αποτελούν χρήσιμους βιολογικούς δείκτες της έκθεσης του ανθρώπου στο ακρυλαμίδιο (Perez *et al.*, 1999, Tornqvist *et al.*, 2001, Paulsson *et al.*, 2002). Ενδεικτικά, τα επίπεδα του συμπλόκου του ακρυλαμιδίου που έχουν ανιχνευτεί σε ανθρώπινο αίμα είναι: 31 pmol/g σφαιρίνης σε μη καπνιστές, 54 pmol/g σε προσωπικό που μεταχειρίζεται ακρυλαμίδιο, 116 pmol/g σε καπνιστές. Τα σύμπλοκα της αιμοσφαιρίνης σε μη καπνιστές είναι πιθανό να οφείλονται στη διαίτα (Bergmark, 1997). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και από άλλες έρευνες (Schettgen *et al.*, 2002, 2003, Hagmar *et al.*, 2001). Η μακράς διάρκειας ημιζωή της αιμοσφαιρίνης υποδεικνύει ότι τα επίπεδα των συμπλόκων στο αίμα αντανakλούν την μέση έκθεση ενός ατόμου στη διάρκεια ζωής ενός ερυθροκυττάρου (JECFA, 2005).



Σχήμα 2.2.1.α Δημιουργία συμπλόκου μεταξύ του ακρυλαμιδίου και της N-βαλίνης της αιμοσφαιρίνης (Friedman, 2003).



Σχήμα 2.2.1.β Μεταβολισμός του ακρυλαμιδίου προς γλυκιδαμίδιο από το κυτόχρωμα P450 (Friedman, 2003)



Σχήμα 2.2.1.γ Δημιουργία συμπλόκου μεταξύ του γλυκιδαμιδίου και της N-βαλίνης της αιμοσφαιρίνης (Friedman, 2003).

2.2.2 Χρήσιμη ορολογία

NOEL=no- observable -effect level (επίπεδο πρόσληψης στο οποίο δεν παρατηρείται επίδραση στον οργανισμό)

LD50=lethal dose (θανάσιμη δόση για το 50% ενός πληθυσμού)

LOEL=lowest- observable -effect level (κατώτερο επίπεδο πρόσληψης στο οποίο παρατηρείται επίδραση στον οργανισμό)

BMDL=benchmark dose lower confidence limit

2.2.3 Νευροτοξικότητα

Μελέτες σε ανθρώπους. Εργάτες που εκτέθηκαν σε ακρυλαμίδιο εμφάνισαν συμπτώματα περιφερικής νευροπάθειας, δείχνοντας ότι η ένωση αυτή είναι μία ανθρώπινη νευροτοξίνη (Calleman *et al.*, 1990, Costa *et al.*, 1996). Επαγγελματική έκθεση Σουηδών εργατών σε μίγμα τσιμέντου που περιείχε ακρυλαμίδιο και N-μεθυλοακρυλαμίδιο είχε σαν αποτέλεσμα ήπια και αντιστρεπτά συμπτώματα από το περιφερικό νευρικό σύστημα (Hagmar *et al.*, 2001). Τα επίπεδα του συμπλόκου του ακρυλαμιδίου με την αιμοσφαιρίνη έχουν συσχετιστεί με νευρολογικά συμπτώματα.

Άτομα με επίπεδα ακρυλαμιδίου > 1 nmol/g σφαιρίνης παρουσίαζαν μούδιασμα ή αναισθησία στα χέρια ή στα πόδια (Friedman, 2003).

Μικρής διάρκειας επαγγελματική έκθεση 71 εργατών σε ακρυλαμίδιο, σε εργοστάσια παραγωγής ακρυλαμιδίου στην Κίνα, είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση των παρακάτω συμπτωμάτων: αδυναμία κάτω άκρων, απώλεια αντανάκλαστικών και αίσθησης στα δάχτυλα των ποδιών, μούδιασμα των χεριών και των ποδιών (He *et al.*, 1989). Μεγαλύτερης διάρκειας έκθεση είχε σαν αποτέλεσμα πιο σοβαρά συμπτώματα που περιλάμβαναν δυσλειτουργία της παρεγκεφαλίδας συνακόλουθη από νευροπάθεια. Οι ερευνητές τονίζουν την αποφυγή της έκθεσης στο ακρυλαμίδιο μέσω του δέρματος (Friedman, 2003).

Μελέτες σε πειραματόζωα. Οξεία τοξική επίδραση από εφάπαξ δόση εμφανίστηκε μόνο με δόσεις άνω των 100 mg/Kg σωματικού βάρους (ΣΒ), και η LD50 ήταν συνήθως 150 mg/Kg ΣΒ. Η συνεχής χορήγηση ακρυλαμιδίου έχει φανεί να προκαλεί εκφυλισμό των νευρικών απολήξεων σε περιοχές του εγκεφάλου που είναι βασικές για την εκμάθηση, τη μνήμη και άλλες μαθησιακές λειτουργίες (παρεγκεφαλίδα, θάλαμος, ιππόκαμπος). Αυτός ο εκφυλισμός μπορεί να προηγείται των μορφολογικών αλλαγών των νεύρων. Σε αρουραίους που εκτέθηκαν σε ακρυλαμίδιο μέσω του πόσιμου νερού για 90 ημέρες το NOEL για τις μορφολογικές αλλαγές των νεύρων ήταν 0,2 mg/Kg ΣΒ/ημέρα (JECFA, 2005).

2.2.4 Βλάβες στο αναπαραγωγικό σύστημα και τη γονιμότητα

Αρσενικά τρωκτικά παρουσίασαν μειωμένη γονιμότητα, κυρίως θανατηφόρα επίδραση, αρνητικά αποτελέσματα στη καταμέτρηση και τη μορφολογία του σπέρματος για δόσεις ακρυλαμιδίου > 7 mg/Kg ΣΒ/ημέρα. Σε θηλυκά τρωκτικά δεν έχουν παρατηρηθεί αρνητικές επιδράσεις στην αναπαραγωγή και τη γονιμότητα, εκτός από ελάχιστη μείωση του σωματικού βάρους των νεογνών σε δόσεις 2,5 mg/Kg ΣΒ/ ημέρα (LOEL) και πάνω. Το ακρυλαμίδιο ήταν εμβρυοτοξικό στα ποντίκια μόνο σε επίπεδα δόσης 40 mg/Kg ΣΒ/ημέρα, που χορηγούνταν στη μητέρα, και δεν ήταν τερατογόνο ούτε σε ποντίκια ή αρουραίους. Σε μία έρευνα στην οποία χορηγούνταν ακρυλαμίδιο από το στόμα από τη 6η μέρα της κυοφορίας ως την 14η ημέρα της γαλουχίας, το NOEL για την νευροτοξικότητα ήταν 10 mg/Kg ΣΒ/ημέρα. Το NOEL για επιδράσεις στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη ήταν 2 mg/Kg ΣΒ/ημέρα (JECFA, 2005).

Η χορήγηση διαλυμάτων ακρυλαμιδίου σε νερό (50-200 ppm) σε θηλυκούς και αρσενικούς αρουραίους πριν την αναπαραγωγή και κατά τη διάρκεια της κύησης και της

γαλουχίας, οδήγησε σε διαταραχές στο ζευγάρωμα και την εκσπερμάτωση, ανικανότητα αύξησης τους σωματικού βάρους, μείωση της πρόσληψης τροφής, χαμηλό σωματικό βάρος και μειωμένο ρυθμό πρόσληψης βάρους κατά την γαλουχία στα νεογνά (Zenick *et al.*, 1986). Σύμφωνα με τα παραπάνω ήταν και οι μελέτες των Sakamoto *et al.* (1986), Chapin *et al.* (1995), Wise *et al.* (1995), στις οποίες βρέθηκε ότι σε νευροτοξικές δόσεις, το ακρυλαμίδιο δρα τοξικά στην αναπαραγωγή, μειώνοντας το μέγεθος των νεογνών, μειώνοντας τη γονιμότητα, αυξάνοντας την αποβολή των εμβρύων και προκαλώντας μορφολογικές και αριθμητικές ανωμαλίες στο σπέρμα των αρσενικών. Δοσοεξαρτημένη χρωμοσωμική βλάβη παρατηρήθηκε σε σπερματοκύτταρα αρουραίων μετά από έκθεση του δέρματός τους σε ακρυλαμίδιο (Gutierrez-Espleta *et al.* 1992). Πιθανοί μοριακοί μηχανισμοί πρόκλησης βλάβης στην αναπαραγωγή είναι η αλκυλίωση HS ομάδων στον πυρήνα και την ουρά του σπερματοζωαρίου, η απομάκρυνση της γλουταθειόνης και/ή καταστροφή του DNA στους όρχεις (Dearfield *et al.*, 1995).

Από τους Tyl *et al.* (2000, 2003) παρατηρήθηκε ότι το NOEL για την πρόκληση προγεννητικού θανάτου ήταν 0,2 mg/ Kg ΣΒ/ημέρα, ενώ το NOEL για την τοξικότητα σε ενήλικους αρουραίους ήταν < 0,5 mg/Kg ΣΒ/ημέρα. Συνεπώς, η νευροτοξικότητα εμφανίζεται να είναι η αιτία ή να παίζει σημαντικό ρόλο στις αναπαραγωγικές βλάβες.

Οι αρουραίοι που εμφάνιζαν πρωτεϊνικό υποσιτισμό ήταν περισσότερο ευάλωτοι στην τοξικότητα από το ακρυλαμίδιο (Khanna *et al.*, 1992). Ο ρόλος των θρεπτικών συστατικών (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη, βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία) στη σοβαρότητα της τοξικότητας που προκαλείται από το ακρυλαμίδιο καθώς και οι πιθανές προσθετικές και συνεργατικές δράσεις του ακρυλαμιδίου με άλλα μεταλλαξογόνα και καρκινογόνα που σχηματίζονται στο τρόφιμο μέσο της θερμότητας είναι απολύτως άγνωστες (Friedman, 2003).

2.2.5 Γονιδοτοξικότητα

Έχει αναφερθεί ότι το ακρυλαμίδιο προκαλεί επικρατείς θνησιγενείς μεταλλάξεις στις σπερματίδες ποντικών και αρουραίων και συνεπώς θεωρείται ως μεταλλαξογόνος παράγοντας στα σπερματοκύτταρα των θηλαστικών (Shelby *et al.*, 1987, Adler *et al.*, 2002). Το ακρυλαμίδιο έχει μεταλλαξογόνο δράση στα αρχέγονα σπερματογόνια (Dearfield *et al.*, 1995). Έχει φανεί ότι πολύ μικρές δόσεις ακρυλαμιδίου είναι δυνατόν να βλάψουν τα χρωμοσώματα (Abramsson-Zetterberg, 2003). Έρευνες που έγιναν από τους Paulsson *et al.* (2003) υποστηρίζουν ότι, ο επικρατέστερος παράγοντας πρόκλησης γενετικής βλάβης στα ποντίκια από την έκθεσή στο ακρυλαμίδιο είναι το

γλυκιδαμίδιο. Ο μεταβολισμός του ακρυλαμιδίου σε γλυκιδαμίδιο φαίνεται να είναι απαραίτητος για την πρόκληση γενετικής βλάβης από το ακρυλαμίδιο *in vitro* και στα πειραματόζωα (JECFA, 2005).

2.2.6 Καρκινογένεση

Μελέτες σε ζώα. Ο IARC (International Agency for Research on Cancer) έχει χαρακτηρίσει το ακρυλαμίδιο ως «πιθανό καρκινογόνο στους ανθρώπους (IARC group 2A)» (IARC, 1994), όπως επίσης έχει χαρακτηριστεί και το N-μεθυλοακρυλαμίδιο (NTP, 1989). Πειράματα έδειξαν ότι το ακρυλαμίδιο προκαλούσε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου στον εγκέφαλο, το κεντρικό νευρικό σύστημα, τον θυρεοειδή, άλλους ενδοκρινείς αδένες και τα αναπαραγωγικά όργανα των ποντικών (Bull *et al.*, 1984). Η χορήγηση ακρυλαμιδίου μέσω του νερού σε δόσεις 0-2 mg/Kg ΣΒ/ημέρα σε αρσενικούς αρουραίους και 0-3 mg/Kg ΣΒ/ημέρα σε θηλυκούς αρουραίους οδήγησε σε αύξηση της επίπτωσης των όγκων σε διάφορα όργανα, ειδικά σε υψηλές δόσεις (Πίνακας 1) (Friedman *et al.*, 1995).

Πίνακας 2.2.6 Η επίπτωση των όγκων σε συγκεκριμένα όργανα ποντικών Fischer 344 μετά από λήψη ακρυλαμιδίου μέσω του νερού για διάρκεια δύο ετών (Friedman *et al.*, 1995)

Είδος όγκου	Φύλο	Δόση (mg/Kg ΣΒ/ημέρα)						
		0	0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0
Όγκος στους όρχεις	A	4/102	4/102	9/204	8/102	-	13/75	-
Νεοπλασία στον εγκέφαλο και τη σπονδυλική στήλη	A	1/102	1/102	2/204	1/102	-	3/75	-
	Θ	0/50	0/50	-	-	2/100	-	2/100
Αδένωμα του θυρεοειδούς	A	2/100	1/102	9/203	5/101	-	15/75	-
	Θ	0/50	0/50	-	-	7/100	-	16/100
Καρκίνωμα του θυρεοειδούς	A	1/100	2/102	3/203	0/101	-	3/75	-
	Θ	1/50	1/50	-	-	3/100	-	7/100
Συνολικός αριθμός ποντικών με νεοπλασία	A	3/100	3/100	12/203	5/101	-	17/75	-
	Θ	1/50	1/50	-	-	10/100	-	23/100
Αδενοκαρκίνωμα στους μαστικούς αδένες	Θ	7/46	4/50	-	-	21/94	-	30/95

Το ερώτημα που προκύπτει είναι εάν η έκθεση του ανθρώπου σε ακρυλαμίδιο, που προέρχεται από περιβαλλοντικές πηγές καθώς και από τις τροφές, έχει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου αντίστοιχες με αυτές στα πειραματόζωα. Σύμφωνα με τους Granath *et al.* (1999), οι κίνδυνοι που σχετίζονται με ενώσεις που προκαλούν βλάβες στο γενετικό υλικό φαίνεται είναι ανεξάρτητες από είδος του οργανισμού και ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου στα ζώα είναι αντιπροσωπευτικός για εκείνον του ανθρώπου. Παρόλα αυτά, μία μελέτη πάνω στον κίνδυνο ανάπτυξης

καρκίνου έδειξε ότι τα ποντίκια ήταν περίπου 10 φορές πιο ευαίσθητα στο γλυκιδαμίδιο σε σχέση με τους αρουραίους. Παράλληλα, φαίνεται ότι το γλυκιδαμίδιο είναι κυρίως υπεύθυνο για την καρκινογένεση στα ποντίκια (Paulson et al., 2001). Προκειμένου να διευκολυνθεί η αξιολόγηση του κινδύνου στους ανθρώπους θα πρέπει να είναι γνωστά τα επίπεδα του συμπλόκου της αιμοσφαιρίνης με το γλυκιδαμίδιο σε ανθρώπους που εκτίθενται σε ακρυλαμίδιο (Friedman et al., 2003).

Η καρκινογόνος δράση του ακρυλαμιδίου θα μπορούσε να εξαρτάται από το είδος. Συνεπώς, για να είναι δυνατή η εφαρμογή των δεδομένων από μελέτες σε ζώα στον άνθρωπο θα ήταν δόκιμο να προσδιοριστεί η καρκινογένεση σε συγγενικά προς τον άνθρωπο είδη (Friedman et al., 2003).

2.2.7 Μελέτες σε ανθρώπους

Επιδημιολογικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε ανθρώπους με βιομηχανική ή τυχαία έκθεση στο ακρυλαμίδιο προτείνουν ότι το πρωταρχικό σημείο εκδήλωσης της τοξικότητας στους ανθρώπους είναι το νευρικό σύστημα (JECFA, 2005).

Παράλληλα, έχουν διεξαχθεί επιδημιολογικές έρευνες σε εργάτες με επαγγελματική έκθεση στο ακρυλαμίδιο. Το ακρυλαμίδιο δεν συσχετίστηκε με τη συνολική θνησιμότητα από καρκίνο αλλά ούτε και με δόσοεξαρτώμενη αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου σε συγκεκριμένα όργανα. Η μόνη εξαίρεση ήταν ο στατιστικά σημαντικός διπλασιασμός του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του παγκρέατος σε εργάτες με τη μέγιστη αθροιστική έκθεση. Σε αυτές τις έρευνες όμως το δείγμα ήταν μικρό, δεν πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της διαιτητικής πρόσληψης του ακρυλαμιδίου και δεν λήφθηκαν υπόψη πιθανοί συγχυτικοί παράγοντες, όπως το κάπνισμα. Τα μόνα διαθέσιμα δεδομένα που λαμβάνουν υπόψη τη διαιτητική πρόσληψη του ακρυλαμιδίου προέρχονται από έρευνες «ασθενών-μαρτύρων» που σχεδιάστηκαν για την αξιολόγηση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου σε σχέση με διαιτητικούς παράγοντες άσχετους με το ακρυλαμίδιο. Τα δεδομένα από επιδημιολογικές έρευνες που εκτιμούν την έκθεση στο ακρυλαμίδιο μέσω της στοματικής οδού δεν είναι κατάλληλα για την αξιολόγηση του κινδύνου από το ακρυλαμίδιο στους ανθρώπους (JECFA, 2005).

Ακόμα, πρέπει να επισημανθεί ότι παρόλο που τα επίπεδα των συμπλόκων του ακρυλαμιδίου με την αιμοσφαιρίνη (τα οποία χρησιμοποιούνται σαν βιολογικοί δείκτες της έκθεσης του ανθρώπου στο ακρυλαμίδιο) είναι υψηλότερα σε εκτεθειμένους εργάτες

και σε καπνιστές, υπάρχουν αμφιβολίες ως προς τη χρήση του συμπλόκου αυτού σαν δείκτης της διαιτητικής πρόσληψης του ακρυλαμιδίου (JECFA, 2005).

2.2.8 Σημαντικά στοιχεία που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την αξιολόγηση των επιπτώσεων του ακρυλαμιδίου στην υγεία του ανθρώπου.

- α) Η ανθρώπινη έκθεση στο ακρυλαμίδιο μπορεί να συμβεί μέσω της δίαιτας, του εργασιακού περιβάλλοντος και του καπνίσματος. Η απορρόφηση του ακρυλαμιδίου μπορεί να συμβεί από πολλές διαφορετικές οδούς.
- β) Το ακρυλαμίδιο είναι δυνατόν να προσδεθεί στο DNA καθώς και στις πρωτεΐνες και τα ένζυμα, προκαλώντας χρωμοσωμικές ανωμαλίες και γενετικές μεταλλάξεις στα σωματικά κύτταρα και τους γαμέτες.
- γ) Το ακρυλαμίδιο οδηγεί σε αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου σε αρουραίους, για δόσεις 1-2 mg/Kg ΣΒ/ημέρα.
- δ) Το ακρυλαμίδιο έχει τουλάχιστον τρεις κύριες αρνητικές επιδράσεις στα ζώα: νευροτοξικότητα, αναπαραγωγικές βλάβες και καρκινογένεση.
- ε) Έχει αναφερθεί ότι το ακρυλαμίδιο αποτελεί μία νευροτοξίνη με αθροιστική δράση.
- στ) Οι μελέτες που περιλαμβάνουν χορήγηση καθαρού ακρυλαμιδίου (σε πειραματόζωα) μπορεί να μην είναι αντιπροσωπευτικές για το ακρυλαμίδιο που λαμβάνεται από τα τρόφιμα, τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν και άλλες τοξικές (πχ αφλατοξίνη B1, ετεροκυκλικές αμίνες, φουρφουραλδεϋδη) ή προστατευτικές ουσίες (πχ φαινολικά αντιοξειδωτικά, φλαβονοειδή). Αυτές οι ουσίες θα μπορούσαν να έχουν προσθετική, συνεργατική ή ανταγωνιστική επίδραση στις βιολογικές δράσεις του ακρυλαμιδίου (Friedman, 2003).

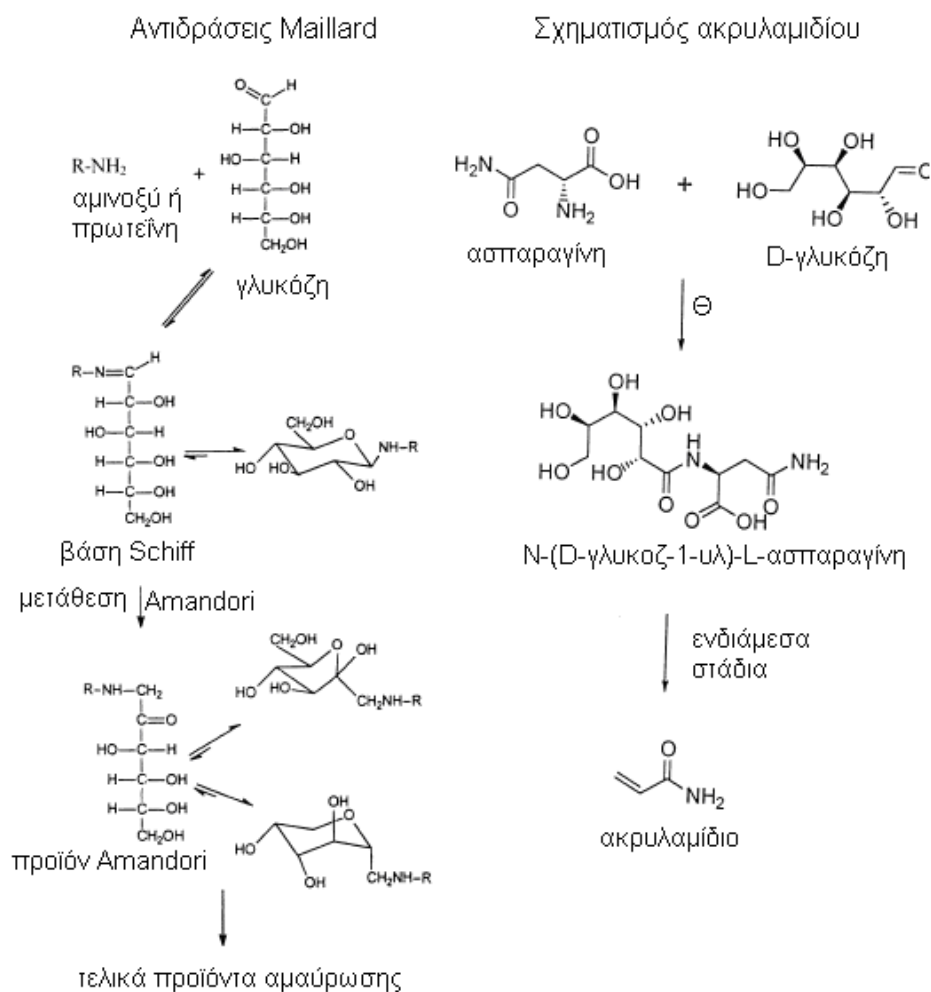
2.3 Μηχανισμός σχηματισμού του ακρυλαμιδίου κατά το μαγείρεμα των τροφίμων

Το ακρυλαμίδιο είναι δυνατόν να σχηματιστεί όταν τρόφιμα, όπως φυτικά τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες και χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη, υποβάλλονται σε υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος ή άλλης θερμικής κατεργασίας. Η πιο σημαντική πρόδρομη ουσία για τον σχηματισμό του ακρυλαμιδίου είναι το ελεύθερο αμινοξύ ασπαράγίνη το οποίο αντιδρά με ανάγοντα σάκχαρα κατά τις αντιδράσεις Maillard, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το χρώμα και τη

γεύση των τροφίμων. Εναλλακτικοί μηχανισμοί σχηματισμού μπορεί να είναι σημαντικοί για συγκεκριμένα τρόφιμα.

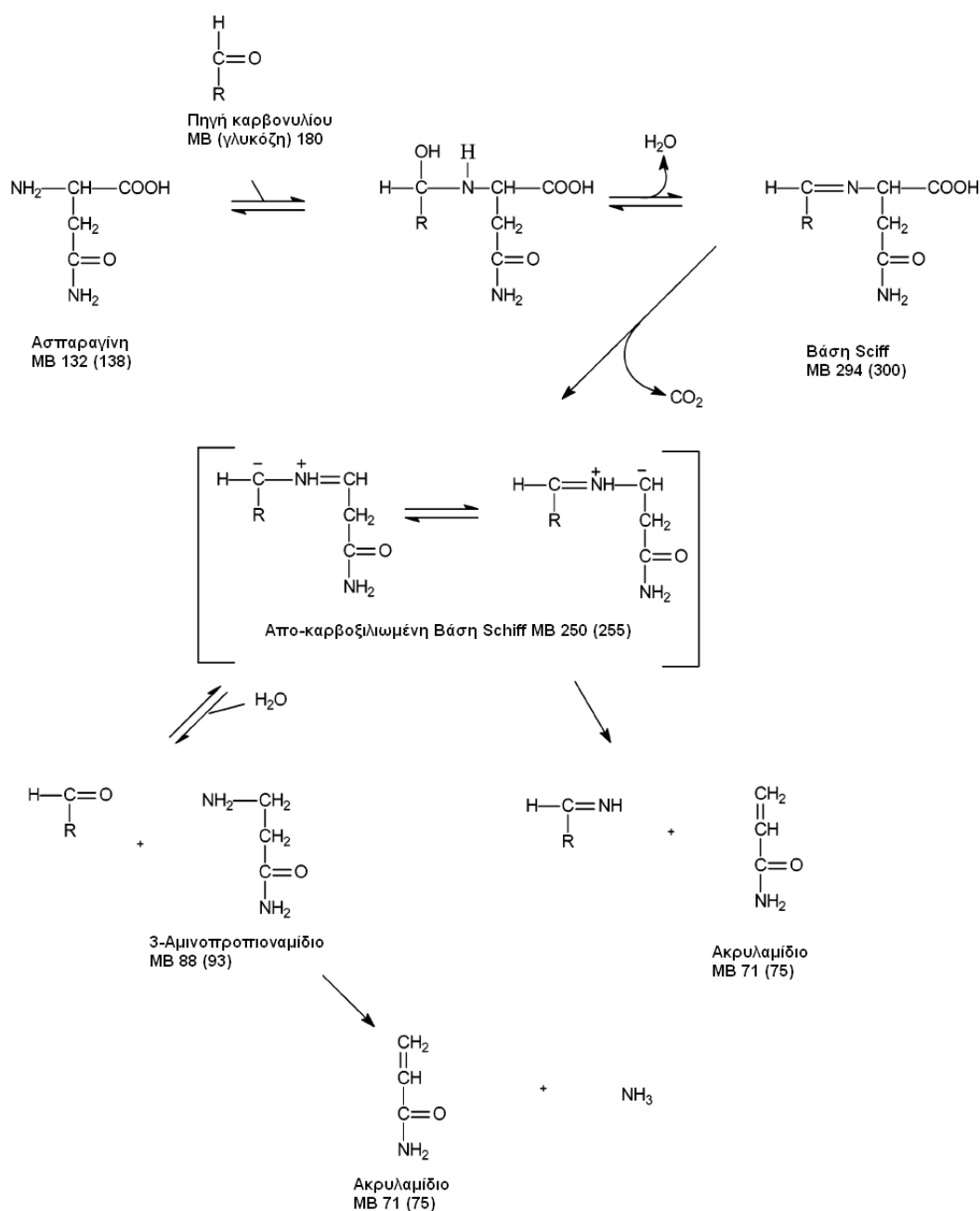
Παρόλο που είναι δυνατόν να σχηματιστούν ίχνη ακρυλαμιδίου μέσω του βρασμού, για να παραχθούν σημαντικά ποσά απαιτείται επεξεργασία του τροφίμου σε θερμοκρασία άνω των 120°C. Οι τελικές συγκεντρώσεις του ακρυλαμιδίου είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ πολύπλοκων διαδικασιών σχηματισμού και αποικοδόμησης του ακρυλαμιδίου. Τα μεγαλύτερο ποσοστό του ακρυλαμιδίου συσσωρεύεται στα τελικά στάδια ψησίματος ή τηγανίσματος (JECFA, 2005).

Μελέτες βασισμένες σε ανάλυση φάσματος μάζας έδειξαν ότι τα τρία άτομα άνθρακα (C) και το άτομο του αζώτου (N) στο μόριο του ακρυλαμιδίου προέρχονται όλα από την ασπαραγίνη (Zyzac, 2002). Οι Stadler *et al.* (2002), Zyzak (2002), Mottram *et al.* (2002), Becalski *et al.* (2003), Yaylayan *et al.* (2003) παρατήρησαν επίσης ότι τα ανάγοντα σάκχαρα που περιέχουν μία αδεϋδομάδα, όπως η γλυκόζη, αντιδρούν με την ασπαραγίνη σε θερμοκρασίες άνω των 100°C προς σχηματισμό ενός *N*-γλυκοζίτη, η οποία στη συνέχεια υφίσταται διάσπαση στον δεσμό C – N με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο μόριο που μπορεί να μετατραπεί σε ακρυλαμίδιο, πιθανώς όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Friedman, 2003). Η α-NH₂ ομάδα της ασπαραγίνης συμμετέχει σε μία αντίδραση πυρινόφιλης προσθήκης με την αλδεϋδομάδα της γλυκόζης προς σχηματισμό μίας βάσης *Schiff*, η οποία στη συνέχεια υπόκειται σε μετάθεση Amadori με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του παραγώγου ασπαραγίνης-γλυκόζης (*N*-γλυκοζίτη). Το παράγωγο αυτό μπορεί στη συνέχεια να υποστεί αποκαρβοξυλίωση, χάνοντας την COOH και την α-NH₂ ομάδα, που προέρχονται από την ασπαραγίνη, προς σχηματισμό ακρυλαμιδίου (δεξιά). Παράλληλα το παράγωγο αυτό μπορεί μέσω των αντιδράσεων Maillard να οδηγήσει στο σχηματισμό προϊόντων αμαύρωσης (αριστερά).



Σχήμα 2.3.α Αντιδράσεις Maillard και σχηματισμός ακρυλαμιδίου από ασπαραγίνη και γλυκόζη (Friedman, 2003).

Παρόμοια, οι Zyzak et al. (2003) πρότειναν τον παρακάτω μηχανισμό για το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Η α-αμινομάδα της ελεύθερης ασπαραγίνης αντιδρά με μία πηγή καρβονυλίου σχηματίζοντας μία βάση *Schiff*. Υπό την επίδραση της θερμότητας, η βάση *Schiff* αποκαρβοξυλιώνεται (διευκολυνόμενη από τον απεντοπισμό του αρνητικού φορτίου που επιτρέπεται από το σχηματισμό της βάσης *Schiff*), σχηματίζοντας ένα προϊόν που μπορεί να αντιδράσει με δύο τρόπους. Μπορεί να υδρολυθεί προς σχηματισμό 3-αμινοπροπαναμιδίου, η οποία στη συνέχεια είναι δυνατόν, αποβάλλοντας ένα μόριο αμμωνίας, να σχηματίσει ακρυλαμίδιο όταν θερμανθεί. Διαφορετικά, η βάση *Schiff* που έχει υποστεί αποκαρβοξυλίωση είναι δυνατόν να αποικοδομηθεί απευθείας προς σχηματισμό ακρυλαμιδίου, μέσω απομάκρυνσης μίας ιμίνης.



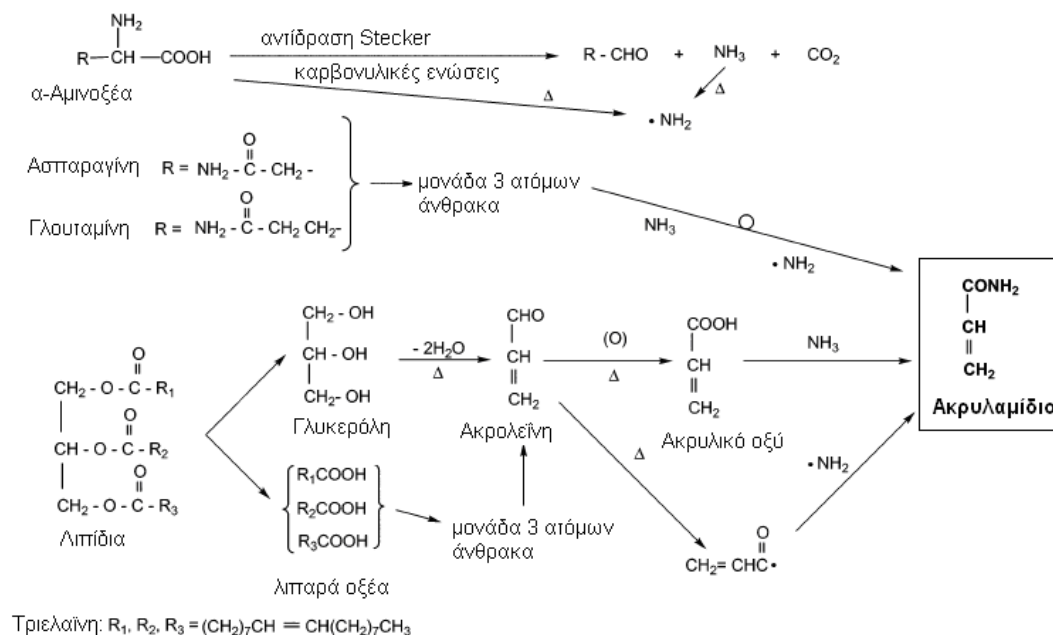
Σχήμα 2.3.β Μηχανισμός σχηματισμού του ακρυλαμιδίου στο τρόφιμο (Zyzak *et al.*, 2003).

Εξαιτίας του γεγονότος ότι η γλυκερόλη, η 2-δεοξυγλυκόζη και η γλυοξάλη, που δε λαμβάνουν μέρος στις κλασσικές αντιδράσεις Maillard, ενώνονται και αυτές με ασπαραγίνη προς σχηματισμό ακρυλαμιδίου, πιθανώς να υπάρχουν και άλλα μονοπάτια ή μηχανισμοί που οδηγούν στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου (Stadler *et al.*, 2002). Δύο μηχανισμοί (ο πρώτος απαιτεί τη συμμετοχή δικαρβονυλίου και ο δεύτερος μια μονοκαρβονυλική αλδεΐδη ή κετόνη) προτείνουν ότι το ακρυλαμίδιο μπορεί να είναι αποτέλεσμα της γενικότερης αντίδρασης της ασπαραγίνης με μία αλδεΐδη ή κετόνη. Αυτή η πρόταση ενισχύεται από την παρατήρηση ότι η θέρμανση της οκτανάλης ή της

2-οκτανόνης μαζί με ασπαραγίνη, σε σφραγισμένο δοκιμαστικό σωλήνα στους 175°C, οδηγεί σε μετρήσιμα ποσά ακρυλαμιδίου (Becalski *et al.*, 2003).

Υπό τη παρουσία της ασπαραγίνης, ο μηχανισμός σχηματισμού του ακρυλαμιδίου από μεθειονίνη (και πιθανώς και από άλλα αμινοξέα) περιλαμβάνει αρχικά μία αποκαρβοξυλίωση και την μετατροπή της μεθειονίνης σε μεθειονάλη, $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CHO}$, η οποία στη συνέχεια συμπεριφέρεται σαν οποιαδήποτε άλλη αλδεΐδη με αποτέλεσμα να αντιδρά με την $\alpha\text{-NH}_2$ ομάδα της ασπαραγίνης προς σχηματισμό μίας βάσης *Schiff* ($\text{Asn-NH=CHCH}_2\text{SCH}_3$). Η τελευταία μετατρέπεται σε *N*-γλυκοζίτη, ο οποίος μπορεί στη συνέχεια να υποστεί αποκαρβοξυλίωση προς σχηματισμό ακρυλαμιδίου με μηχανισμό ανάλογο αυτού που απεικονίζεται στο πιο πάνω σχήμα. Πρέπει να σημειωθεί πως αυτός ο μηχανισμός υποδεικνύει ότι η μεθειονίνη δεν μετατρέπεται απευθείας σε ακρυλαμίδιο, αλλά αποτελεί πηγή καρβονυλίου ανάλογη με την γλυκόζη. Απουσία ασπαραγίνης, η μεθειονάλη μπορεί να μετατραπεί σε ακρολεΐνη με απομάκρυνση H_2S . Η ακρολεΐνη μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί σε ακρυλαμίδιο όπως φαίνεται παρακάτω (Friedman, 2003).

Τα α -αμινοξέα παρουσία καρβονυλικής ένωσης παράγουν αμμωνία μέσω της αντίδρασης *Stecker*. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ένας υποθετικός μηχανισμός σχηματισμού του ακρυλαμιδίου από αμινοξέα και λιπίδια. Όταν η ασπαραγίνη αντιδρά με γλυκερόλη, σχηματίζεται ακρυλαμίδιο. Ο σχηματισμός ακρυλαμιδίου επιταχύνεται από μία καρβονυλική ένωση και απαιτείται μία ένωση τριών ανθρακο-ατόμων, όπως η γλυκερόλη, για τον σχηματισμό ακρυλαμιδίου. Ακόμα, όταν χλωριούχο αμμώνιο θερμαίνεται μαζί με τριελαΐνη σχηματίζεται ακρυλαμίδιο. Σύμφωνα με τα παραπάνω, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η γλυκερόλη που προέρχεται από λιπίδια, όπως η τριελαΐνη, σχηματίζει ακρολεΐνη μέσω αφυδάτωσης. Η ακρολεΐνη οξειδώνεται προς ακρυλικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με την αμμωνία, που προέρχεται από ασπαραγίνη, προς σχηματισμό ακρυλαμιδίου. Έτσι, έχει προταθεί ότι η ακρολεΐνη παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου σε τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος που υπόκεινται σε θερμική επεξεργασία (Yasahura *et al.*, 2003).



Σχήμα 2.3.γ Υποθετικός μηχανισμός σχηματισμού του ακρυλαμιδίου από αμινοξέα και λίπη (Yasahura *et al.*, 2003).

2.4 Τεχνικές/ μέθοδοι ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα

Παρόλο που το ακρυλαμίδιο είναι μία σχετικά πρόσφατα ανιχνευμένη ουσία, από το 2002 που επιβεβαιώθηκε η ύπαρξή του στα τρόφιμα, έχουν γίνει εντατικές προσπάθειες ανάπτυξης και σχεδιασμού μεθόδων για τον προσδιορισμό του. Παρακάτω παρουσιάζονται οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα, που έχουν χρησιμοποιηθεί από διάφορους ερευνητές σε δημοσιευμένες και μη μελέτες. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην προετοιμασία των δειγμάτων (Wenzl *et al.*, 2003).

2.4.1 Ανασκόπηση των μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί

Τον Δεκέμβριο του 2002 το Institute for Reference Materials and Measurements of the European Commission's Directorate General Joint Research Centre συγκέντρωσε και δημοσίευσε πληροφορίες για τις αναλυτικές μεθόδους που είχαν χρησιμοποιηθεί από επίσημα Ευρωπαϊκά εργαστήρια ανάλυσης τροφίμων, εκ μέρους του European Commission's Directorate General Health and Consumer Protection (SANCO). Στην έρευνα αυτή ανταποκρίθηκαν όχι μόνο κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης αλλά και

άλλες χώρες της Ευρώπης και συμπεριελήφθησαν στοιχεία, εκτός από τα επίσημα δημόσια εργαστήρια, από ιδιωτικά αναλυτικά εργαστήρια (Wenzl *et al.*, 2003).

Πίνακας 2.4.1 Μέθοδοι ανάλυσης που έχουν χρησιμοποιηθεί σε επίσημα και ιδιωτικά εργαστήρια στην Ευρώπη (Wenzl *et al.*, 2003).

Κράτος	Επίσημο εργαστήριο	Ιδιωτικό εργαστήριο	LC-MS ή LC- MS/MS	LC-UV	GC-MS (EI/CI)	GC-MS (με παράγωγο βρομίου)
Αυστρία	√		√			√
Βέλγιο	√		√			
Ελβετία	√	√	√		√	√
Τσεχία	√				√	
Δανία	√		√			
Γερμανία	√	√	√	√	√	√
Ισπανία	√					√
Γαλλία	√		√			
Φινλανδία			√			
Ελλάδα	√				√	√
Ιρλανδία	√					√
Ιταλία		√				√
Νορβηγία	√		√			
Ολλανδία	√		√			
Ηνωμένο Βασίλειο	√		√			√
Σουηδία	√	√	√			√

Η επικράτηση των μεθόδων GC-MS και LC-MS/MS είναι αναμενόμενη αφού το ακρυλαμίδιο ανήλθε στην επικαιρότητα μετά τη δημοσίευση των αποτελεσμάτων της έρευνας του Swedish National Food Administration (2002) στην οποία η μέθοδος ανάλυσης ήταν HPLC/MS και της έρευνας των Castle *et al.* (1991) στην οποία προσδιορίστηκε το ακρυλαμίδιο στις ντομάτες με GC-MS. Φαίνεται ότι οι ερευνητές επικεντρώθηκαν αρχικά στην εφαρμογή μεθόδων που είχαν ήδη δημοσιευτεί παρά στην ανάπτυξη νέων.

2.4.2 Ανάλυση με Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)

I) Αέρια χρωματογραφία χωρίς παραγωγοποίηση του ακρυλαμιδίου

A) Αεριοχρωματογραφική ανάλυση του ακρυλαμιδίου

Εξαιτίας της ιδιότητας του ακρυλαμιδίου να πολυμερίζεται (θερμοκρασία πολυμερισμού 84,5°C), τις περισσότερες φορές τα δείγματα μπορούν να εισαχθούν στον αεριοχρωματογράφο για ανάλυση μόνο με απευθείας εισαγωγή εν ψυχρώ επί της στήλης (on-column injection). Μόνο λίγα άρθρα (Biedermann *et al.*, 2002, Tateo and Bononi, 2003, WEJ, 2003) προτείνουν τη χρησιμοποίηση εισαγωγέα split-splitless για την ανάλυση. Για τον διαχωρισμό του ακρυλαμιδίου, χρησιμοποιούνται συνήθως πολικές στήλες, όπως αυτές με υλικό πλήρωσης από πολυαιθυλενογλυκόλη. Οι ανιχνευτές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την αεριοχρωματογραφική ανάλυση του ακρυλαμιδίου είναι ο ανιχνευτής φλόγας ιονισμού (FID), ο ανιχνευτής συλλογής ηλεκτρονίων (ECD) και ο ανιχνευτής φασμάτων μαζών (MSD). Το βασικό μειονέκτημα της ανάλυσης με GC-MSD είναι η έλλειψη χαρακτηριστικών θραυσμάτων στο φάσμα μάζας του ακρυλαμιδίου. Τα φάσματα μάζας ηλεκτρονιακού ιονισμού (EI) του ακρυλαμιδίου εμφανίζουν κύρια θραύσματα τα m/z 71 και 55 τα οποία χρησιμοποιούνται και για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Όμως, συνεκχυλιζόμενες ουσίες από τα τρόφιμα, όπως η μαλτόλη και το επτανοϊκό οξύ, παράγουν τα ίδια θραύσματα με αποτέλεσμα να μην καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός του ακρυλαμιδίου (Biedermann *et al.*, 2002). Γι αυτούς τους λόγους το ακρυλαμίδιο προσδιορίζεται καλύτερα αεριοχρωματογραφικά με τη μέθοδο της φασματομετρίας μαζών με αρνητικό ή θετικό χημικό ιονισμό (Wenzl *et al.*, 2003), εφόσον διατίθεται το απαιτούμενο όργανο.

B) Παραλαβή του ακρυλαμιδίου από τα τρόφιμα για την ανάλυση με αεριοχρωματογραφία

Οι διαλύτες εκχύλισης του ακρυλαμιδίου από τα διάφορα τρόφιμα είναι κυρίως νερό και μίγματα νερού με οργανικούς διαλύτες, όπως 1-προπανόλη και 2-βουτανόνη (Biedermann *et al.*, 2002, SQTS, 2003). Η χρησιμοποίηση άνυδρης 1-προπανόλης ή καθαρής μεθανόλης για την εκχύλιση, οδηγούν σε μη ικανοποιητική παραλαβή του ακρυλαμιδίου (Tateo and Bononi, 2003). Έχει επίσης δημοσιευτεί μία μέθοδος

παραλαβής του ακρυλαμιδίου από τηγανιτές πατάτες με εκχύλιση Soxhlet με μεθανόλη για 10 ημέρες, χωρίς όμως ικανοποιητικά αποτελέσματα (Pedersen and Olsson, 2003).

Συνήθως, το ομογενοποιημένο δείγμα αναμιγνύεται με νερό ή υδατικό διάλυμα του εσωτερικού προτύπου και διατηρείται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία για 10-20 λεπτά (Biedermann *et al.*, 2002). Για την ενίσχυση της εκχύλισης έχει χρησιμοποιηθεί νερό θερμοκρασίας 60°-80°C. Παρόλα αυτά, ακόμα και η εκχύλιση σε θερμοκρασία δωματίου έχει παρόμοια αποτελέσματα. Αυξημένη ανάκτηση του ακρυλαμιδίου είναι αναμενόμενη και μετά την εκχύλιση του ακρυλαμιδίου από το τρόφιμο με χρήση λουτρού υπερήχων (30 min, 60°C) (Schaller, 2003). Προβλήματα που προκύπτουν από το υψηλό ιξώδες του μίγματος δείγματος/νερού αντιμετωπίζονται με την προσθήκη μικρών ποσοτήτων αμυλάσης (SQTS, 2003).

Για να είναι δυνατή η γενικότερη εφαρμογή της μεθόδου, πρέπει να ληφθεί υπόψη η περιεκτικότητα του δείγματος σε λίπος καθώς επηρεάζει την ανάλυση. Συνεπώς, για δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος πρέπει να πραγματοποιείται απολίπανση. Διάφορες μέθοδοι απολίπανσης που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι: απομάκρυνση του λίπους με εξάνιο μετά την εκχύλιση (SQTS, 2003), φυγοκέντριση και απομάκρυνση του νερού με απόσταξη αζεοτροπικού μίγματος (Biedermann *et al.*, 2002), εκχύλιση με μίγμα n-εξανίου/ ακετονιτριλίου (Biedermann *et al.*, 2002), απολίπανση με n-εξάνιο σε συσκευή Soxhlet και εκχύλιση του ακρυλαμιδίου με μεθανόλη (Tateo and Bononi, 2003).

II) Αέρια χρωματογραφία με δημιουργία διβρώμου παραγώγου του ακρυλαμιδίου

Οι περισσότερες μέθοδοι ανάλυσης του ακρυλαμιδίου με αεριοχρωματιγραφία βασίζονται στην παραγωγοποίηση με βρώμιο. Για λόγους που αναφέρονται στο 1.α, έχουν αναπτυχθεί ελάχιστες μόνο μέθοδοι που παραλείπουν την παραγωγοποίηση και προσδιορίζουν το ακρυλαμίδιο άμεσα μετά την εκχύλιση και τον καθαρισμό του δείγματος (Wenzl *et al.*, 2003).

A) Γενικά για την παραγωγοποίηση

Το διβρώμο παράγωγο του ακρυλαμιδίου που χρησιμοποιείται συνήθως για τον προσδιορισμό του ακρυλαμιδίου σε τρόφιμα με αεριοχρωματογραφικές τεχνικές (GC-MSD, GC-ECD) παρουσιάζει κατά την ανάλυση τα παρακάτω πλεονεκτήματα:

1. Το διβρωμο παράγωγο του ακρυλαμιδίου είναι λιγότερο πολικό από το ακρυλαμίδιο με αποτέλεσμα την αύξηση της εκλεκτικότητας της ανάλυσης. Έτσι, προσδιορίζεται εκλεκτικά με GC-MS παράγοντας χαρακτηριστικά θραύσματα μεγάλης έντασης.
2. Δεν πολυμερίζεται στον εισαγωγέα.

Η διαδικασία παραγωγοποίησης πραγματοποιείται συνήθως με προσθήκη του διαλύματος παραγωγοποίησης, που περιέχει βρωμιούχο κάλιο, υδροβρώμιο και ελεύθερο βρώμιο, σε υδατικό εκχλύσμα ωμού ή προκατεργασμένου τροφίμου και στη συνέχεια ακολουθεί ανάδευση για 12 ώρες σε θερμοκρασία $\sim 0^{\circ}\text{C}$ (Castle *et al.*, 1991, Castle, 1993, Ahn *et al.*, 2002, Tareke *et al.*, 2002, Ono *et al.*, 2003). Οι Nemoto *et al.* (2002) χρησιμοποίησαν ένα διαφορετικό αντιδραστήριο παραγωγοποίησης που περιείχε βρωμιούχο κάλιο και βρωμικό νάτριο σε όξινο περιβάλλον. Πρώτες ύλες όπως η ντομάτα και τα μανιτάρια δεν φαίνεται να χρειάζονται ιδιαίτερο καθαρισμό πριν την παραγωγοποίηση, ενώ πρώτες ύλες πλούσιες σε πρωτεΐνη ή υδατάνθρακες (πχ πατάτες, ψωμί) απαιτούν επιπλέον βήματα διαχωρισμού του εκχυλίσματος σε κλάσματα για τον καθαρισμό του, πριν τη δημιουργία του παραγώγου (Tareke *et al.*, 2000, 2002).

B) Διαχωρισμός και ποσοτικός προσδιορισμός του ακρυλαμιδίου.

Η ανάλυση του ακρυλαμιδίου επιτυγχάνεται τις περισσότερες περιπτώσεις με τριχοειδείς στήλες GC μέτριας έως μεγάλης πολικότητας, μήκους 30 m και εσωτερικής διαμέτρου 0,25 mm (GC-MS). Ο όγκος έγχυσης του δείγματος είναι 1-2 μL , χωρίς σχάση του δείγματος (splitless). Η αρχική θερμοκρασία του φούρνου είναι μεταξύ 60°C - 85°C και ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας είναι, στις περισσότερες περιπτώσεις, $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Η τελική θερμοκρασία του φούρνου είναι περίπου 250°C (Wenzl *et al.*, 2003).

Η πρώτη μέθοδος GC-MS με δημιουργία διβρωμου παραγώγου (Castle *et al.*, 1991) βασιζόταν στη προσθήκη μεθακρυλαμιδίου ως εσωτερικού προτύπου σε ένα ομογενοποιημένο δείγμα, δημιουργώντας το παράγωγο 2,3-διβρωμο-2-μεθυλοπροπιοναμίδιο. Ο Castle (1993) παραγωγοποίησε ξεχωριστά το μεθακρυλαμίδιο και το πρόσθεσε στο δείγμα ακριβώς πριν την τελική ρύθμιση του όγκου του διαλύτη, ώστε το μεθακρυλαμίδιο να δρα σαν χρωματογραφικό εσωτερικό πρότυπο. Στη μελέτη των Tareke *et al.*, (2002), χρησιμοποιήθηκε *N,N*-διμεθυλακρυλαμίδιο το οποίο όμως δεν

προσέδωσε ικανοποιητική επαναληπτικότητα σε αντίθεση με την χρήση σημασμένου ακρυλαμιδίου με ισότοπο (D_3 - ή $^{13}C_3$ - ακρυλαμίδιο). Σε άλλες μελέτες χρησιμοποιήθηκε απομάκρυνση του υδροβρωμίου για την ανάλυση του ακρυλαμιδίου (Andrawes *et al.*, 1987, Takata and Okamoto, 1991, Nemoto *et al.*, 2002). Παράλληλα, τα περισσότερα εργαστήρια χρησιμοποιούν $[D_3]$ -ακρυλαμίδιο, $[^{13}C_3]$ -ακρυλαμίδιο ή και τα δύο μαζί ως εσωτερικά πρότυπα (Wenzl *et al.*, 2003).

Γ) Καθαρισμός του παραγώγου

Για την παραλαβή του διβρωμου παραγώγου, η περίσσεια του βρωμίου απομακρύνεται μετά την αντίδραση μέσω ογκομέτρησης με διάλυμα θειοθειικού νατρίου (0.7-1 M), έως την αλλαγή του χρώματος του αντιδραστηρίου σε ανοιχτό κίτρινο. Το βρωμιούχο παράγωγο του ακρυλαμιδίου είναι λιγότερο πολικό σε σχέση με το ακρυλαμίδιο και συνεπώς διαλύεται ευκολότερα σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, για την εκχύλιση του ακρυλαμιδίου από την υδατική φάση χρησιμοποιείται οξικός αιθυλεστέρας ή μίγματα οξικού αιθυλεστέρα και κυκλοεξανίου. Ο διαχωρισμός φάσεων συχνά επιτυγχάνεται με φυγοκέντρωση του δείγματος (Wenzl *et al.*, 2003). Πριν την έγχυση του δείγματος στο GC, ο όγκος του διαλύτη πρέπει να μειωθεί στα 30-200 μL ώστε να επιτευχθούν όρια ανίχνευσης μεταξύ 1-5 $\mu g\ Kg^{-1}$ (Castle *et al.*, 1991, Castle, 1993, Tareke *et al.*, 2000, 2002).

Πίνακας 2.4.2 Μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας για τον προσδιορισμού του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα.

Αναφορά	Δείγμα	Εκχύλιση	Εσωτερικό Πρότυπο (IS)	Παραγωγή-ποίηση	Ανίχνευση
1	Τηγανιτή τροφή	10 g δείγμα + 100 ml νερό	+	+	GC/MS LOD:5μg Kg ⁻¹
2	Τρόφιμα πλούσια σε CHO, πλούσια σε πρωτεΐνη	10 g δείγμα + 100 ml νερό	+ (IS1,IS2)	+	GC/MS LOD:5μg Kg ⁻¹
3	Ντομάτες	50 g ομογεν. δείγμα + IS, φυγοκέντριση 2000 g (15 min), +25 mL νερό, επαναφυγοκέντριση, παραγωγή-ποίηση υπερκείμενου	+ (IS1,IS2)	+	GC/MS LOD:1μg Kg ⁻¹
4	Μανιτάρια	50 g δείγμα +200 g νερό, UltraTurrax (1 min), σε ηρεμία για 5 min, απομάκρυνση αφρού, 20 mL αυτού φυγοκεντρώνται 3500 rpm(15 min), παραγωγή-ποίηση υπερκείμενου	+	+	GC/MS LOD:1μg Kg ⁻¹
5	Φρυγανισμένο ψωμί, τηγανιτά chips πατάτας	10 g ομογεν. δείγμα +100 mL ζεστό νερό, 2 h υδατόλουτρο στους 80±2°C	+	+ (σύμφωνα με Castle, 1993)	GC/MS
6	Τρόφιμα πλούσια σε CHO	10 g ομογεν. δείγμα + IS+ α-αμυλάση +80 mL νερό, 30s ανάδευση, εξισορρόπηση για 10 min σε Θ.Δ., λουτρό υπερήχων 60 °C(30min)	+	-	GC/MS LOD: 10-30 μg Kg ⁻¹
7 _a	Όλα	15 g δείγμα ομογενοποιούνται με 75mL νερό+IS1, ανάμειξη, εξισορρόπηση για 30 min στους 70°C, 10 g αυτού + 40 mL 1-προπανόλη, 12 ml αυτού φυγοκεντρώνται	+ (IS1,IS2)	-	GC/MS LOD: 10-20 μg Kg ⁻¹

Πίνακας 2.4.2 (Συνέχεια) Μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας για τον προσδιορισμού του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα.

Αναφορά	Δείγμα	Εκχύλιση	Εσωτερικό Πρότυπο (IS)	Παραγωγοποίηση	Ανίχνευση
7 _b	Όλα	20 g δείγμα + 200mL θερμό νερό (60°C), + IS, ανάμειξη, εξισορρόπηση για 20 min, φυγοκέντρ. 80 ml αυτού 4000 rpm (20 min)	+	-	GC/MS LOD: 50-100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$
8	Διάφορα προϊόντα τροφίμων	50 g δείγμα +IS, ανάδευση 5 min, +300-400 mL νερό, ομογενοποίηση (1-3 min), φυγοκέντριση 48000g (20min,20°C)	+	+ (σύμφωνα με Castle et al., 1991)	GC/MS LOD:12 ng mL ⁻¹
9	Τροφή για βρέφη	10 g ομογεν. δείγμα +IS +50 mL νερό, λουτρό υπερήχων (30 min, 60°C)	+	-	GC-CI-MS/MS LOD:1-2 $\mu\text{g Kg}^{-1}$
10	Ψητό φαγητό	Καλά αλεσμένο δείγμα, απολίπανση με n-εξάνιο σε Soxhlet, απομάκρυνση δ/τη υπό κενό, 10g αυτού +50 mL MetOH, ανάδευση 15 min, λουτρό υπερήχων 1min, φυγοκέντριση 2500rpm (5min)	-	-	GC/MS LOD:2 $\mu\text{g Kg}^{-1}$
11	Διάφορα προϊόντα τροφίμων	2 g δείγμα + IS + 40 ml νερό, ομογενοποίηση (2 min), φυγοκέντριση 2600 rpm (10 min), λήψη υπερκείμενου + νερό ως 40 mL, 20 mL αυτού απολιπαίνονται με 10x2 mL εξάνιο, απομάκρυνση στιβάδας εξανίου (φυγοκέντριση αν απαραίτητο)	+	+	GC/MS LOD:9 $\mu\text{g Kg}^{-1}$
12	Τηγανιτές πατάτες (crisp) Βασισμένη στη μέθοδο Castle (1993)	10 gr δείγματος ομογενοποιούνται με 100 ml νερό, + IS, σε ηρεμία για 5 min, απομάκρυνση αφρού, φυγοκέντριση 5000 rpm (15 min), λήψη 25 ml υπερκείμενου	+	+	GC/MS LOD:1 $\mu\text{g Kg}^{-1}$
13	Δημητριακά πρωινού	1-2 g ομογεν. δείγμα + 10 ml AcN + IS, ανακάτεμα 1h, φυγοκέντριση υπερκείμενου 5200 rpm(10min) Σιλυλίωση , SPME	+	Σιλυλίωση	GC-MS/MS LOD:0,9 $\mu\text{g Kg}^{-1}$
14	σκευάσματα για σίτιση βρεφών (Εναλλακτική μέθοδος)	10g ομογεν. δείγμα + 50 ml νερό + 1mL IS, λουτρό υπερήχων (60°C, 30min), +30 ml ισοεξάνιο	+	-	GC-MS/MS LOD:1,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$
15	chips πατάτας, φρυγανισμένο ψωμί, κουλουράκια, παξιμάδι	10 g δείγμα + 150 ml AcN /Water + IS, ομογενοποιούνται με UltraTurrax (2 min) και με διαδικασία υπερήχων (30 min), απολίπανση με 60ml n-εξάνιο	+	-	GC/MS LOD:4,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

Πίνακας 2.4.2 (Συνέχεια) Μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας για τον προσδιορισμού του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα.

Αναφορά	Δείγμα	Εκχύλιση	Εσωτερικό Πρότυπο (IS)	Παραγωγοποίηση	Ανίχνευση
16	chips πατάτας, φρυγανισμένο ψωμί, κουλουράκια, παξιμάδι Βασισμένη στη μέθοδο Biedermann et al (2002)	25 g δείγμα + 75 ml νερό ομογενοποιούνται με UltraTurrax (2 min) και με διαδικασία υπερήχων (15 min), 25 ml αυτού + IS + 75 ml 1-προπανόλη, UltraTurrax (2 min) και υπερήχοι (15 min), φυγοκέντριση υπερκείμενου 5000rpm (10 min), + 10 σταγ. ηλιέλαιο, απομάκρυνση διαλύτη 8kPa (5 °C), + 2 ml AcN + 2x5 ml n-εξάνιο (απολίπανση)	+	-	GC/MS LOD:5,6μg Kg ⁻¹

1, Tareke *et al.* (2000); **2**, Tareke *et al.* (2002); **3**, Castle *et al.* (1991); **4**, Castle (1993); **5**, Ahn *et al.* (2002); **6**, Swiss Quality Testing Service (2003); **7a,b**, Biedermann *et al.* (2002); **8**, Ono *et al.* (2003); **9**, Wiertz-Eggert-Jörissen (2003); **10**, Tateo and Bononi (2003); **11**, Nemoto *et al.* (2002); **12**, Williams (2004); **13**, Lagalante (2004); **14**, Hoenicke (2004); **15,16**, Jezussek (2003).

IS, εσωτερικό πρότυπο; **LOD**, όριο ανίχνευσης; **rpm**, στροφές ανά λεπτό; **AA**, ακρυλαμίδιο; **MetOH**, μεθανόλη, **GC**=Αέρια χρωματογραφία, **MS**=Φασματομετρία Μάζας, **AcN**=ακετονιτρίλιο, **SPME**=Solid Phase Microextraction.

2.4.3 Ανάλυση με Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)

A) Εκχύλιση

Στην πλειοψηφία των LC μεθόδων που έχουν δημοσιευθεί, ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιείται το νερό (Tareke *et al.*, 2000, Rosén and Hellenäs, 2002, Becalski *et al.*, 2003). Έχει αναφερθεί ότι η θέρμανση ή χρήση υπερήχων για την υποβοήθηση της εκχύλισης πρέπει να αποφεύγονται καθότι είναι δυνατόν να παραχθούν μικροσωματίδια τα οποία μπορούν να φράξουν της στήλες κατά την εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό του δείγματος (FDA, 2003). Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί η χρησιμοποίηση θερμού νερού (80°C) χωρίς προβλήματα (Ahn *et al.*, 2002). Ακόμα, έχει χρησιμοποιηθεί μίγμα νερού και ακετόνης σαν διαλύτης εκχύλισης (Fauhl *et al.*, 2002, Takatsuki *et al.*, 2003).

Οι μηχανικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για το αρχικό στάδιο της εκχύλισης εμφανίζεται μεγάλη ποικιλία. Για παράδειγμα: οριζόντιος αναδευτήρας (Becalski *et al.*, 2003), περιστρεφόμενος αναδευτήρας (FDA, 2003), περιστασιακή ανάδευση (Ahn *et al.*,

2001, Takatsuki *et al.*, 2003), μηχανικός αναμίκτης ή vortex (Fauhl *et al.*, 2002). Επίσης, έχει προταθεί εκχύλιση με χρήση λουτρού υπερήχων (SQTS 2003), που είναι υπό διερεύνηση διότι όπως αναφέρθηκε μπορεί να επηρεάζει τον καθαρισμό.

Μερικά εργαστήρια πραγματοποίησαν απολίπανση πριν ή σε συνδυασμό με την εκχύλιση. Η απολίπανση γίνεται με εκχύλιση με εξάνιο, τολουόλιο ή κυκλοεξάνιο. Δεν έχει παρατηρηθεί καμία διαφορά στο χρωματογραφικό διαχωρισμό όταν τα δείγματα υπόκεινται απολίπανση με εξάνιο πριν την εκχύλισή τους με νερό (Wenzl *et al.*, 2003). Άλλα εργαστήρια χρησιμοποιούν επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη (ASE) (Cavalli *et al.*, 2002, Höfler *et al.*, 2002). Μετά την εκχύλιση, η υδατική φάση φυγοκεντρείται και/ή διηθείται (Becaski *et al.*, 2003, FDA, 2003, Ono *et al.*, 2003).

Όπως και στην μέθοδο GC-MS, προστίθεται εσωτερικό πρότυπο στο εκχύλισμα του τροφίμου για το έλεγχο της ανάκτησης και των απωλειών που μπορεί να συμβούν κατά την προετοιμασία του δείγματος (εκχύλιση, καθαρισμός). Ως εσωτερικά πρότυπα, συχνότερα, χρησιμοποιούνται: σημασμένο με ισότοπο [$^{13}\text{C}_3$]-ακρυλαμίδιο (Tareke *et al.*, 2002, Becalki *et al.*, 2003), [D_3]-ακρυλαμίδιο (Ahn *et al.*, 2002, Rosén and Hellenäs, 2002, Becalski *et al.*, 2003, Ono *et al.*, 2003) και [$^{13}\text{C}_1$]- ακρυλαμίδιο (Takatsuki *et al.*, 2003).

B) Καθαρισμός

Οι περισσότερες διαδικασίες καθαρισμού περιλαμβάνουν συνδυασμό διάφορων εκχυλίσεων στερεής φάσης (SPE) (Becalski *et al.*, 2003, Takatsuki *et al.*, 2003, Ono *et al.*, 2003). Οι Höfler *et al.* (2002) ανέφεραν ότι και η εκχύλιση στερεής φάσης και η εκχύλιση υγρού-υγρού δεν οδηγούν σε σημαντική βελτίωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης και χρησιμοποίησαν απλή διήθηση μέσω ενός φίλτρου 0,22-μm ως μοναδική επεξεργασία μετά την αρχική εκχύλιση και πριν την ανάλυση με HPLC.

Γ) Διαχωρισμός

Ο διαχωρισμός με υγρή χρωματογραφία παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.4.3.α Διαχωρισμός με υγρή χρωματογραφία (στοιχεία από Wenzl *et al.*, 2003).

Είδος Χρωματογραφίας	Παρατηρήσεις		
HPLC Ανεστραμμένης Φάσης Χρήση από τα περισσότερα εργαστήρια	Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στήλη είναι : - Hypercarb (5 μm) (Tareke <i>et al.</i> , 2000, Rosén and Hellenäs, 2002, Becalski <i>et al.</i> , 2003)	Άλλες στήλες που χρησιμοποιούνται: - Atlantis dC ₁₈ (Ono <i>et al.</i> , 2003) - μ- Bondapack C ₁₈ - Acqua C ₁₈	Ahn <i>et al.</i> (2002): σύγκριση διαφόρων στηλών ανεστραμμένης φάσης (Vydac 201SP54, Primisphere C ₁₈ -HC, Hypercarb, YMC-Pack ODSAQ, Hypersil, HyPURITY Elite and Hichrom HIPRP) ↓ Επιλογή της Primisphere C ₁₈ -HC (επαρκής κατακράτηση AA, 10 min χρωματογραφικός κύκλος)
HPLC Ιοντοανταλλαγής Χρήση ως εναλλακτική μέθοδος	Χρησιμοποιούμενη στήλη : - IonPac ICE- AS1 (Cavalli <i>et al.</i> , 2002, Höfler <i>et al.</i> , 2002)	Πλεονέκτημα της μεθόδου: Η μέθοδος εμφανίζει ↑ <i>k'</i> από την LC ανεστραμμένης φάσης → Καλός διαχωρισμός ακρυλαμιδίου ακόμα και από μη επεξεργασμένα εκχυλίσματα δειγμάτων.	
Two-dimensional LC	(Fauhl, 2003)		
Multi-dimensional LC	Χρήση 4 διαφορετικών στηλών για διαχωρισμό από προσμίξεις. (Takatsuki <i>et al.</i> , 2003)		

Δ) Ανιχνευτές

Οι ανιχνευτές ακρυλαμιδίου που έχουν χρησιμοποιηθεί από τους περισσότερους ερευνητές για την LC είναι οι παρακάτω (Wenzl *et al.*, 2003)

Πίνακας 2.4.3.β Ανιχνευτές ακρυλαμιδίου για την υγρή χρωματογραφία.

Ανιχνευτής Φάσματος Μάζας (tandem MS)	Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής
UV-DAD	$\lambda = 202 \text{ nm}$ (↓ εκλεκτικότητα, παρακωλύεται ο προσδιορισμός του ακρυλαμιδίου σε πολύπλοκα δείγματα) (Cavalli <i>et al.</i> , 2002, Höfler <i>et al.</i> , 2002)
Single quadrupole MS [in single ion monitoring mode (SIM)]	(Höfler <i>et al.</i> , 2002)
LC-MS/MS με MRM (Multiple Reaction Monitoring mode) ↑ <u>Εκλεκτικότητα</u> (Wenzl <i>et al.</i> , 2003)	<u>Ποσοτικοποίηση ακρυλαμιδίου συνήθως με:</u> Μεταβολή $72 \rightarrow 54$ (↑ ένταση) (Tareke <i>et al.</i> , 2000, Ahn <i>et al.</i> , 2002, Rosén and Hellenäs, 2002, Becalski <i>et al.</i> , 2003) <u>Για ανίχνευση σημασμένου ακρυλαμιδίου με ισότοπο, που χρησιμοποιείται σαν εσωτερικό πρότυπο, μεταβολές:</u> $75 \rightarrow 58$ για $[D_3]$ -ακρυλαμίδιο και $[^{13}C_3]$ - ακρυλαμίδιο $73 \rightarrow 56$ για $[^{13}C_1]$ -ακρυλαμίδιο (Wenzl <i>et al.</i> , 2003)

Παρά την υψηλή εκλεκτικότητα που προσφέρεται από το MS/MS, μπορεί και πάλι να υπάρχει πρόβλημα με προσμίξεις. Έχουν ανιχνευτεί κορυφές με χρόνο κατακράτησης ίδιο με αυτόν του ακρυλαμιδίου ή του δευτεριωμένου ακρυλαμιδίου. Αυτό το πρόβλημα θα μπορούσε να λυθεί μέσω της αύξησης του pH του διαλύματος από το οποίο το ακρυλαμίδιο εκχυλίζεται σε ένα οργανικό διαλύτη [πχ η συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης με διαλύτη (ASE) που χρησιμοποιείται κατά την εκχύλιση] (Swiss Federal Office of Public Health, 2002). Οι Becalski *et al.* (2003) κατά την ανάλυση τηγανητής πατάτας και δημητριακών ανέφεραν την ύπαρξη ενός συστατικού που συνεκλύεται με το ακρυλαμίδιο. Η αύξηση του μήκους της στήλης από 100 σε 150 mm ο καθαρισμός του δείγματος από SPE πριν από τη χρωματογραφία εξάλειψε το πρόβλημα.

Πίνακας 2.4.3.γ Μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης για τον προσδιορισμού του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα (δημοσιευμένες έρευνες).

Αναφορά	Δείγμα	Εκχύλιση	Εσωτερικό Πρότυπο (IS)	Ανίχνευση
1	Crisps πατάτας, κρέας, ψωμί	10 g ομογεν. δείγμα + 100 mL νερό + IS, φυγοκέντριση, επαναφυγοκέντριση υπερκείμενου 14000 rpm (10 min)	+	MS/MS LOD: 10 $\mu\text{g Kg}^{-1}$
2	Chips πατάτας, Crisps πατάτας, δημητριακά, ψωμί, καφές	16 g αλεσμένο δείγμα + 80 mL νερό + IS + 10 mL διγλωρομεθάνιο, 15 min οριζόντια ανάδευση, φυγοκέντριση 15000 rpm (2h, 4°C), 10 mL υπερκείμενου φυγοκεντρούνται 3500 rpm (4h, 4°C)	+	MS/MS LOD: ~6 $\mu\text{g Kg}^{-1}$
3	Φρυγανιά, crisps πατάτας, φρυγανισμένο ψωμί	10 g ομογεν. δείγμα + 100 mL ζεστό νερό (80±2°C), περιστασιακή ανάδευση για 2h, απότομη ψύξη, διήθηση υπό κενό	+	MS/MS LOD: ND
4	Φρυγανιά, crisps πατάτας, δημητριακά	2-4 g ομογεν. δείγμα + 40 ml νερό + IS, ομογενοποίηση (2 min, 9500min ⁻¹), φυγοκέντριση 3600g (10 min), {επιπλέον φυγοκέντριση για τα chips πατάτας στα 16800 g (10 min), μετά από καθίζηση με ψύξη}	+	MS/MS LOD: 10-30 $\mu\text{g Kg}^{-1}$
5,6	chips πατάτας, crisps πατάτας, φρυγανιά	5 g ομογεν. δείγμα εκχυλίζεται με επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη (ASE): διαλύτης είναι το νερό ή μυρμηγκικό οξύ, 83 °C, 10 MPa	-	UV LOD: -
7	Διάφορα είδη	50 g ομογεν. δείγμα + IS + 300-400 mL νερό, φυγοκέντριση 48000 g (20 min), ψύξη του υπερκείμενου, τήξη αυτού και επαναφυγοκέντριση 21700 g (10 min)	+	MS LOD: 0.2 ng mL ⁻¹
8	Διάφορα είδη	5 g δείγμα + 20-25 mL νερό + IS, περιστασιακή ανάδευση για 30 min, +50 ml ακετόνης, ανάδευση για 1 min, διήθηση με φίλτρο	+	MS LOD: 9 ng mL ⁻¹
9	Λεπτές φέτες τηγανιτής πατάτας (ζεματισμένες και μη)	4 gr ομογεν. δείγματος + 40 mL δισαπεσταγμένο νερό, + IS, UltraTurrax, φυγοκέντριση 3500 rpm (10 min)	+	HPLC-MS/MS LOD: -
10	Τηγανιτές πατάτες	ψύξη με υγρό N ₂ , 1 gr ομογεν. σκόνη δείγματος + 10 ml υπερχλωρικό οξύ (400mmol/L), ανάδευση 40 rpm (15 min, 25 °C), φυγοκέντριση 2000 rpm (10 min, 25 °C)	+	LC-MS/MS LOD: 1 ng mL ⁻¹
11	Ασιατικά φαγητά πλούσια σε CHO: ψητά, τηγανιτά, ρύζι, φιδές, Chinese Fritters (τηγανίτες), crisps	4 g δείγμα + IS + 40 ml απιονισμένο νερό, περιστρεφόμενη ανάδευση, φυγοκέντριση, διήθηση (φίλτρο 0,45 μm)	+	HPLC-MS/MS LOD: 3 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

Πίνακας 2.4.3.γ (Συνέχεια) Μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης για τον προσδιορισμού του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα (δημοσιευμένες έρευνες).

Αναφορά	Δείγμα	Εκχύλιση	Εσωτερικό Πρότυπο (IS)	Ανίχνευση
12	Chips πατάτας, τηγανιτές πατάτες, Φρυγανισμ. ψωμί, κουλουράκια, καβουρδισμ. καφές, δημητριακά, ψωμί, αλεύρι	2 g ομογεν. δείγμα + 80 mL ισοεξάνιο (για απολίπανση), + IS, επώαση 30 min, + 20 ml νερό, λουτρό υπερήχων (60°C, 30min)	+	HPLC- MS/MS LOD:10μg Kg ⁻¹
13	Κακάο, καφές, μελάσα, βύνη (Εναλλακτική μέθοδος)	2 g ομογεν. δείγμα + 50 ml νερό + 200μl IS λουτρό υπερήχων (60°C, 30min), +30 ml ισοεξάνιο	+	HPLC- MS/MS
14	chips πατάτας, φρυγανισμένο ψωμί, κουλουράκια, παξιμάδι	10g δείγμα + 80 ml νερό + IS, ομογενοποιούνται με UltraTurrax (2 min), υπέρηχοι (10 min), φυγοκέντριση 5000 rpm(10 min), το υπερκείμενο διηθείται ή επαναφυγοκεντρείται, + (2x30ml) n-εξάνιο για απολίπανση, + NaOH, παραγωγοποίηση	+	GC/MS LOD:4,0μg Kg ⁻¹
15	Καφές: στιγμιαίος αλεσμένος, φλιτζάνι βρασμένου καφέ	1 g (στιγμιαίος) ή 0,5 g (αλεσμένος) + 9 ml HPLC grade νερό + IS, vortex 30 sec, περιστρεφόμενη ανάδευση 20 min, φυγοκέντριση 9000 rpm (15 min), 5ml υπερκείμενου διηθούνται (φίλτρο 0,45 μm) (9 ml δείγμα χωρίς HPLC grade νερό , τα λοιπά ίδια)	+	HPLC- MS/MS LOD:10 μg Kg ⁻¹ LOD:1ng mL ⁻¹

1, Tareke *et al.* (2002); **2**, Becalski *et al.* (2003); **3**, Ahn *et al.* (2002); **4**, Rosén and Hellenäs (2002); **5**, Höfler *et al.* (2002); **6**, Cavalli *et al.* (2002); **7**, Ono *et al.* (2003); **8**, Takatsuki *et al.* (2003); **9**, Pedreschi (2004); **10**, Taubert (2004); **11**, Leung (2003); **12,13**, Hoenicke (2004); **14**, Jezussek (2003); **15**, Andrzejewski (2004)

IS, εσωτερικό πρότυπο; **LOD**, όριο ανίχνευσης; **rpm**, στροφές ανά λεπτό; **AA**, ακρυλαμίδιο; **HPLC**=Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, **MS**= Φασματομετρία Μάζας, **Acn**=ακετονιτρίλιο.

Πίνακας 2.4.3.δ Μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης για τον προσδιορισμού του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα (μη δημοσιευμένες έρευνες) (από: Wenzl *et al.*, 2003)

Αναφορά	Εκχύλιση	Εσωτερικό Πρότυπο (IS)	Ανίχνευση
1	4 g ομογενοποιημένο δείγμα + 40 mL νερό	+	MS/MS
2	4 g ομογενοποιημένο δείγμα + 40 mL νερό	+	MS/MS
3	5 g ομογεν. δείγμα, ASE. Εκχύλιση δύο φορές: πρώτη(απολίπανση με εξάνιο, διενεργείται 3 φορές), δεύτερη (85/15 AcN/Wat). 20 mL εκχυλίσματος συμπυκνώνονται στα 1-2 mL με περιστρεφόμενο εξατμιστήρα (40 °C), +1 mL 0.1M Na ₃ PO ₄ και ανάμειξη για 1min σε λουτρό υπερήχων.	+	MS/MS
4	2 g ομογεν. δείγμα τοποθετούνται πάνω σε φίλτρο και διηθούνται υπό κενό με 80 ml εξάνιο για απολίπανση (αυτό παραλείπεται αν το δείγμα είναι χαμηλό σε λιπαρά). Στο υπόλοιπο και στο φίλτρο προστίθενται 400 µl IS, μετά από 30 min + 20 mL νερό, λουτρό υπερήχων για 15 min, 60 °C.	+	MS/MS
5	2 g ομογεν. δείγμα τοποθετούνται πάνω σε φίλτρο και διηθούνται υπό κενό με 80 ml εξάνιο για απολίπανση (αυτό παραλείπεται αν το δείγμα είναι χαμηλό σε λιπαρά). Στο υπόλοιπο και στο φίλτρο προστίθενται 200 µl IS, μετά από 30 min + 20 mL νερό, λουτρό υπερήχων για 30 min, 60 °C.	+	MS/MS
6	1 g αλεσμένο δείγμα + IS + 9,5 mL νερό, περιστρεφόμενη ανάδευση για 10 min στο σκοτάδι, φυγοκέντριση 10000 rpm (10 min, 5 °C), 3 ml υπερκείμενου διηθούνται (0,45µm φίλτρο).	+	MS/MS
7	5 g ομογεν. δείγμα + 100 ml διαλύτη εκχύλισης (νερό + IS), αναμειξη, σε ηρεμία για 1h (Θ.Δ.).Μια ποσότητα φυγοκεντρείται 13000 g (5min) Τα λοιπά είναι ίδια με τη μέθοδο Rosén and Hellenäs (2002) Όμοια με Rosén and Hellenäs (2002)	+	MS/MS LOD: 10-30 µg Kg ⁻¹
8	10 g ομογεν. δείγμα + 100 mL νερό + IS, φυγοκέντριση, επαναφυγοκέντριση υπερκείμενου 14000 rpm (10 min) Η ίδια μέθοδος που χρησιμοποιείται από Tareke et al (2002)	+	MS
9	1 g ομογεν. δείγμα + IS + 9 mL νερό, ανάμειξη για 10 min με περιστρεφόμενη ανάδευση, φυγοκέντριση 9000 rpm (30 min) , 5 mL υπερκείμενο διηθείται με φίλτρο (0,45 µm). Φυγοκέντριση 9000 rpm (4 min).	+	MS/MS

1, Austrian Agency for Health and Food Safety Ltd (Food Control Innsbruck); 2, Austrian Agency for Health and Food Safety Ltd (Food Control and Research Vienna); 3, Swiss Federal Office of Public Health; 4, Lebensmittelchemisches Institut (LCI); 5, Labor WEJ; 6, Scientific Institute of Public Health-Louis Pasteur, Department of Pharmaco-Bromatology; 7, Inspectorate for Health Protection, Primary Agricultural & Horticultural Products Department; 8, Norwegian Institute for Air Research; 9, US Food and Drug Administration Centre for Food Safety and Applied nutrition, Office of Plant & Dairy Foods & Beverages.

IS: εσωτερικό πρότυπο; **LOD:** όριο ανίχνευσης, **AA:** ακρυλαμίδιο, **AcN:** ακετονιτρίλιο, **Wat:** νερό, **HPLC**=Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, **MS**= Φασματομετρία Μάζας

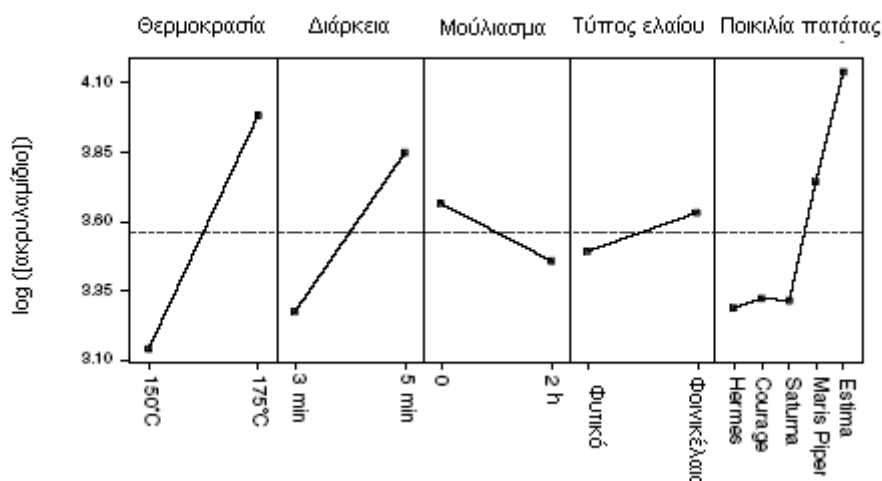
2.5 Παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό και τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα

Μετά την ανακοίνωση του Swedish National Food Administration (NFA) τον Απρίλιο του 2002 για την ανίχνευση ακρυλαμιδίου σε διάφορα ψητά και τηγανητά τρόφιμα, με βάση τις πρωταρχικές έρευνες των Tareke *et al.* (2000, 2002), έχουν γίνει διάφορες μελέτες που εξετάζουν τους παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στα τηγανητά κυρίως τρόφιμα.

Η ποιότητα των προτηγανισμένων πατατών μετά το κυρίως τηγάνισμα (δηλ. το δεύτερο) εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο, εκτός των άλλων, και για τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου. Η ωμή πατάτα περιέχει τις πρόδρομες ενώσεις για τον σχηματισμό του ακρυλαμιδίου (αμινοξέα και σάκχαρα). Παράγοντες που είναι πιθανό επηρεάζουν τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου είναι οι παρακάτω:

- Η θερμοκρασία τηγανίσματος
- Η διάρκεια τηγανίσματος
- Η ποικιλία της πατάτας
- Οι συνθήκες αποθήκευσης της ωμής πατάτας
- Η επεξεργασία της πατάτας πριν το τηγάνισμα (μούλιασμα/ ζεμάτισμα του τροφίμου, επίδραση με ασπαραγίνη και ανάγοντα σάκχαρα, αλλαγή του pH του τροφίμου, επίδραση με πρόσθετα, χρήση υλικών επικάλυψης)
- Το σχήμα της πατάτας
- Η ανάπτυξη χρώματος στο τρόφιμο
- Ο τύπος του ελαίου
- Η ποιότητα του ελαίου (Matthäus *et al.*, 2004)

Παρακάτω αναλύονται αυτοί οι παράγοντες σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία.



Σχήμα 2.5 Επίδραση διαφόρων παραγόντων στο λογάριθμο της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου (Williams, 2004)

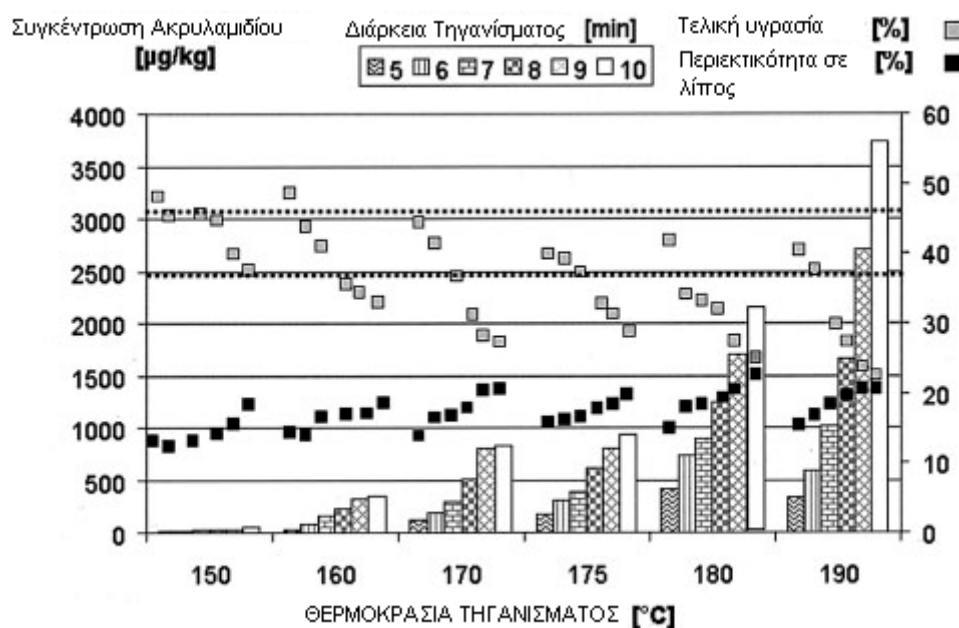
2.5.1 Θερμοκρασία και διάρκεια τηγανίσματος

Οι Matthäus *et al.* (2004) περιέγραψαν την επίδραση διαφόρων παραγόντων στη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου σε πατάτες που έχουν τηγανιστεί με βαθύ τηγάνισμα (φριτέζα). Η ποσότητα του ακρυλαμιδίου στις τηγανιτές πατάτες παρουσίαζε αύξηση παράλληλα με την αύξηση της θερμοκρασίας τηγανίσματος καθώς και με τη διάρκεια τηγανίσματος, ειδικά σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 175°C. Η αύξηση του ακρυλαμιδίου με τη διάρκεια τηγανίσματος, διατηρώντας τη θερμοκρασία σταθερή, παρουσίαζε γραμμική συσχέτιση, με μεγαλύτερη κλίση στις υψηλότερες θερμοκρασίες. Αντίθετα, διατηρώντας σταθερή τη διάρκεια τηγανίσματος, παρουσιάστηκε εκθετική σχέση μεταξύ ακρυλαμιδίου και θερμοκρασίας. Μέχρι τη θερμοκρασία των 150-170°C τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου ήταν σχετικά χαμηλά, ενώ σε θερμοκρασίες κοντά στους 180 και 190°C παρουσιάστηκε θεαματική αύξηση σε αυτά. Συνεπώς, η μείωση της θερμοκρασίας σε συνοδευόμενη από τηνανάλογη αύξηση της διάρκειας τηγανίσματος είναι δυνατόν να οδηγήσει σε μείωση της απόλυτης τιμής της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου στο τρόφιμο (Matthäus *et al.*, 2004).

Οι δύο αυτές παράμετροι, η θερμοκρασία και η διάρκεια τηγανίσματος, αποτελούν τις δύο βασικές παραμέτρους που είναι δυνατόν να μειώσουν τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στο οικιακό τηγάνισμα (Biedermann *et al.*, 2002, Gertz *et al.*, 2002, Rydberg *et al.*, 2003, Matthäus *et al.*, 2004).

Η τελική υγρασία που παραμένει στο τρόφιμο μετά το τηγάνισμα είναι καθοριστική για την ποιότητά του. Σύμφωνα με τη βιομηχανία τροφίμων, η τελική υγρασία που

πρέπει ιδανικά να υπολείπεται στο τρόφιμο μετά το τηγάνισμα είναι μεταξύ 38 και 45%. Με την αύξηση της θερμοκρασίας καθώς και της διάρκειας τηγανίσματος παρατηρείται μείωση της τελικής υγρασίας του τροφίμου. Εφόσον ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου στο τρόφιμο ακολουθεί την αντίδραση *Maillard*, μία γρήγορη μείωση της υγρασίας στην εξωτερική επιφάνεια του τροφίμου σε υψηλότερες θερμοκρασίες, δρα ευνοϊκά στον σχηματισμό του ακρυλαμιδίου (Matthäus *et al.*, 2004).



Σχήμα 2.5.1.α Συσχέτιση μεταξύ συνθηκών τηγανίσματος πατατας, υγρασίας του τελικού προϊόντος, λίπους και συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου (Matthäus *et al.*, 2004).

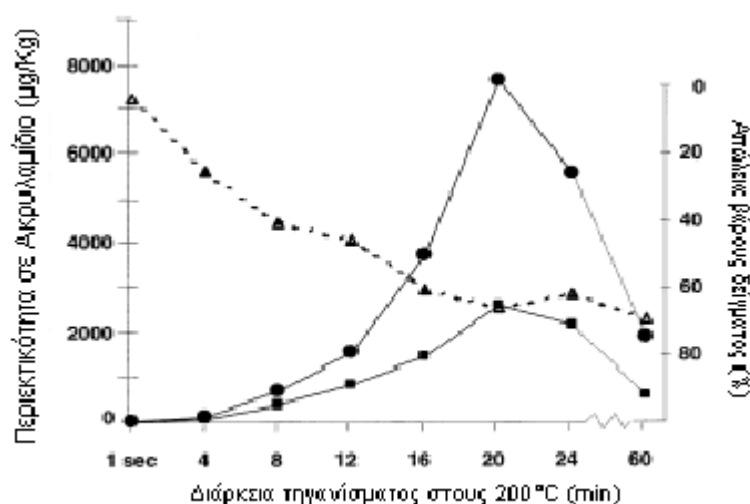
Στην έρευνά του ο Williams (2004) μελετώντας τους παράγοντες που επιδρούν στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου σε πατατάκια (τσιπς) τηγανισμένα σε φριτέζα, έδειξε ότι η διάρκεια τηγανίσματος και η θερμοκρασία έχουν τη μεγαλύτερη επίδραση.

Στη μελέτη των Pedreschi *et al.* (2004a) το μέσο περιεχόμενο του ακρυλαμιδίου αυξήθηκε κατά ~58 φορές καθώς η θερμοκρασία τηγανίσματος αυξήθηκε από τους 120 στους 180°C, είτε σε ζεματισμένες είτε σε μη ζεματισμένες πατάτες πριν το βαθύ τηγάνισμα.

Οι Pedreschi *et al.* (2004b) έδειξαν ότι ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου αυξάνεται δραματικά καθώς η θερμοκρασία τηγανίσματος αυξάνεται από τους 150 στους 190°C. Αυτό το συμπέρασμα ίσχυε και για πατάτες που δεν είχαν υποστεί καμία επεξεργασία πριν το τηγάνισμα αλλά και για πατάτες που είτε είχαν αφεθεί να μουλιάσουν σε νερό,

είτε είχαν ζεματιστεί, είτε είχαν εμβάπτιστεί σε διάλυμα κιτρικού οξέος πριν το τηγάνισμα.

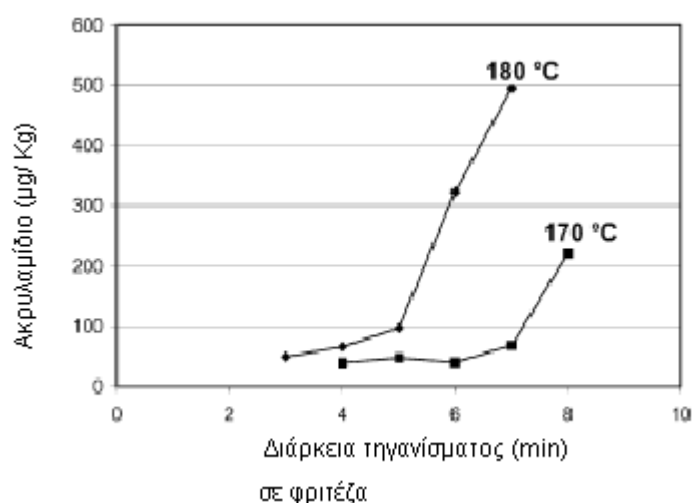
Στη μελέτη των Rydberg *et al.* (2003) υποστηρίζεται ότι το περιεχόμενο του ακρυλαμιδίου σε θερμασμένα τρόφιμα αποτελεί το συνδυαστικό αποτέλεσμα πολύπλοκων αντιδράσεων που οδηγούν στο σχηματισμό και την αποικοδόμηση του. Στα πειράματα που έγιναν, χρησιμοποιήθηκαν ομογενοποιημένες πατάτες που ψήθηκαν σε φούρνο. Πολύ υψηλές θερμοκρασίες (200°C) σε συνδυασμό με παρατεταμένη διάρκεια θέρμανσης του τροφίμου οδήγησε σε μείωση των επιπέδων του ακρυλαμιδίου, πιθανόν εξαιτίας διαδικασιών αποικοδόμησης.



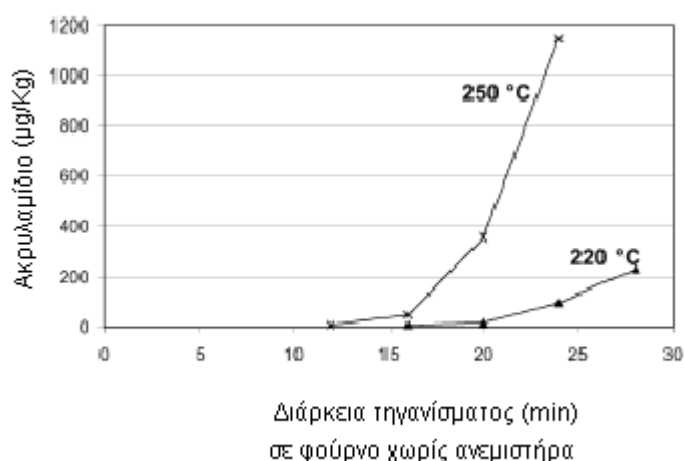
Σχήμα 2.5.1.β Σχήματισμός ακρυλαμιδίου (σε $\mu\text{g/Kg}$) σε πατάτες που θερμάνθηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα στους 200°C, σε φούρνο. Παρουσιάζονται οι τιμές λαμβάνοντας (τετράγωνα) ή όχι (κύκλοι) υπόψη την απώλεια βάρους (που παριστάνεται με στικτή γραμμή) (Rydberg *et al.* 2003)

Στη μελέτη των Grob *et al.* (2003) έγινε προσπάθεια να παραχθούν τηγανιτές πατάτες (τηγανισμένες σε φριτέζα ή ψητές στο φούρνο) υψηλής ποιότητας και χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο. Προτάθηκε ότι, αφού ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου αυξάνεται δραματικά κοντά στο τέλος της διαδικασίας τηγανίσματος, ο πιο σημαντικός παράγοντας ελέγχου των επιπέδων του ακρυλαμιδίου είναι ο προσδιορισμός του κατάλληλου σημείου λήξης του τηγανίσματος. Τελικά, παρήχθησαν τηγανιτές πατάτες με 40-70 $\mu\text{g/Kg}$ ακρυλαμιδίου, δηλ. 5-10 φορές λιγότερο σε σχέση με τα συνηθισμένα επίπεδα. Επίσης, προτάθηκε ότι η αρχική θερμοκρασία του ελαίου τηγανίσματος πρέπει να είναι κοντά στους 170°C και να τηγανίζονται 100 g πατάτας σε 1 L ελαίου. Για το

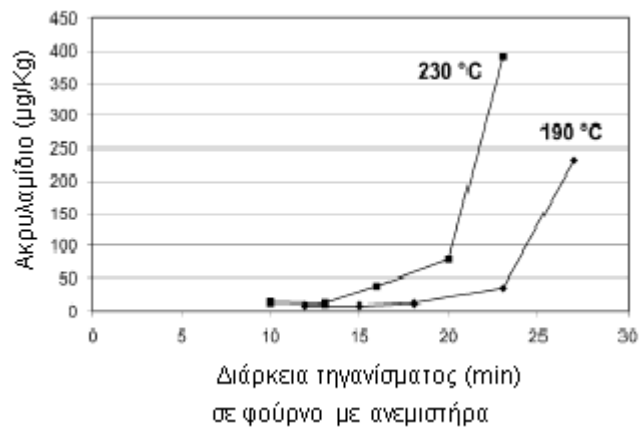
ψήσιμο στο φούρνο, απαιτούνται θερμοκρασίες 190 ή 220°C, ανάλογα με το αν ο αέρας ανακυκλώνεται ή όχι.



Σχήμα 2.5.1.γ Περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου σε πατάτες που τηγανίστηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα σε αρχικές θερμοκρασίες τηγανίσματος 170°C ή 180°C (Grob *et al.*, 2003)



Σχήμα 2.5.1.δ Περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου σε πατάτες που μαγειρεύτηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα σε φούρνο χωρίς ανεμιστήρα στις θερμοκρασίες που φαίνονται. Η θερμοκρασία 250°C ήταν σύμφωνη με τις οδηγίες του προμηθευτή των κατεψυγμένων πατατών (Grob *et al.*, 2003)



Σχήμα 2.5.1.ε Περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου σε πατάτες που μαγειρεύτηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα σε φούρνο με ανεμιστήρα (Grob *et al.*, 2003)

Στη μελέτη των Surdyk *et al.* (2004) το ψήσιμο σταρένιου ψωμιού στον φούρνο σε υψηλές θερμοκρασίες (άνω των 200°C) και η παράταση της διάρκειας ψησίματος συνέβαλαν στην αύξηση των επιπέδων του ακρυλαμιδίου στην κόρα στο ψωμιού (από 10 σε 1900 μg/ Kg ξηρού βάρους).

Στη μελέτη των Takatsuki *et al.* (2004) προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου σε αφυδατωμένο πολτό πατάτας, σιτάλευρο, νιφάδες καλαμποκιού, ρυζάλευρο, αποξηραμένο σουσάμι και ξηρά αμύγδαλα. Τα τρόφιμα αυτά ψήθηκαν στους 120-200°C για 5-20 min. Όταν τα τρόφιμα ψήθηκαν για 10 min, η υψηλότερη ποσότητα ακρυλαμιδίου παρατηρήθηκε στους 180-200°C. Όταν τα δείγματα ψήθηκαν στους 180°C, τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου σε όλα τα τρόφιμα, εκτός από το σουσάμι, ήταν υψηλότερα μετά από διάρκεια ψησίματος 10 min. Επίσης, λαχανικά και φρούτα ψήθηκαν στους 220°C για 5 min σε φούρνο. Υψηλά επίπεδα ακρυλαμιδίου βρέθηκαν επίσης σε ψητές πατάτες, σπαράγγια, κολοκύθες και μελιτζάνες.

2.5.2 Ποικιλία της πατάτας

Η ελεύθερη ασπαραγίνη και τα ανάγοντα σάκχαρα (όπως γλυκόζη, φρουκτόζη) ταυτοποιήθηκαν σαν πρόδρομες ενώσεις για τον σχηματισμό του ακρυλαμιδίου (Motttram *et al.*, 2002, Weißhaar *et al.*, 2002). Ο γονότυπος της πατάτας καθορίζει την περιεκτικότητα της σε αυτές τις ενώσεις. Έτσι, η ποικιλία της πατάτας καθώς και η τοποθεσία της καλλιέργειας επιδρούν στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου (Amrein *et al.*, 2003).

Παρουσιάστηκε σημαντική συσχέτιση ($r=0.73$) μεταξύ της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου και της γλυκόζης στην ωμή πατάτα, ενώ δεν παρουσιάστηκε σημαντική συσχέτιση με τη συγκέντρωση της ελεύθερης ασπαραγίνης στην ωμή πατάτα (Matthäus *et al.*, 2004). Αυτό το εύρημα συμφωνεί με το εύρημα των Amrein *et al.* (2003). Παράλληλα, η επίδραση της θερμοκρασίας τηγανίσματος στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλία της πατάτας. Σε συγκεκριμένες ποικιλίες πατάτας (π.χ. Saturna) παρουσιάζεται ισχυρότερη συσχέτιση μεταξύ της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου απ' ό,τι σε άλλες ποικιλίες (π.χ. Tomensa) (Amrein *et al.*, 2003, Matthäus *et al.*, 2004). Συνεπώς, το περιεχόμενο της ωμής πατάτας σε ανάγοντα σάκχαρα είναι καθοριστικό για το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου (Matthäus *et al.*, 2004).

Η τοποθεσία της καλλιέργειας παρουσιάζεται να έχει πολύ μεγάλη επίδραση στην ικανότητα του κονδύλου της πατάτας να οδηγεί σε σχηματισμό ακρυλαμιδίου κατά την επεξεργασία του (Haase *et al.*, 2003a,b, Amrein *et al.*, 2003, Grob *et al.*, 2003).

Στα ίδια αποτελέσματα οδηγήθηκε και ο Williams (2004), ο οποίος έδειξε ότι η ποικιλία της πατάτας έχει πολύ μεγάλη επίδραση στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου και ότι τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου εξαρτώνται βασικά από το αρχικό περιεχόμενο της πατάτας σε ανάγοντα σάκχαρα παρά σε ασπαραγίνη.

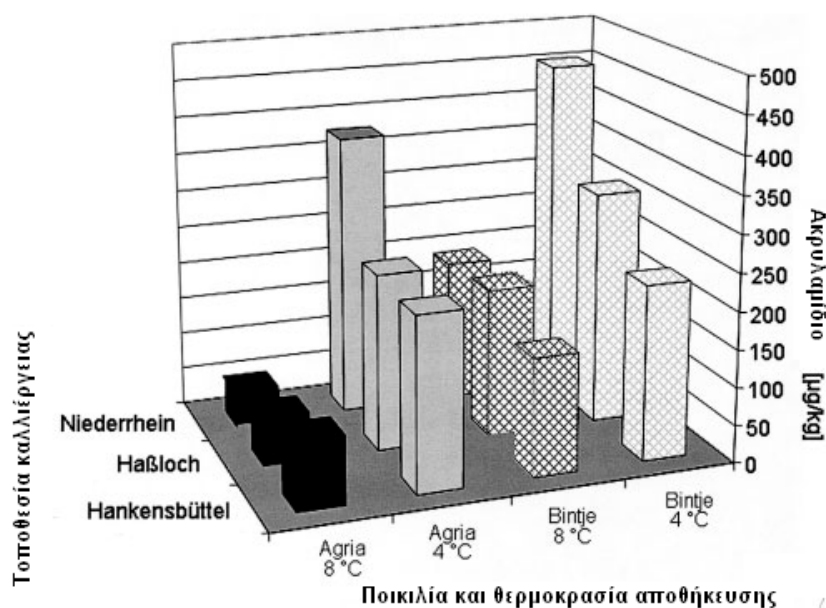
Σύμφωνα με τους Biedermann-Brem *et al.* (2003) ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου είναι δυνατόν να μειωθεί με τον έλεγχο της διαδικασίας μαγειρέματος. Παρόλα αυτά, η επιλογή κατάλληλων πατατών είναι απαραίτητη. Η τάση σχηματισμού του ακρυλαμιδίου από την πατάτα μπορεί να προσεγγιστεί με βάση το αρχικό περιεχόμενο της ωμής πατάτας σε ανάγοντα σάκχαρα. Στην συγκεκριμένη μελέτη, εξετάστηκαν καβουρντισμένες πατάτες (ομογενοποιημένες βραστές πατάτες τηγανισμένες σε τηγάνι με μικρή ποσότητα ελαίου, 20 mL) και πατάτες ψητές στο φούρνο (κομμένες σε κύβους που μούλιασαν σε νερό πριν το ψήσιμο). Στόχος ήταν η ελαχιστοποίηση της ποσότητας του ακρυλαμιδίου και ταυτόχρονα η διατήρηση της ποιότητας του τηγανιτού τροφίμου. Συμπέρασμα της έρευνας ήταν ότι πατάτες με περιεχόμενο σε γλυκόζη μικρότερο από 0,2 g/ Kg νωπού βάρους δεν είναι κατάλληλες για καβούρντισμα (μη ικανοποιητικό χρώμα και γεύση). Αντίθετα, τα καβουρντισμένα προϊόντα με περιεκτικότητα αναγόντων σακχάρων μεγαλύτερη από 1 g/ Kg οδηγούν σε μείωση της τραγανιστής υφής του τροφίμου και σε επίπεδα ακρυλαμιδίου πάνω από 500 $\mu\text{g/ Kg}$. Προτάθηκε ότι οι πατάτες που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για καβούρντισμα ή τηγάνισμα πρέπει να έχουν περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα μικρότερη από 1 g/ Kg νωπού βάρους. Αυτό είναι

δυνατό να επιτευχθεί στις κυρίως καλλιεργούμενες ποικιλίες πατάτας, με την προϋπόθεση ότι οι πατάτες δεν θα αποθηκεύονται μετασυλλεκτικά στους 4°C.

Στη μελέτη των Becalski *et al.* (2004) προσδιορίστηκε η ποσότητα του ακρυλαμιδίου σε πατάτες τηγανισμένες σε φριτέζα στους 180°C για 3,5 min. Τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου που προσδιορίστηκαν εμφάνιζαν μεγάλες διακυμάνσεις (50-1800 ng/g). Τελικά, προέκυψε ότι η επίδραση των σακχάρων και της ασπαραγίνης στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου στις τηγανιτές πατάτες είναι θετική και στατιστικά σημαντική. Φαίνεται ότι μία από τις οδούς σχηματισμού του ακρυλαμιδίου μπορεί να ελεγχθεί αποτελεσματικά μέσω της χρησιμοποίησης ωμών πατατών με χαμηλό περιεχόμενο σε σάκχαρα (και σε μικρότερο βαθμό, σε ασπαραγίνη).

2.5.3 Συνθήκες αποθήκευσης της ωμής πατάτας

Σημαντικός παράγοντας για το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου στις τηγανιτές πατάτες είναι η θερμοκρασία αποθήκευσης των ωμών κονδύλων πατάτας. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής οι κόνδυλοι της πατάτας αλλάζουν φυσιολογικά χαρακτηριστικά σαν αποτέλεσμα της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών τους από τις πρωτεάσες (Matthäus *et al.*, 2004). Παράλληλα, κατά τη μετασυλλεκτική αποθήκευση αυξάνονται οι χαμηλού μοριακού βάρους υδατάνθρακες στους κονδύλους της πατάτας (Richardson *et al.*, 1990, Haase *et al.*, 2003c).



Σχήμα 2.5.3 Η επίδραση των συνθηκών καλλιέργειας και αποθήκευσης (δύο ποικιλίες, 3 τοποθεσίες καλλιέργειας, δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης) στα επίπεδα ακρυλαμιδίου σε τηγανητές πατάτες (Matthäus *et al.*, 2004).

Η μείωση της θερμοκρασίας αποθήκευσης από τους 8° στους 4°C είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των αναγόντων σακχάρων στην ωμή πατάτα, το οποίο οδηγούσε σε μεγαλύτερη τάση για σχηματισμό ακρυλαμιδίου στο τελικό προϊόν. Σαν αποτέλεσμα της μείωσης της θερμοκρασίας αποθήκευσης η ποσότητα του ακρυλαμιδίου στο τρόφιμο αυξήθηκε κατά 2-7 φορές, ανάλογα με την ποικιλία και την τοποθεσία της καλλιέργειας. Συνεπώς, η εφαρμογή κατάλληλης θερμοκρασίας αποθήκευσης οδηγεί σε σημαντικά χαμηλότερα ποσά ακρυλαμιδίου (Matthäus *et al.*, 2004).

Στη μελέτη των Grob *et al.* (2003) τονίζεται ότι η αποθήκευση τις πατάτας κάτω από τους 10°C πρέπει να αποφεύγεται.

Στη μελέτη των Chuda *et al.* (2003) προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου σε πατατάκια που παρασκευάστηκαν από κονδύλους πατάτας αποθηκεμένους στους 2 ή στους 20°C για δύο εβδομάδες μετά τη συλλογή τους. Τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου στα πατατάκια που παρασκευάστηκαν από κονδύλους πατάτας αποθηκεμένους στους 2°C ήταν δεκαπλάσια σε σχέση με τα πατατάκια που παρασκευάστηκαν από κονδύλους πατάτας αποθηκεμένους στους 20°C. Αυτό το γεγονός συσχετίστηκε ισχυρά με τα επίπεδα φρουκτόζης και γλυκόζης στους κονδύλους της πατάτας.

2.5.4 Η επεξεργασία της πατάτας πριν το τηγάνισμα

Ι) Ζεμάτισμα και μούλιασμα της ωμής πατάτας σε νερό πριν το τηγάνισμα

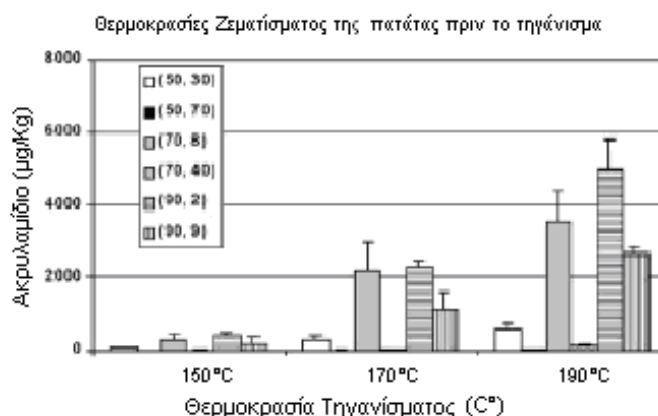
Ένας άλλος τρόπος μείωσης του ακρυλαμιδίου στις τηγανητές πατάτες είναι η ελάττωση του περιεχομένου της ωμής πατάτας σε ανάγοντα σάκχαρα και ελεύθερη ασπαράγίνη. Αυτό είναι δυνατόν να γίνει με το ζεμάτισμα (82°C, 2,5 min) ή το μούλιασμα (50°C, 15 min) των πατατών, κατά τη διάρκεια των οποίων οι πρόδρομες ενώσεις του ακρυλαμιδίου εκχυλίζονται από την επιφάνεια της πατάτας μέσα στο νερό. Και οι δύο αυτές διαδικασίες οδήγησαν σε ελαχιστοποίηση της συγκέντρωσης των αναγόντων σακχάρων στο ωμό τρόφιμο, που είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου κατά ~60% στο έτοιμο προς βρώση τρόφιμο (Matthäus *et al.*, 2004). Παρόμοια αποτελέσματα περιγράφονται και από τους Grob *et al.* (2003). Στη μελέτη των Grob *et al.* (2003) προτάθηκε ότι η πατάτα πρέπει να

αφήνεται σε κρύο ή σε βραστό νερό για 15 min ώστε να απομακρυνθούν τα σάκχαρα και η ασπαραγίνη από την επιφάνεια του τροφίμου, χωρίς όμως να απομακρυνθεί το άμυλο.

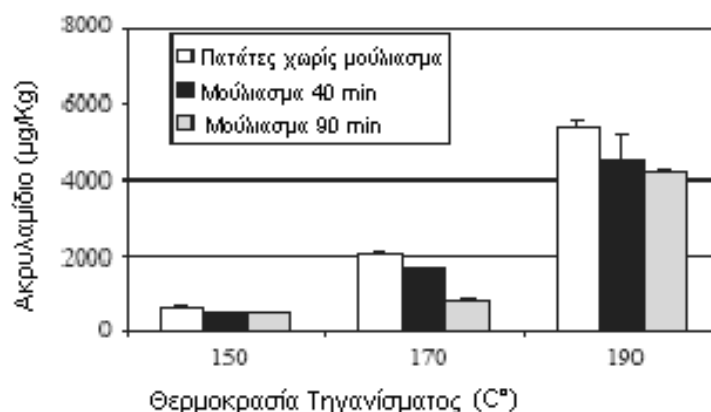
Στη μελέτη των Pedreschi *et al.* (2004a) οι τεμαχισμένες πατάτες ζεματίστηκαν στους 85°C για 3,5 min πριν το τηγάνισμα και συγκρίθηκαν με μη ζεματισμένες. Και οι ζεματισμένες και οι μη ζεματισμένες πατάτες τηγανίστηκαν στους 120, 150 και 180°C μέχρι να επιτευχθεί ~1,8% περιεχόμενη υγρασία. Το ζεμάτισμα μείωσε το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου στις τηγανιτές πατάτες κατά ~64% σε σχέση με τις μη ζεματισμένες πατάτες και για τις τρεις θερμοκρασίες τηγανίσματος.

Αντίθετα, ο Williams (2004) έδειξε ότι το μούλιασμα ολόκληρου του κονδύλου της πατάτας πριν το τηγάνισμα δεν παίζει σημαντικό ρόλο.

Σε μία άλλη μελέτη, οι Pedreschi *et al.* (2004b) μελέτησαν την επίδραση τριών διαφορετικών διαδικασιών επεξεργασίας της πατάτας, πριν το τηγάνισμα, στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν πριν το τηγάνισμα αλλά μετά τον τεμαχισμό των πατατών ήταν: μούλιασμα σε απεσταγμένο νερό (για 0, 40, 90 min), ζεμάτισμα σε καυτό νερό (50°C για 30 και 70 min, 70°C για 8 και 40 min, 90°C για 2 και 9 min), εμβάπτιση σε διάλυμα κιτρικού οξέος (10 και 20 g/L) για 30 min. Οι θερμοκρασίες στις οποίες τηγανίστηκαν όλα τα παραπάνω δείγματα ήταν 150, 170 και 190°C μέχρι να επιτευχθεί τελικό περιεχόμενο υγρασίας ~1,7 g νερού/ 100 g. Το περιεχόμενο της γλυκόζης μειώθηκε κατά ~32% στις πατάτες που μούλιασαν για 90 min. Οι πατάτες που μούλιασαν εμφάνισαν μία μέση μείωση στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου κατά 27%, 38% και 20% σε θερμοκρασίες τηγανίσματος 150, 170 και 190°C, αντιστοίχως, συγκρινόμενες με τις πατάτες που δε μούλιασαν. Οι πατάτες που ζεματίστηκαν στους 50°C για 70 min εμφάνισαν πολύ χαμηλό περιεχόμενο ακρυλαμιδίου (28 µg/ Kg) ακόμα και όταν η θερμοκρασία τηγανίσματος ήταν 190°C. Η εμβάπτιση των πατατών σε διαλύματα κιτρικού οξέος (10 και 20 g/L) μείωσε το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου σχεδόν κατά 70% για θερμοκρασία τηγανίσματος 150°C. Και για τις τρεις διαδικασίες που μελετηθήκαν, ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου αυξανόταν δραματικά με την άνοδο της θερμοκρασίας από τους 150° στους 190°C. Συνεπώς, η προστατευτική δράση αυτών των διαδικασιών εμφανίζεται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες.



Σχήμα 2.5.4.α Περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου σε πατάτες τηγανισμένες στους 150°C, 170°C και 190°C, οι οποίες προηγουμένως έχουν ζεματιστεί σε διάφορους χρόνου-θερμοκρασίας. Στην παρένθεση, το πρώτο νούμερο αναφέρεται στη θερμοκρασία και το δεύτερο στο χρόνο ζεματίσματος (Pedreschi *et al.*, 2004b)



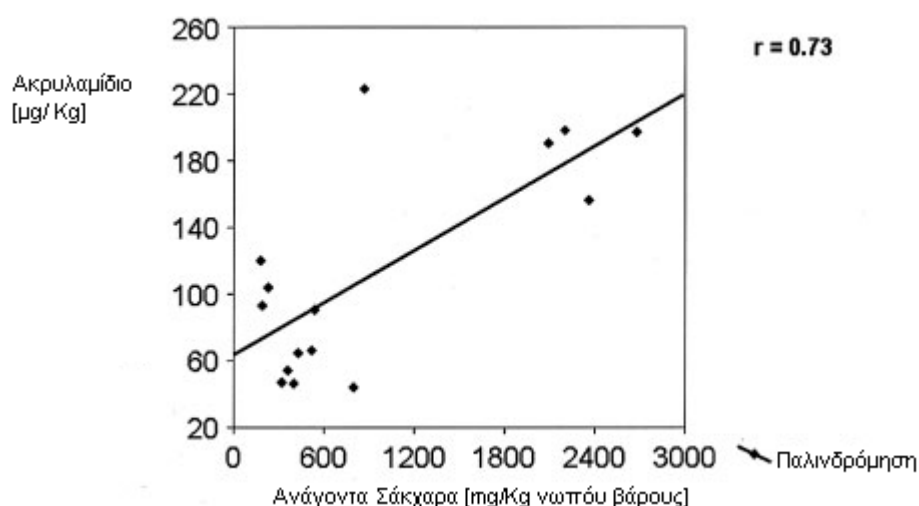
Σχήμα 2.5.4.β Περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου σε πατάτες τηγανισμένες στους 150°C, 170°C και 190°C, οι οποίες προηγουμένως έχουν μουλιάσει για 0, 40, και 90 min. (Pedreschi *et al.*, 2004b)

Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου σε πατάτες και σπαράγγια που ψήθηκαν στο φούρνο, αφού προηγουμένως προ-μαγειρεύτηκαν σε μικροκύματα, ήταν υψηλότερη απ' ό,τι σε πατάτες που δεν ήταν προ-μαγειρεμένες. Αντίθετα, το βράσιμο πριν το ψήσιμο μείωσε το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου κατά τη διάρκεια του ψησίματος κατά 10-25%. Το ακρυλαμίδιο δεν εντοπίστηκε σε λαχανικά βρασμένα ή μαγειρεμένα σε μικροκύματα (Takatsuki *et al.*, 2004).

II) Ασπαραγίνη και Ανάγοντα Σάκχαρα

Στη μελέτη των Rydberg *et al.* (2003), η επώαση της πατάτας πριν το μαγείρεμα σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις ασπαραγίνης ή μονοσακχαριτών (συγκεκριμένα φρουκτόζη, γλυκόζη και γλυκεριναλδεϋδη) οδήγησαν σε αύξηση του τελικού περιεχομένου του ακρυλαμιδίου σε ομογενοποιημένες πατάτες ψημένες στο φούρνο. Η προσθήκη επιπλέον ελεύθερων αμινοξέων ή η ανάμιξη της ομογενοποιημένης πατάτας με τρόφιμα πλούσια σε πρωτεΐνη (ψάρι) οδήγησαν σε σημαντική μείωση του περιεχομένου του ακρυλαμιδίου. Αυτό είναι πιθανό να προέκυψε μέσω αντιδράσεων ανταγωνισμού και/ ή μέσω ομοιοπολικής δέσμευσης του σχηματιζόμενου ακρυλαμιδίου.

Στην έρευνα των Surdyk *et al.* (2004) αναλύθηκε το περιεχόμενο του ακρυλαμιδίου σε σταρένιο ψωμί φτιαγμένο με προζύμι. Βρέθηκε ότι πάνω από το 99% του ακρυλαμιδίου σχηματίζεται στην κόρα του ψωμιού. Η προσθήκη ασπαραγίνης οδήγησε σε δραματική αύξηση των επί ξηρού επιπέδων του ακρυλαμιδίου στην κόρα (από περίπου 80 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ σε 600-6000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), ενώ η προσθήκη φρουκτόζης δεν επηρέασε τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου.



Σχήμα 2.5.4.γ Συσχέτιση μεταξύ αρχικής συγκέντρωσης αναγόντων σακχάρων και συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου σε τηγανητές πατάτες (Matthäus *et al.*, 2004).

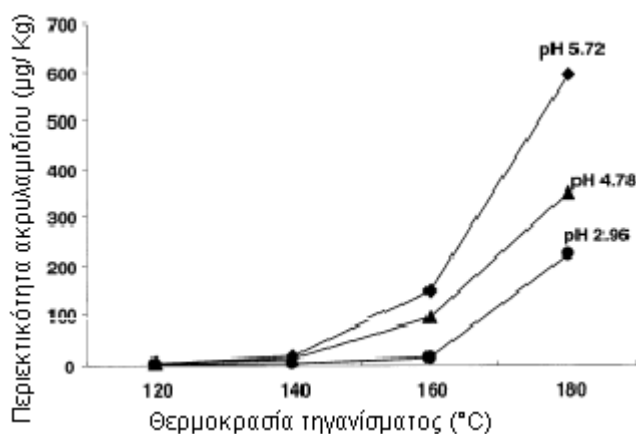
Στη μελέτη των Takatsuki *et al.* (2004) υψηλές συγκεντρώσεις ασπαραγίνης σε σπαρτά οδήγησαν σε υψηλότερα επίπεδα ακρυλαμιδίου που σχηματίστηκαν κατά τη θέρμανση αυτών των αγροτικών προϊόντων.

Σε μία άλλη μελέτη (Amrein *et al.*, 2004), η ελεύθερη ασπαραγίνη (σε ψωμί από τζίντζερ) αποδείχτηκε ως περιοριστικός παράγοντας για το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Συνεπώς, υποστηρίχθηκε ότι η ελαχιστοποίηση της ελεύθερης ασπαραγίνης μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση των επιπέδων του

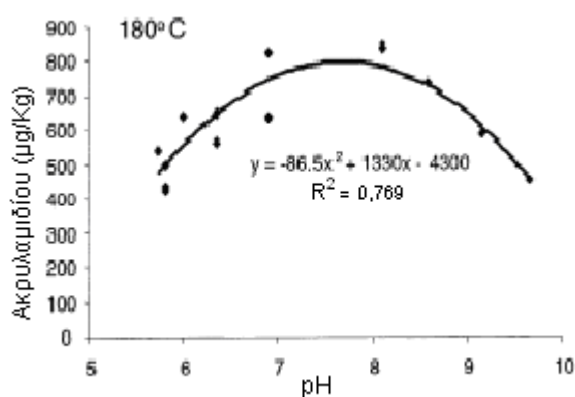
ακρυλαμιδίου. Όμως, το περιεχόμενο του ακρυλαμιδίου ήταν δυνατό να μειωθεί και με την αντικατάσταση των αναγόντων σακχάρων με σακχαρόζη ή με την προσθήκη οργανικών οξέων.

III) Η επίδραση του pH του τροφίμου

Στη μελέτη των Rydberg *et al.* (2003) η περιεκτικότητα του ακρυλαμιδίου στο τρόφιμο φάνηκε να εξαρτάται από το pH του τροφίμου. Στη μελέτη αυτή, η μείωση του pH του τροφίμου επιτεύχθηκε μέσω της επώασης του τροφίμου σε διάλυμα HCl, ασκορβικού ή κιτρικού οξέος ενώ η αύξηση του pH μέσω διαλύματος NaOH. Η μέγιστη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου παρουσιάστηκε σε pH 8. Συγκεκριμένα, το χαμηλότερο pH φάνηκε να προάγει την εξάλειψη και να επιβραδύνει το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου.



Σχήμα 2.5.4.δ Η επίδραση του pH στα επίπεδα του ακρυλαμιδίου σε ομογενοποιημένες πατάτες θερμασμένες σε φούρνο σε διάφορες θερμοκρασίες. Το αρχικό pH του δείγματος ήταν 5,72 και η αύξηση του pH επιτεύχθηκε με προσθήκη HCl. Η θέρμανση διήρκεσε 25 min (Rydberg *et al.*, 2003)



Σχήμα 2.5.4.ε Η επίδραση του pH στα επίπεδα του ακρυλαμιδίου σε ομογενοποιημένες πατάτες θερμασμένες σε φούρνο. Το pH ρυθμίστηκε με NaOH του pH επιτεύχθηκε με προσθήκη HCl. Η θέρμανση στους 180 °C διήρκεσε 25 min min (Rydberg *et al.*, 2003).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, και στη μελέτη των Pedreschi *et al.* (2004b), παρατηρήθηκε μείωση του σχηματισμού του ακρυλαμιδίου σε πατάτες που επωάστηκαν σε διάλυμα κιτρικού οξέος, με αποτέλεσμα τη μείωση του pH τους. Αυτή η ευεργετική δράση εμφανίστηκε μόνο στους 150°C τηγανίσματος, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες (170° και 190°C) δεν είχε καμία επίδραση.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της μελέτης των Kita *et al.* (2004), το ζεμάτισμα αλλά και το μούλιασμα της πατάτας σε όξινο διάλυμα (κιτρικού ή οξικού οξέος) οδήγησε σε μείωση του pH της πατάτας και σε εντονότερη εκχύλιση των αμινοξέων και των σακχάρων της. Οι τηγανητές πατάτες που λήφθηκαν μετά από αυτή τη διαδικασία χαρακτηρίζονταν από χαμηλά επίπεδα ακρυλαμιδίου. Περισσότερο αποτελεσματική ήταν η εκχύλιση που επιτεύχθηκε με το μούλιασμα της πατάτας σε διάλυμα οξικού οξέος (60 min, 20°C) παρά σε κιτρικό, η οποία οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου περίπου κατά 90%.

IV) Πρόσθετα

Η χρήση του διμεθυλοπολυσιλοξανίου (ελαίου σιλικόνης, DMPS, E900) ως αντιαφριστικού παράγοντα δεν παρουσίασε σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στο τρόφιμο (175°C, 6 min) (Matthäus *et al.*, 2004).

Αντίθετα, Οι Gertz *et al.* (2002, 2003) διαπιστώσαν υψηλότερα επίπεδα ακρυλαμιδίου σε πατάτες που τηγανίστηκαν με έλαιο στο οποίο είχε γίνει προσθήκη ελαίου σιλικόνης. Στην ίδια έρευνα παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη σιλικόνης, ειδικά σε έλαια τηγανίσματος με μεγαλύτερο περιεχόμενο σε πολικά συστατικά, είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό συγκριτικά υψηλότερων επιπέδων ακρυλαμιδίου.

Μια άλλη έρευνα που έγινε από το German Institute for Food Technology (DIL) (Kreyenmeyer, 2003) έδειξε ότι δεν παρουσιάζεται διαφοροποίηση του περιεχομένου του ακρυλαμιδίου με την προσθήκη σιλικόνης είτε σε φρέσκο είτε σε χρησιμοποιημένο έλαιο τηγανίσματος.

Στη μελέτη των Rydberg *et al.* (2003) η προσθήκη αντιοξειδωτικών ή οξειδωτικών είχε αμελητέα επίδραση στο περιεχόμενο του ακρυλαμιδίου.

Σε μία άλλη μελέτη (Amrein *et al.*, 2004) μετρήθηκαν τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου σε ψωμί φτιαγμένο από τζίντζερ υπό την επίδραση διαφόρων διογκωτικών. Φάνηκε ότι η προσθήκη όξινου ανθρακικού αμμωνίου ενίσχυσε σημαντικά το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Αντιθέτως, η προσθήκη όξινου ανθρακικού νατρίου οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου κατά >60%.

V) Η επικάλυψη της επιφάνειας του τροφίμου

Στην έρευνα των Fiselier *et al.* (2004) μελετήθηκε ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου σε πατατοκροκέτες του εμπορίου και βρέθηκαν μέτρια επίπεδα ακρυλαμιδίου (50-570 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) τα οποία εξαρτώνταν κυρίως από τις συνθήκες τηγανίσματος. Η τάση σχηματισμού του ακρυλαμιδίου σε αυτά τα προϊόντα δεν ήταν έντονη διότι η σκόνη πατάτας που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τους είχε χαμηλό περιεχόμενο σε ασπαραγίνη και ανάγοντα σάκχαρα. Η προσθήκη αποβουτυρωμένης σκόνης γάλακτος οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του ακρυλαμιδίου στους 120°C , κατά 200-700 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, πιθανόν λόγω της ύπαρξης λακτόζης. Αντιθέτως, η προσθήκη αυγού δεν επηρέασε το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Η επικάλυψη από αυγό/ψίχα ψωμιού είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης του χρώματος στο τρόφιμο ενώ παράλληλα οδήγησε σε μείωση του σχηματισμού του ακρυλαμιδίου. Η επικάλυψη αυτή προστατεύει την πατάτα από τη θερμότητα ενώ παράλληλα τα συστατικά της υπόκεινται σε αμαύρωση που δεν συνδέεται με το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Κροκέτες που παρασκευάστηκαν από φρέσκια πατάτα επιβεβαίωσαν ότι η επικάλυψη με αυγό/ψίχα ψωμιού βελτιώνει την ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος ενώ παράλληλα μειώνει σημαντικά το περιεχόμενο του ακρυλαμιδίου.

2.5.5 Το σχήμα της πατάτας

Έχει δειχθεί ότι η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στις τηγανιτές πατάτες εξαρτάται από τον λόγο της επιφάνειας προς τον όγκο της πατάτας που τηγανίζεται. Τηγανιτές πατάτες κομμένες σε χοντρά κομμάτια (14x14 mm, SVR: 3,3 cm^{-1}) παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερα ποσά ακρυλαμιδίου σε σχέση με πατάτες κομμένες σε λεπτές ράβδους (8x8 mm, SVR: 5,4 cm^{-1}). Το ακρυλαμίδιο σχηματίζεται κυρίως στην επιφανειακή κρούστα του τροφίμου διότι αυτή αφυδατώνεται περισσότερο κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος και έτσι δημιουργούνται συνθήκες που ευνοούν το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Όσο πιο μικρές είναι οι ράβδοι της πατάτας τόσο πιο γρήγορα αφυδατώνονται. Συνεπώς αν η επιφάνεια του τροφίμου αυξηθεί σε σχέση με το βάρος του, ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου ευνοείται (Matthäus *et al.*, 2004).

Οι Taubert *et al.* (2004) εξέτασαν το περιεχόμενο του ακρυλαμιδίου σε πατάτες τεμαχισμένες σε διάφορα μεγέθη: 30x15 mm (SVR: 0,27 mm^{-1}), 30x3 mm (SVR: 0,80 mm^{-1}), 16,8x6,0x12 mm (SVR: 2,12 mm^{-1}). Στις πατάτες με χαμηλό λόγο επιφάνειας προς όγκο (SVR), το περιεχόμενο του ακρυλαμιδίου αυξανόταν, συνέχεια, παράλληλα

με την αύξηση της θερμοκρασίας και της διάρκειας τηγανίσματος. Αντίθετα, στις πατάτες με ενδιάμεσο ή υψηλό SVR, η μέγιστη τιμή του ακρυλαμιδίου παρουσιάστηκε ανάμεσα στους 160-180°C, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες ή σε παρατεταμένους χρόνους τηγανίσματος τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου μειώνονταν.

2.5.6 Ανάπτυξη χρώματος στο τρόφιμο

Στη μελέτη των Pedreschi *et al.* (2004a) μελετήθηκε η κινητική της ανάπτυξης χρώματος (αμαύρωσης) σε βαθιά τηγανισμένες πατάτες που είχαν ζεματιστεί ή όχι πριν το τηγάνισμα. Παρουσιάστηκε γραμμική συσχέτιση μεταξύ του περιεχομένου του ακρυλαμιδίου και του χρώματος του τηγανιτού τροφίμου.

Στη μελέτη των Grob *et al.* (2003) προτάθηκε ότι προκειμένου οι τηγανητές πατάτες να έχουν χαμηλή συγκέντρωση ακρυλαμιδίου, πρέπει να έχουν τραγανιστή υφή με ελάχιστη ανάπτυξη χρώματος στα άκρα, ώστε να αναπτυχθεί η χαρακτηριστική οσμή και γεύση τηγανίσματος χωρίς, όμως να υπάρχει έντονη αμαύρωση.

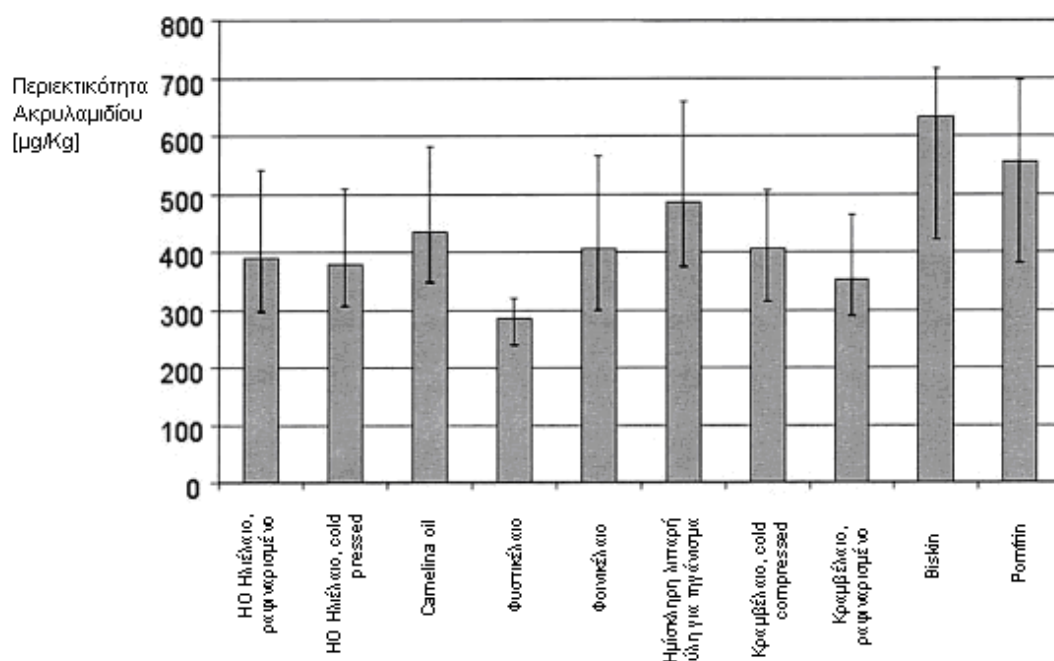
Στη μελέτη των Surdyk *et al.* (2004) παρουσιάστηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του χρώματος της κόρας του ψωμιού και του περιεχομένου της σε ακρυλαμίδιο. Η προσθήκη ασπαραγίνης δεν οδήγησε σε αύξηση του χρώματος, δείχνοντας ότι κυρίως άλλες ενώσεις που περιέχουν αμινομάδες παίρνουν μέρος στις αντιδράσεις αμαύρωσης.

Σε μία άλλη μελέτη (Amrein *et al.*, 2004), η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου και η ένταση της αμαύρωσης του τροφίμου (ψωμί από τζίντζερ) αυξάνονταν με την διάρκεια ψησίματος και συσχετιζόνταν μεταξύ τους.

Αντίθετα, σύμφωνα με μία άλλη μελέτη (Taubert *et al.*, 2004), το επίπεδο αμαύρωσης (δηλαδή η ένταση του χρώματος που αναπτύχθηκε) στο τρόφιμο δεν αποτέλεσε αξιόπιστο μέτρο του περιεχομένου του ακρυλαμιδίου σε τηγανιτές πατάτες με μεγάλη επιφάνεια.

2.5.7 Είδος του ελαίου τηγανίσματος

Τα διάφορα είδη ελαίου παρουσιάζουν διαφορές ως προς την ικανότητά τους να μεταφέρουν θερμότητα στο τρόφιμο, γεγονός που θα μπορούσε να προκαλέσει διαφοροποίηση στη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στο τρόφιμο. Παρά ταύτα, το είδος του ελαίου δεν παρουσίασε σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στο τρόφιμο (Matthäus *et al.*, 2004).



Σχήμα 2.5.7 Η επίδραση του είδους του ελαίου στη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου σε τηγανιτές πατάτες (συνθήκες τηγανίσματος: 175°C, 6 min) (Matthäus *et al.*, 2004).

Επίσης, σύμφωνα με τον Williams (2004) το είδος του ελαίου τηγανίσματος ήταν άνευ σημασίας. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την έρευνα των Gertz *et al.* (2002), στην οποία βρέθηκαν υψηλότερα ποσά ακρυλαμιδίου σε πατάτες τηγανισμένες με φοινικέλαιο σε σχέση με τα ποσά σε πατάτες τηγανισμένες με κραμβέλαιο ή με ηλιέλαιο.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η επίδραση του τύπου του ελαίου τηγανίσματος δεν έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές. Αυτό πιθανό να οφείλεται στο ότι ο τύπος του ελαίου δεν ασκεί επιρροή στις οδούς σχηματισμού του ακρυλαμιδίου, αφού τα συστατικά του λίπους δεν λαμβάνουν μέρος στις αντιδράσεις σχηματισμού.

2.5.8 Ποιότητα του ελαίου τηγανίσματος

Οι Matthäus *et al.* (2004) μελέτησαν την επίδραση της ποιότητας του ελαίου τηγανίσματος στη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου. Η ποιότητα του ελαίου προσδιορίστηκε με βάση τα επίπεδα των ολιγομερών των τριγλυκεριδίων. Παρά τη σταδιακή υποβάθμιση του ελαίου τηγανίσματος, δεν παρουσιάστηκε αύξηση του ακρυλαμιδίου (175°C, 6 min). Συνεπώς, το τηγάνισμα με χρησιμοποιημένα έλαια δεν οδηγεί σε μεγαλύτερα ποσά ακρυλαμιδίου σε σχέση με το τηγάνισμα με φρέσκα έλαια. Η μείωση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου δεν μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση φρέσκου ελαίου.

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, ο Williams (2004) έδειξε ότι η ποιότητα του ελαίου τηγανίσματος (εκτιμημένη με τον αριθμό υπεροξειδίων) δεν επηρεάζει το επίπεδα του ακρυλαμιδίου.

Παρατηρούμε ότι, και για την επίδραση της ποιότητας του ελαίου τηγανίσματος στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου, δεν έχουν γίνει πολλές μελέτες. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στον ίδιο λόγο για το οποίο δεν έχουν γίνει πολλές μελέτες για τον τύπο του ελαίου τηγανίσματος.

2.6 Τρόποι ελάττωσης και ελέγχου του σχηματισμού του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα κατά το τηγάνισμα

Ο έλεγχος του σχηματισμού του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα μπορεί να επιτευχθεί με τους παρακάτω τρόπους:

- Τα αμυλούχα τρόφιμα (πχ πατάτες) πρέπει να τηγανίζονται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 175°C. Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί ώστε να μην αυξάνεται η θερμοκρασία κοντά στο τέλος του τηγανίσματος (Matthäus *et al.*, 2004).
- Η διάρκεια τηγανίσματος και ψησίματος δεν θα πρέπει να είναι παρατεταμένη (Rydberg *et al.*, 2003).
- Τα τηγανητά, τα ψητά και τα καβουρντισμένα τρόφιμα δεν θα πρέπει να έχουν έντονο καφέ χρώμα (Pedreschi *et al.*, 2004a).
- Οι πατάτες που πρόκειται να τηγανιστούν δεν θα πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 10°C (Grob *et al.*, 2003).
- Προτείνεται η επιλογή ποικιλίας πατάτας με χαμηλό περιεχόμενο σε ανάγοντα σάκχαρα και ασπαραγίνη. Το περιεχόμενο αυτό καθορίζεται, εκτός από το είδος της πατάτας, και από την τοποθεσία της καλλιέργειας (Amrein *et al.*, 2003).
- Το μούλιασμα ή το ζεμάτισμα της πατάτας σε νερό πριν το τηγάνισμα οδηγεί σε ελάττωση το σχηματισμού του ακρυλαμιδίου (Matthäus *et al.*, 2004).
- Η επώαση της πατάτας πριν το τηγάνισμα σε όξινο διάλυμα (κιτρικού και οξικού οξέος) μειώνει το pH και οδηγεί σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου μετά το τηγάνισμα (Rydberg *et al.*, 2003).
- Υδρόλυση της ασπαραγίνης σε ασπαρτικό οξύ και αμμωνία επωάζοντας την πατάτα με διάλυμα ασπαραγινάσης, πριν το μαγείρεμα (Friedman, 2003).

- Έχει προταθεί η επικάλυψη του τροφίμου που πρόκειται να τηγανιστεί με μίγμα ψίχας ψωμιού και αυγού (Fiselier *et al.*, 2004)
- Έχει φανεί ότι οι τηγανιτές πατάτες που είναι κομμένες σε χοντρές φέτες οδηγούν σε μείωση του σχηματισμού του ακρυλαμιδίου (Matthäus *et al.*, 2004).
- Η αύξηση της υγρασίας του τροφίμου μπορεί να οδηγήσει σε ελάττωση του σχηματισμού του ακρυλαμιδίου (0,5% αύξηση της υγρασίας οδηγεί σε μείωση του ακρυλαμιδίου κατά 20%) (2nd Acrylamide in Food Workshop, 2004).
- Καταστολή των γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της ασπαραγίνης στο τρόφιμο (Friedman, 2003).

Η δυνατότητα εφαρμογής αυτών των μεθόδων ελάττωσης της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου δεν έχει μελετηθεί πλήρως. Είναι απαραίτητο να ελεγχθούν τα τρόφιμα που προκύπτουν από οργανοληπτικής άποψης ώστε να είναι αποδεκτά από τους καταναλωτές. Επίσης θα πρέπει να ελεγχθεί η θρεπτική αξία του τροφίμου και ο πιθανός σχηματισμός άλλων ανεπιθύμητων παραπροϊόντων (JECFA, 2005).

2.7 Επίπεδα του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα

Στην 64η συνέλευση του Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2005), παρουσιάστηκαν δεδομένα για τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου τα οποία συγκεντρώθηκαν από 24 χώρες, στο χρονικό διάστημα δύο ετών (2002-2004). Ο συνολικός αριθμός των αναλύσεων που έγιναν (σε απλά και σε σύνθετα δείγματα) ήταν 6752. Το 67,6% των δεδομένων προέρχονταν από την Ευρώπη, το 21,9% από τη Βόρεια Αμερική, το 8,9% από την Ασία και το 1,6% από χώρες του Ειρηνικού. Δεν υπήρχαν δεδομένα από τη Λατινική Αμερική και την Αφρική.

Πίνακας 2.7 Περιεκτικότητα διαφόρων τροφίμων σε ακρυλαμίδιο (JECFA, 2005)

Τρόφιμα	Αριθμός Δειγμάτων	Μέση συγκέντρωση ($\mu\text{g/kg}$) ***	CV ^β (%)	Μέγιστη Τιμή ($\mu\text{g/kg}$)
Δημητριακά και προϊόντα με βάση τα δημητριακά *	3,304 (12,346)	343	156	7,834
Δημητριακά και ζυμαρικά, ωμά ή βραστά	113 (372)	15	71	47
Δημητριακά και ζυμαρικά, ψητά ή τηγανιτά	200 (634)	123	110	820
Προϊόντα βασισμένα στα δημητριακά, όλα	2,991 (11,327)	366	151	7,834
Ψωμί	1,294 (5,145)	446	130	3,436
Μπισκότα, γλυκά από ζύμη	1,270 (4,980)	350	162	7,834
Δημητριακά πρωινού	369 (1,130)	96	131	1,346
Πίτσα	58 (85)	33	270	763
Ψάρια, θαλασσινά (ψητά, τηγανιτά, ή επικαλυμένα με ψίχα ψωμιού)*	52 (107)	25	180	233
Κρέας, εντόσθια (τηγανιτά, ψητά, ή επικαλυμένα)*	138 (325)	19	174	313
Γάλα και γαλακτοκομικά *	62 (147)	5.8	119	36
Ξηροί καρποί*	81 (203)	84	233	1,925
Όσπρια*	44 (93)	51	137	320
Ρίζες και κόνδυλοι*	2,068 (10,077)	477	108	5,312
Πατάτα (πουρές, βραστή)	33 (66)	16	92	69
Πατάτα ψητή	22 (99)	169	150	1,270
Πατατάκια	874 (3,555)	752	73	4,080
Τηγανιτές πατάτες	1,097 (6,309)	334	128	5,312
Πατατοκροκέτες (κατεψυγμένες)	42 (48)	110	145	750
Ροφήματα ^{α*}	469 (1,455)	509	120	7,300
Καφές (βρασμένος, έτοιμος προς κατανάλωση)	93 (101)	13	100	116
Καφές (αλεσμένος, στιγμιαίος ή καβουρντισμένος)	205 (709)	288	51	1,291
Εκχύλισμα καφέ	20 (119)	1,100	93	4,948
Καφές, χωρίς καφεΐνη (decaffeinate)	26 (34)	668	169	5,399
Υποκατάστατα του καφέ	73 (368)	845	90	7,300
Προϊόντα του κακάο	23 (23)	220	111	909
Πράσινο τσάι (ζυμωμένο)	29 (101)	306	67	660
Γλυκά και μέλι (κυρίως σοκολάτα) *	58 (133)	24	87	112
Λαχανικά *	84 (193)	17	206	202
Ωμά, βραστά ή κονσέρβα	45 (146)	4.2	103	25
Επεξεργασμένα (τηγανιτά, ψητά)	39 (47)	59	109	202
Φρούτα, φρέσκα	11 (57)	<1	188	10
Φρούτα, αποξηραμένα, τηγανιτά, επεξεργασμένα	37 (49)	131	125	770
Αλκοολούχα ποτά (μπύρα, gin, κρασί)	66 (99)	6,6	143	46
Αρτύματα και σάλτσες	19 (22)	71	345	1,168
Σκέυασμα για βρέφη	82 (117)	<5	82	15
Κρέμα μωρού (σε βάζο)	96 (226)	22	82	121
Σκόνη για κρέμα μωρού	24 (34)	16	125	73
Τρόφιμα για μωρά (μπισκότα)	32 (58)	181	106	1,217
Αποξηραμένη τροφή	13 (13)	121	266	1,184

* Για τον υπολογισμό της διεθνούς πρόσληψης ακρυλαμιδίου χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι ομάδες τροφίμων με έντονους χαρακτήρες

** Αριθμός των αναλύσεων για απλά και για σύνθετα δείγματα. Στη παρένθεση παρουσιάζεται ο συνολικός αριθμός των απλών δειγμάτων

*** Δεδομένα κάτω από το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης θεωρήθηκε ότι περιέχουν τη μισή συγκέντρωση ακρυλαμιδίου από τα όρια

^α Συγκεντρώσεις στο βρασμένο καφέ (η τιμή πολλαπλασιάστηκε επί 28 ώστε να μετατραπεί η συγκέντρωση του

ροφήματος σε συγκέντρωση της σκόνης του καφέ)

^β CV= Coefficient of Variation (Συντελεστής μεταβλητότητας)

Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2005)

2.8 Αξιολόγηση της διαιτητικής πρόσληψης του ακρυλαμιδίου στον πληθυσμό

Στην 64η συνέλευση του Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2005), αξιολογήθηκε η διεθνής διαιτητική πρόσληψη του ακρυλαμιδίου από τα δεδομένα 17 χωρών. Τα δεδομένα προέρχονταν από όλες τις γεωγραφικές περιοχές εκτός από τη Λατινική Αμερική και την Αφρική, για τις οποίες δεν υπήρχαν στοιχεία διαιτητικής πρόσληψης.

Η εκτίμηση της πρόσληψης σε εθνικό επίπεδο κυμαινόταν από 0,3 έως 2,0 $\mu\text{g/Kg}$ ΣΒ/ημέρα για τον μέσο του γενικού πληθυσμού. Για τους καταναλωτές που βρίσκονταν στα υψηλά εκατοστημόρια (90^ο και 97,5^ο) η εκτίμηση της πρόσληψης κυμαινόταν από 0,6 μέχρι 3,5 $\mu\text{g/Kg}$ ΣΒ/ημέρα, και 5,1 $\mu\text{g/Kg}$ ΣΒ/ημέρα για τους καταναλωτές στο 99^ο εκατοστημόριο. Σύμφωνα με τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν, τα παιδιά παρουσίασαν προσλήψεις ακρυλαμιδίου που ήταν περίπου δύο με τρεις φορές μεγαλύτερες από αυτές των ενηλίκων, εκφρασμένες σε $\mu\text{g/Kg}$ ΣΒ/ημέρα.

Εξαιτίας του ότι δεν υπάρχουν ανεκτά επίπεδα πρόσληψης για το ακρυλαμίδιο, θεωρήθηκε σκόπιμο από τον JECFA να αναφερθεί η σχετική συνεισφορά των τροφίμων στη συνολική πρόσληψη του ακρυλαμιδίου. Στις περισσότερες χώρες, τα τρόφιμα που κυρίως συνεισféρανε στη συνολική έκθεση στο ακρυλαμίδιο ήταν οι τηγανιτές πατάτες (16-30%), τα πατατάκια (6-46%), ο καφές (13-39%), τα γλυκίσματα από ζύμη και τα μπισκότα (10-20%) και το ψωμί (φρυγανισμένα προϊόντα) (10-30%). Τα υπόλοιπα τρόφιμα συνεισféρανε λιγότερο από 10% στη συνολική έκθεση.

Σύμφωνα με τα δεδομένα, το εύρος της διεθνούς μέσης πρόσληψης υπολογίστηκε να είναι 3,0-4,3 $\mu\text{g/Kg}$ ΣΒ/ημέρα, για τις χώρες συμμετοχής. Η πρόσληψη ακρυλαμιδίου από τα δημητριακά υπολογίστηκε να είναι 1,3-2,6 $\mu\text{g/Kg}$ ΣΒ/ημέρα ενώ η πρόσληψη από ρίζες και κονδύλους 0,5-2,6 $\mu\text{g/Kg}$ ΣΒ/ημέρα.

Ο JECFA (2005) συμπέρανε ότι, με βάση τους υπολογισμούς σε εθνικό επίπεδο, η πρόσληψη για τον μέσο του γενικού πληθυσμού μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι 1 $\mu\text{g/Kg}$ ΣΒ/ημέρα και η πρόσληψη για έναν καταναλωτή μεγάλων ποσοτήτων τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου μπορεί να είναι 4 $\mu\text{g/Kg}$ ΣΒ/ημέρα. Σε αυτές τις εκτιμήσεις της διαιτητικής πρόσληψης του ακρυλαμιδίου συμπεριλαμβάνονται και τα παιδιά (JECFA, 2005).

Πίνακας 2.8 Περίληψη των τοξικολογικών δεδομένων για το ακρυλαμίδιο από το JECFA (2005).

Εκτιμωμένη μέση πρόσληψη ακρυλαμιδίου: 0,001 mg/Kg ΣΒ/ημέρα		
Εκτιμωμένη υψηλή πρόσληψη ακρυλαμιδίου: 0,004 mg/Kg ΣΒ/ημέρα		
Δράση	NOEL ή BMDL mg/Kg ΣΒ/ημέρα	Παρατηρήσεις/ Συμπεράσματα
Μορφολογικές αλλαγές στα νεύρα	NOEL 0,2	Σύμφωνα με αυτά τα όρια, αρνητικές επιδράσεις είναι απίθανο να εμφανιστούν σε άτομα με μέση πρόσληψη ακρυλαμιδίου, αλλά μορφολογικές αλλαγές στα νεύρα είναι πιθανό να συμβούν σε άτομα με πολύ υψηλή πρόσληψη.
Βλάβες στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη	NOEL 2	
Καρκίνος	BMDL 0,3	Θεωρήθηκε από τον JECFA ότι το ακρυλαμίδιο είναι πιθανό να αποτελεί ένα κίνδυνο για την δημόσια υγεία. Συνεπώς, οι προσπάθειες που γίνονται για τη μείωση του ακρυλαμιδίου πρέπει να συνεχιστούν.

NOEL=no- observable -effect level (επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρείται επίδραση στον οργανισμό)

BMDL=benchmark dose lower confidence limit

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Πειραματικό Μέρος

3.1 Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων

Φριτέζα (KENWOOD)

Τηγάνι οικιακού τύπου

Αναδευτήρας Vortex

Ζυγός (Precise standard, OHAUS), ακρίβειας ενός δεκαδικού ψηφίου

Ζυγός (Analytical standard, OHAUS), ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Επιτραπέζια φυγόκεντρος (Hermle Z 320)

Μηχανικός αναμίκτης (Blender)

Μηχανικός αναδευτήρας (Mixer)

Ηθμοί μεμβράνης (Millipore Millex HV, Filter Unit 0.45 μm)

Φιαλίδια για τον αυτόματο δειγματολήπτη του HPLC (vials)

Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας

Συσκευή εξάτμισης με ρεύμα αερίου αζώτου

Υδρόλουτρο

Φιάλες φυγοκέντρου των 100 mL

3.2 Διαδοχικά Τηγανίσματα στη Φριτέζα και στο Τηγάνι

3.2.1 Υλικά

Προτηγανισμένες πατάτες εμπορικά διαθέσιμες (Μπαρμπα-Στάθης)

Παρθένο ελαιόλαδο εμπορικά διαθέσιμο (Χωριό, MINEPBA)

Bonfrito (μίγμα φοινικελαίου, βαμβακελαίου και ηλιελαίου) (Αγροτική Α.Ε.)

Βαμβακέλαιο εμπορικά διαθέσιμο (MANA)

3.2.2 Πορεία τηγανίσματος στη φριτέζα (βαθύ τηγάνισμα)

Αρχικά ζυγίζεται με ακρίβεια ενός δεκαδικού ψηφίου ο άδειος κάδος της φριτέζας. Στη συνέχεια προστίθενται στον κάδο ~2 L από το έλαιο τηγανίσματος. Από το έλαιο που προστέθηκε παραλαμβάνονται περίπου 10 mL, ως δείγμα φρέσκου ελαίου, και

μεταφέρονται σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα. Στη συνέχεια, ζυγίζεται ο κάδος μαζί με το περιεχόμενο έλαιο. Ο κάδος τοποθετείται στην ειδική υποδοχή και κλείνεται το καπάκι της φριτέζας. Το έλαιο θερμαίνεται ακριβώς στους 170°C με τη βοήθεια θερμοστάτη.

Παράλληλα, σε προζυγισμένο φέρον μέσο ζυγίζονται, περίπου 400 g προτηγανισμένες πατάτες, με ακρίβεια ενός δεκαδικού ψηφίου. Μόλις επιτευχθεί η κατάλληλη θερμοκρασία (170°C), οι πατάτες τοποθετούνται στο ειδικό πλέγμα που βρίσκεται μέσα στον κάδο με το θερμασμένο έλαιο, κλείνεται το καπάκι και τηγανίζονται. Ο χρόνος τηγανίσματος είναι σταθερός, 8 min.

Όταν ολοκληρωθεί το τηγάνισμα, οι πατάτες στραγγίζονται και τοποθετούνται στο προζυγισμένο φέρον μέσο μέχρι να κρυώσουν. Στη συνέχεια, ζυγίζονται μαζί με το φέρον μέσο. Το έλαιο τηγανίσματος αφήνεται να κρυώσει. Παραλαμβάνονται από αυτό ~10 mL, τα οποία τοποθετούνται σε προζυγισμένο δοκιμαστικό σωλήνα και ζυγίζονται με ακρίβεια ενός δεκαδικού. Το εναπομένον έλαιο ζυγίζεται μαζί με τον κάδο της φριτέζας και χρησιμοποιείται για το επόμενο τηγάνισμα χωρίς την προσθήκη φρέσκου ελαίου.

Το έλαιο θερμαίνεται και πάλι στους 170°C και ζυγίζεται νέα ποσότητα προτηγανισμένων πατατών (περίπου 400 g με ακρίβεια 1 δεκαδικού ψηφίου). Ακολουθεί η ίδια διαδικασία τηγανίσματος μέχρι την ολοκλήρωση 8 διαδοχικών τηγανισμάτων στο ίδιο έλαιο. Κάθε φορά που ολοκληρώνεται ένα τηγάνισμα παραλαμβάνονται ~10 mL ως δείγμα ελαίου για το αντίστοιχο τηγάνισμα και ζυγίζεται το εναπομένον έλαιο τηγανίσματος μαζί με τον κάδο της φριτέζας. Επίσης, ζυγίζονται οι πατάτες στο προζυγισμένο φέρον μέσο πριν και μετά από κάθε τηγάνισμα.

3.2.3 Πορεία τηγανίσματος στο τηγάνι (ρηχό τηγάνισμα)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ακριβώς ίδια με τη διαδικασία τηγανίσματος στο τηγάνι, με μόνες διαφορές τις παρακάτω: χρησιμοποιήθηκε τηγάνι οικιακού τύπου, η ποσότητα του ελαίου που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε τηγάνισμα ήταν ~300 mL, η ποσότητα των πατατών ανά τηγάνισμα ήταν ~200 g, και ο έλεγχος της θερμοκρασίας του ελαίου τηγανίσματος έγινε μέσω εμβάπτισης θερμομέτρου υδραργύρου. Η θερμοκρασία και η διάρκεια τηγανίσματος ήταν σταθερές για όλα τα τηγανίσματα (170°C, 8 min).

3.2.4 Φύλαξη και συντήρηση των δειγμάτων

Οι τηγανιτές πατάτες αποθηκεύονται σε βαθιά κατάψυξη (~ -30°C) μέσα σε νάιλον σακουλάκια ειδικά για τρόφιμα, μέχρι να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες που περιέχουν τα δείγματα του ελαίου τηγανίσματος, πωματίζονται, καλύπτονται με parafilm και τοποθετούνται σε βαθιά κατάψυξη.

3.3 Εκχύλιση του ακρυλαμιδίου με νερό

3.3.1 Υλικά και αντιδραστήρια

Μη λυοφιλοποιημένα δείγματα:

Πατάτα ωμή

Πατάτα προτηγανισμένη

Πατάτα τηγανισμένη με Bonfrito, σε φριτέζα (1° ως 8° τηγάνισμα)

Πατάτα τηγανισμένη με Bonfrito, σε τηγανι (1° ως 8° τηγάνισμα)

Πατάτα τηγανισμένη με Ελαιόλαδο, σε φριτέζα (1° ως 8° τηγάνισμα)

Πατάτα τηγανισμένη με Ελαιόλαδο, σε τηγανι (1° ως 8° τηγάνισμα)

Νερό δισαππεσταγμένο (~18μs)

3.3.2 Πειραματική πορεία

Σημείωση: Για την εκχύλιση του ακρυλαμιδίου με νερό έγιναν δύο πειραματικές πορείες:

α) Εκχύλιση του ακρυλαμιδίου από 10 g τηγανιτής πατάτας με 30 mL νερό (ή 5 g τηγανιτής πατάτας με 15 mL νερό)

β) εκχύλιση του ακρυλαμιδίου από 5 g τηγανιτής πατάτας με 30 mL νερό

Τελικά επιλέχθηκε η πειραματική πορεία α) η οποία περιγράφεται παρακάτω, καθώς το εκχύλισμα ήταν πυκνότερο με αποτέλεσμα να είναι πιο εύκολη η ανίχνευση του ακρυλαμιδίου.

Το εκάστοτε δείγμα πατάτας ομογενοποιείται στο Blender. Σε φιάλη φυγοκέντρου των 100 mL ζυγίζονται περίπου 5 g ομογενοποιημένης πατάτας, με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων.

Στη φιάλη φυγοκέντρου μεταφέρονται 15 mL δισαππεσταγμένο νερό και η φιάλη αναδεύεται ισχυρά στο Vortex για 15 min, αφού προηγουμένως το στόμιό της έχει

επικαλυφθεί με parafilm. Στη συνέχεια, η φιάλη τοποθετείται στη φυγόκεντρο, όπου φυγοκεντρείται στις 3500 rpm για 10 min.

Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, η υπερκείμενη στοιβάδα του διαλύτη παραλαμβάνεται με σύριγγα και στο στόμιό της εφαρμόζεται η ειδική υποδοχή του ηθμού μεμβράνης. Το εκχύλισμα διηθείται ώστε να είναι διαυγές. Από το διηθημένο εκχύλισμα μεταφέρεται ποσότητα ίση 0,5 mL σε vial και αποθηκεύεται σε βαθιά κατάψυξη (~ -30°C) μέχρι την ανάλυσή του στο HPLC. Το υπόλοιπο διηθημένο εκχύλισμα μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα, πωματίζεται, καλύπτεται με parafilm και τοποθετείται στην κατάψυξη.

3.4 Μελέτη άλλων μεθόδων παραλαβής του ακρυλαμιδίου από την πατάτα

3.4.1 Εκχύλιση με Μεθανόλη

3.4.1.1 Υλικά και αντιδραστήρια

Λυοφιλοποιημένη πατάτα τηγανισμένη με ελαιόλαδο, σε φριτζά (1^ο τηγάνισμα)
Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (MERCK, pro analysi 99,5%)

3.4.1.2 Πειραματική πορεία

Το λυοφιλοποιημένο δείγμα τηγανιτής πατάτας ομογενοποιείται σε γουδί πορσελάνης. Από αυτό ζυγίζεται σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα ποσότητα, περίπου και ακριβώς, ίση με 1 g. Στον δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρονται 2 mL διαλύτη (μεθανόλη).

Ο δοκιμαστικός σωλήνας πωματίζεται και το περιεχόμενό του αναδεύεται ισχυρά σε Vortex για 2 min. Στη συνέχεια, ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετείται στη φυγόκεντρο και φυγοκεντρείται στις 3000 rpm για 10 min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, η υπερκείμενη στοιβάδα (του διαλύτη) παραλαμβάνεται με πιπέτα Pasteur και μεταφέρεται σε δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες τέσσερις φορές. Με αυτό τον τρόπο το δείγμα εκχυλίζεται 5 φορές με 2 mL μεθανόλης την κάθε φορά (συνολικά 10 mL μεθανόλης). Μετά από κάθε φυγοκέντρωση η μεθανολική στοιβάδα μεταφέρεται στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα. Στο τέλος, ο δοκιμαστικός σωλήνας που περιέχει το εκχύλισμα πωματίζεται, καλύπτεται με parafilm και τοποθετείται σε βαθιά κατάψυξη (~ -30°C).

Το εκχύλισμα, πριν χρησιμοποιηθεί για ανάλυση στο HPLC, εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό την επίδραση ρεύματος αερίου αζώτου και επαναδιαλύεται σε μεθανόλη ώστε να πυκνότερο.

3.4.2 Εκχύλιση του ακρυλαμιδίου με Αιθανόλη

3.4.2.1 Υλικά και αντιδραστήρια

Λυοφιλοποιημένη πατάτα τηγανισμένη με ελαιόλαδο, σε φριτέζα (1^ο τηγάνισμα)
Αιθανόλη (MERCK, pro analysi 99,5%)

3.4.2.2 Πειραματική πορεία

Βλ. § 4.1.2 με μόνη διαφορά ότι ο διαλύτης εκχύλισης είναι η αιθανόλη.

3.4.3 Εκχύλιση του ακρυλαμιδίου με 1-προπανόλη και ακετονιτρίλιο

3.4.3.1 Υλικά και αντιδραστήρια

Λυοφιλοποιημένη πατάτα τηγανισμένη με βαμβακέλαιο, σε φριτέζα (3^ο τηγάνισμα)
Απιονισμένο νερό
1-προπανόλη αναλυτικής καθαρότητας (MERCK, minimum 99,5%)
Ηλιέλαιο (MINEPBA)
Ακετονιτρίλιο αναλυτικής καθαρότητας (SDS-Frame, pro analysi, 99,8%)
Εξάνιο αναλυτικής καθαρότητας

3.4.3.2 Πειραματική πορεία

Οι τηγανιτές πατάτες τεμαχίζονται σε μικρά κομμάτια. Σε κωνική φιάλη των 250 mL ζυγίζεται ποσότητα τηγανιτής πατάτας, περίπου 25 g με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων. Στην κωνική φιάλη προστίθενται 75 mL απιονισμένο νερό. Το περιεχόμενό της ομογενοποιείται με την βοήθεια μηχανικού αναδευτήρα και στη συνέχεια αναδεύεται χειροκίνητα για 15 min. Η κωνική φιάλη πωματίζεται με αλουμινόχαρτο και τοποθετείται σε υδρόλουτρο, στους 70°C για 30 min.

Αφού η κωνική φιάλη απομακρυνθεί από το υδρόλουτρο, λαμβάνονται δύο φιάλες φυγοκέντρου των 100 mL και σε κάθε μία προστίθεται ποσότητα από το ομογενοποιημένο μίγμα, περίπου 5 g με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων καθώς και 20 mL 1-προπανόλη. Οι φιάλες τοποθετούνται στη φυγόκεντρο και φυγοκεντρούνται στις 3000

rpm για 10 min. Αφού ολοκληρωθεί η φυγοκέντριση, η υπερκείμενη στοιβάδα και από τις δύο φιάλες παραλαμβάνεται, μετράται ο όγκος της (~ 45 mL συνολικά) και μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 250 mL. Σε αυτή προστίθενται 25 σταγόνες ηλιέλαιο.

Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα και το περιεχόμενό της εξατμίζεται μέχρι ξηρού. Μετά το πέρας της εξάτμισης, προστίθενται μέσα στη σφαιρική φιάλη 5×2 mL ακετονιτρίλιο και το περιεχόμενό της αναδεύεται ελαφρώς, χειροκίνητα. Στη συνέχεια, προστίθενται στη σφαιρική φιάλη ~10 mL εξάνιο και το περιεχόμενό της μεταφέρεται σε φιάλη φυγοκέντρου (των 100 mL). Το περιεχόμενο της φιάλης ανακινείται στο Vortex για μερικά δευτερόλεπτα. Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 3000 rpm για 5 min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης, η υπερκείμενη στοιβάδα του εξανίου παραλαμβάνεται με πιπέτα Pasteur και απορρίπτεται.

Στη συνέχεια, στο περιεχόμενο της φιάλης προστίθενται ~10 mL εξανίου και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία (ανακίνηση, φυγοκέντριση, απόρριψη της υπερκείμενης στοιβάδας εξανίου). Τέλος, παραλαμβάνεται η κάτω στοιβάδα του ακετονιτρίλιου και μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα.

Συμπύκνωση του εκχυλίσματος: Από το παραπάνω εκχύλισμα μεταφέρεται ποσότητα ίση με 1 mL σε vial και εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό την επίδραση ρεύματος αερίου αζώτου. Η διαδικασία της εξάτμισης επαναλαμβάνεται άλλες 4 φορές στο ίδιο vial (δηλαδή εξατμίζονται συνολικά 5 mL εκχυλίσματος). Το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύεται με 0,5 mL ακετονιτρίλιου ώστε να αναλυθεί στο HPLC. Μέχρι την ανάλυσή του αποθηκεύεται σε βαθιά κατάψυξη (~ -30°C).

3.5 Δοκιμές αντίδρασης του ακρυλαμιδίου

3.5.1 Υλικά

Υδροξειδίου του καλίου (MERCK, pellets, pro analysi 85,0%)

Μεθανόλη (MERCK, pro analysi 99,5%)

Χλωροφόρμιο (MERCK, pro analysi 99,5%)

Αιθανόλη (MERCK, pro analysi 99,5%)

Υδροχλωρικό οξύ

α-ναφθόλη

3,4-δι-υδροξυφαινυλο-1-προπανόλη

Υδροξειδίου του νατρίου

Φαινυλαλανίνη

Νινυδρίνη

3.5.2 Αντίδραση του ακρυλαμιδίου με α-ναφθόλη

Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται 1 mL διαλύματος υδροξειδίου του καλίου σε μεθανόλη (KOH/MeOH) 0,2 N. Στο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 15 mg (0,1 mmol) α-ναφθόλης και 7 mg (0,1 mmol) ακρυλαμιδίου, προς παρασκευή διαλύματος με τελική συγκέντρωση 0,1 M ως προς το ακρυλαμίδιο. Το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 3,5 ώρες. Ακολουθεί εξουδετέρωση με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl) 0,1 N με pH=4. Στη συνέχεια γίνεται συμπύκνωση της μεθανόλης και παραλαβή του προϊόντος με 3×3 mL χλωροφόρμιο (CHCl₃). Ακολουθεί ανάλυση στο HPLC.

3.5.3 Αντίδραση του ακρυλαμιδίου με 3,4-δι-υδροξυφαινυλο-1-προπανόλη

Ακολουθείται η διαδικασία 4.1 με μόνη διαφορά ότι αντί για 15 mg α-ναφθόλης προστίθενται 16 mg (0,1 mmol) 3,4-δι-υδροξυφαινυλο-1-προπανόλη.

3.5.4 Αντίδραση του ακρυλαμιδίου με φαινυλαλανίνη

Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται 1 mL υδατικού διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) 0,1 M με pH=8. Στο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 25 mg (0,15 mmol) φαινυλαλανίνης και 7 mg (0,1 mmol) ακρυλαμιδίου. Το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα παραμένει υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 3,5 ώρες. Ακολουθεί ανάλυση του διαλύματος στο HPLC.

3.5.5 Αντίδραση του ακρυλαμιδίου με νινυδρίνη

Παρασκευάζεται διάλυμα νινυδρίνης σε αιθανόλη 0,1 M (σε 2 mL αιθανόλης προστίθενται 38,7 mg νινυδρίνης) και διάλυμα ακρυλαμιδίου 0,1 M (σε 2 mL νερού προστίθενται 14,2 mg ακρυλαμιδίου). Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 0,75 mL από το παρασκευασθέν διάλυμα νινυδρίνης και 0,5 mL από το παρασκευασθέν διάλυμα ακρυλαμιδίου. Το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα παραμένει υπό ανάδευση στους 90°C για 3 ώρες. Ακολουθεί εξάτμιση της αιθανόλης και ανάλυση του προϊόντος στο HPLC.

3.6 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων ακρυλαμιδίου

3.6.1 Υλικά και αντιδραστήρια

Πρότυπο ακρυλαμιδίου (Aldrich, Acrylamide 99+%, electrophoresis grade, $\text{H}_2\text{C}=\text{CHCONH}_2$)

Νερό δισαππεσταγμένο (~18 μs)

3.6.2 Πειραματική πορεία

Παρασκευάζεται μητρικό (stock) διάλυμα ακρυλαμιδίου 1,06 mg/ mL: σε δοκιμαστικό σωλήνα ζυγίζονται ακριβώς 0,0053 g σκόνης προτύπου ακρυλαμιδίου και προστίθενται 5 mL δισαππεσταγμένο νερό. Ακολουθεί αραιώση του μητρικού διαλύματος 1:100 προς παρασκευή διαλύματος με συγκέντρωση 0,0106 mg/ mL. Από αυτό το διάλυμα και με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα ακρυλαμιδίου με τις παρακάτω συγκεντρώσεις: 0,106 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,0106 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,053 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και 0,0053 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Κάθε διάλυμα που παρασκευάζεται ανακινείται στο Vortex για μερικά δευτερόλεπτα. Οι διαδοχικές αραιώσεις που έγιναν φαίνονται παρακάτω:

Μητρικό διάλυμα ακρυλαμιδίου 1 mg/ mL (Α)

10 μL από το (Α) + 990 μL δισαππεσταγμένο νερό $\rightarrow$ 0,0106 mg/ mL (Β)

10 μL από το (Β) + 990 μL δισαππεσταγμένο νερό $\rightarrow$ 0,106 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Γ)

100 μL από το (Γ) + 900 μL δισαππεσταγμένο νερό $\rightarrow$ 0,0106 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Δ)

500 μL από το (Γ) + 500 μL δισαππεσταγμένο νερό $\rightarrow$ 0,053 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ε)

500 μL από το (Δ) + 500 μL δισαππεσταγμένο νερό $\rightarrow$ 0,0053 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ΣΤ)

Μετά την παρασκευή τους τα πρότυπα διαλύματα μεταφέρονται σε vials και αναλύονται στο HPLC για τον προσδιορισμό του χρόνου κατακράτησης του ακρυλαμιδίου και για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

3.7 Μέθοδος ανάλυσης HPLC

3.7.1 Υλικά και αντιδραστήρια

Νερό δισαππεσταγμένο (~18 μs)

Μεθανόλη χρωματογραφικής καθαρότητας (HPLC grade) (MERCK, 99,8%)

Ισοπροπανόλη (HPLC grade) (MERCK, 99,9%)

Ακετονιτρίλιο (HPLC grade) (SDS, >99,9%)

Υδατικό διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος με pH=3

Διάλυμα οξικού αμμωνίου (HPLC grade)

3.7.2 Όργανα

Υγρός χρωματογράφος Agilent (HPLC-1050) συνδεδεμένος με αυτόματο δειγματολήπτη και ανιχνευτή σειράς φωτοδιοδίων (DAD- 1050)

Υγρός χρωματογράφος (HPLC) συνδεδεμένος με ανιχνευτή φασμάτων μαζών (MSD)

Α΄ Μέθοδος

HPLC αναστροφής φάσεως με βαθμιδωτή έκλυση (gradient)

Στήλη: C18 Nucleosil 100 (4,6 × 125mm, 5 μm)

Ανιχνευτής: UV-Vis σειράς φωτοδιοδίων (DAD 200, 214, 280, 254 nm)

Πρόγραμμα Βαθμιδωτής Έκλυσης (txacrddeg) (Τροποποιημένο από N.K. Andrikopoulos *et al*, 1991):

Χρόνος (min)	%A	%B	%C	%D	Ροή (mL/min)
0	100,0	0	0	0	0,5
10	99,0	0	1	0	0,5
12	99,0	0	1	0	1
16	70,0	17,5	12,5	0	1
22	0	58,3	41,7	0	1
27	0	58,3	41,7	0	1
31	0	23,4	16,6	60,0	1
40	0	23,4	16,6	60,0	1
43	0	58,3	41,7	0	1
45	0	58,3	41,7	0	1
50	100,0	0	0	0	0,5

A = υδατικό διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος με pH=3,

B = CH₃CN,

C = CH₃OH,

D = CH₃CH(OH)CH₃

Όγκος δείγματος έγχυσης: 50 μL.

Β' Μέθοδος

HPLC αναστρόφου φάσεως με ισοκρατική έκλυση

Στήλη: Agilent, Zorbax Edipse, XDB-C8 (4,6 × 150 mm, 5 μm)

Ανιχνευτής: UV-Vis, σειράς φωτοδιοδίων (DAD 200, 214, 280, 254 nm)

Διαλύτης Έκλυσης: υδατικό διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος με pH=3

Ροή Διαλυτών: 0,5 mL/min

Όγκος δείγματος έγχυσης: 50 μL.

Γ' Μέθοδος

HPLC αναστρόφου φάσεως με βαθμιδωτή έκλυση (gradient)

Στήλη: C18 Nucleosil 100 (4,6 × 250mm, 5 μm)

Ανιχνευτής: UV-Vis σειράς φωτοδιοδίων (DAD 200, 214, 280, 254 nm)

Πρόγραμμα Βαθμιδωτής Έκλυσης:

Χρόνος (min)	%A	%B	%C	%D	Ροή (mL/min)
0	100,0	0	0	0	0,5
10	100,0	0	0	0	0,5
20	99,0	0	1	0	1
60	0	58,3	41,7	0	1
70	0	58,3	41,7	0	1
76	0	23,4	16,6	60,0	1
80	0	23,4	16,6	60,0	1
85	100,0	0	0	0	1
90	100,0	0	0	0	0,5

A = υδατικό διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος με pH=3,

B = CH₃CN,

C = CH₃OH,

D = CH₃CH(OH)CH₃

Όγκος δείγματος έγχυσης: 50 μL.

Δ' Μέθοδος (LC-MS)

HPLC αναστρόφου φάσεως με ισοκρατική έκλυση

Στήλη: Discovey HS F5 SUPELCO (150mm x 2,1mm x 3μm) (στήλη με συμπεριφορά ανάλογη της C18)

Ανιχνευτής: MSD Waters Micromass ZQ, ES⁺ chemical ionisation

Διαλύτης Έκλουσης: υδατικό διάλυμα CH₃COONH₄ 0,01M / Διάλυμα CH₃COONH₄ 0,01M σε ακετονιτρίλιο, σε αναλογία 9:1.

Ροή Διαλυτών: 0,3 mL/ min

Όγκος δείγματος έγχυσης: 10 µL.

3.8 Ανάλυση Δειγμάτων

A) Συλλογή και απομόνωση των κλασμάτων του ακρυλαμιδίου

Δείγματα που αναλύθηκαν

Εκχύλισμα:

προτηγανισμένης πατάτας

ωμής πατάτας

πατάτας τηγανισμένη με Bonfrito, σε φριτέζα (1°, 3°, 4°, 8° τηγάνισμα)

πατάτας τηγανισμένη με Bonfrito, σε τηγάνι (1°, 4°, 8° τηγάνισμα)

πατάτας τηγανισμένη με Ελαιόλαδο, σε φριτέζα (1°, 4°, 8° τηγάνισμα)

πατάτας τηγανισμένη με Ελαιόλαδο, σε τηγάνι (1°, 4°, 8° τηγάνισμα)

Πειραματική Πορεία

Μέσω της **A' Μεθόδου** πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός και απομόνωση των κλασμάτων του ακρυλαμιδίου με χρόνο κατακράτησης **RT=5,8-6 min** και με βάση την απορρόφηση στα 200 nm. Ο όγκος της ένεσης που πραγματοποιήθηκε από τον αυτόματο δειγματολήπτη του υγρού χρωματογράφου ήταν 50 µL. Για το δείγμα τηγανισμένης πατάτας με Bonfrito (4° τηγάνισμα, τηγάνι) και για το δείγμα τηγανισμένης πατάτας με ελαιόλαδο (1° τηγάνισμα, τηγάνι) έγινε συλλογή κλασμάτων από δύο ενέσεις, ενώ για όλα τα υπόλοιπα δείγματα συλλέχθηκε κλάσμα από μία μόνο ένωση. Τα κλάσματα του ακρυλαμιδίου από κάθε δείγμα συλλέχθηκαν σε ξεχωριστό vial.

Συμπύκνωση των κλασμάτων: Μετά τη συλλογή τους, τα κλάσματα εξατμίστηκαν υπό ρεύμα αερίου αζώτου μέχρι τελικού όγκου ~100 µL. Ακολούθησε επαναδιάλυση του κάθε κλάσματος σε δυσασπασταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου ακριβώς 150 µL. Τα συμπυκνωμένα κλάσματα φυλάχθηκαν μέσα σε vials σε βαθιά κατάψυξη (~ -30°C) έως την ανάλυσή τους στο HPLC με τη B' Μέθοδο.

B) Ποσοτικοποίηση του ακρυλαμιδίου

Δείγματα που αναλύθηκαν

Συμπυκνωμένα κλάσματα με RT=5,8-6 από το HPLC με την Α΄ Μέθοδο:

πατάτα τηγανισμένη με Bonfrito, σε φριτέζα (1°, 3°, 4°, 8° τηγάνισμα)

πατάτα τηγανισμένη με Bonfrito, σε τηγάνι (1°, 4°, 8° τηγάνισμα)

πατάτα τηγανισμένη με Ελαιόλαδο, σε φριτέζα (1°, 4°, 8° τηγάνισμα)

πατάτα τηγανισμένη με Ελαιόλαδο, σε τηγάνι (1°, 4°, 8° τηγάνισμα)

Πειραματική πορεία

Τα παραπάνω συμπυκνωμένα κλάσματα του ακρυλαμιδίου αναλύθηκαν στο HPLC με τη **Β΄ Μέθοδο**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1 Παραλαβή του ακρυλαμιδίου από τις τηγανιτές πατάτες

Ως μέθοδος παραλαβής του ακρυλαμιδίου από τις τηγανιτές πατάτες επιλέχθηκε η εκχύλιση με νερό καθώς το ακρυλαμίδιο εμφανίζει πολύ καλή διαλυτότητα σε αυτό. Οι υπόλοιπες μέθοδοι παραλαβής του ακρυλαμιδίου από τις πατάτες που μελετήθηκαν (εκχύλιση με: α. μεθανόλη, β. αιθανόλη, και γ. 1-προπανόλη και ακετονιτρίλιο) δεν κρίθηκαν κατάλληλες για την παραλαβή του ακρυλαμιδίου από τις πατάτες, όπως αυτό διαπιστώθηκε από τη χρωματογραφική ανάλυση των εν λόγω εκχυλισμάτων. Η μέθοδος εκχύλισης που επιλέχθηκε ακολουθείται από τη βιβλιογραφία (Tareke *et al.*, 2002, Leung, 2003, Pedreschi, 2004).

4.2 Επιλογή μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού ακρυλαμιδίου

Στη βιβλιογραφία, για τον προσδιορισμό του ακρυλαμιδίου έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο υγρή όσο και αέρια χρωματογραφία (Wenzl *et al.*, 2003).

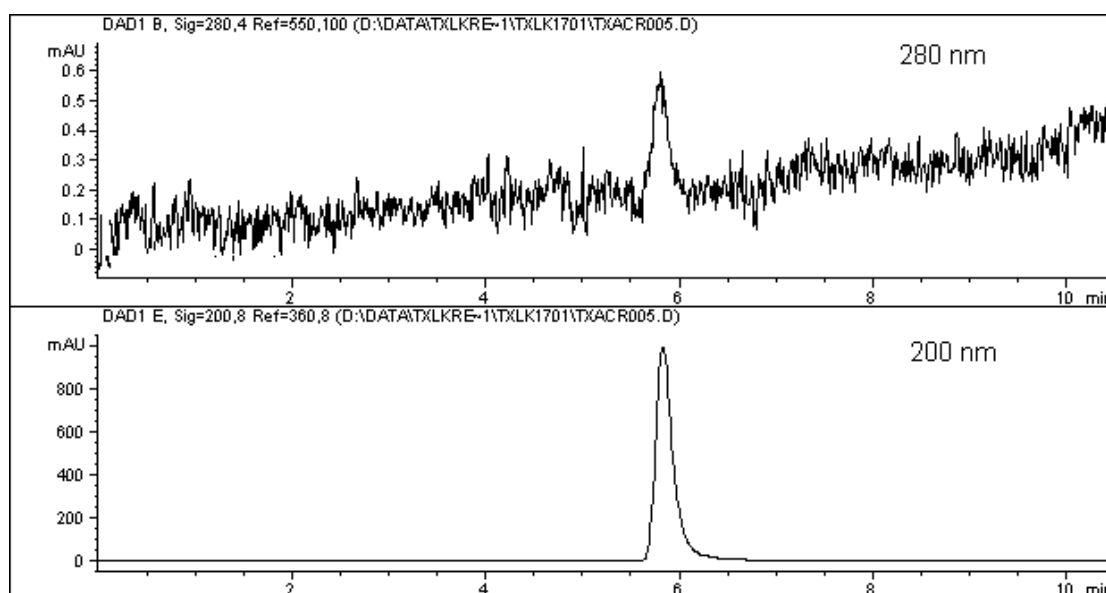
Η ανάλυση του ακρυλαμιδίου με αέρια χρωματογραφία δεν επιλέχθηκε για τους παρακάτω λόγους:

1. Δεν υπήρχε διαθέσιμος on-column εισαγωγέας, ώστε τα δείγματα να εισαχθούν στον χρωματογράφο με απευθείας εισαγωγή εν ψυχρώ επί της στήλης.
2. Δεν κατέστη δυνατή η εισαγωγή του δείγματος με εισαγωγή split splitless (δηλαδή χωρίς σχάση του δείγματος).
3. Επιπλέον, η ανάλυση του ακρυλαμιδίου με GC-MS απαιτεί την παρασκευή διβρωμο-παραγώγου του. Η διαδικασία αυτή ήδη χρησιμοποιείται και αξιολογείται από άλλα εργαστήρια, και κρίθηκε επίπονη και επικίνδυνη με την υπάρχουσα εργαστηριακή υποδομή.

Συνεπώς επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί ανάλυση του ακρυλαμιδίου με υγρή χρωματογραφία (HPLC). Το ακρυλαμίδιο παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 200 nm, περιοχή όπου απορροφούν όλες οι οργανικές ενώσεις. Για τον προσδιορισμό του ακρυλαμιδίου με HPLC επιχειρήθηκε σε πρώτη φάση η παρασκευή παραγώγων τέτοιων ώστε η ανίχνευση να γίνει εκλεκτικά είτε με ανίχνευση φθορισμού είτε με ανίχνευση υπεριώδους-ορατού σε μεγαλύτερα μήκη κύματος.

Έγινε σειρά δοκιμών παρασκευής παραγώγων με α- ναφθόλη, 3,4-δι-υδροξυφαινυλο-1-προπανόλη, φαινυλαλανίνη, νινυδρίνη χρησιμοποιώντας πρότυπο ακρυλαμίδιο. Οι αντιδράσεις αυτές δεν έλαβαν χώρα υπό τις επιλεχθείσες πειραματικές διαδικασίες. Η αντίδραση του ακρυλαμιδίου με αυτές τις ενώσεις παρακολουθήθηκε με χρωματογραφία HPLC. Τα χρωματογραφήματα του μίγματος αντίδρασης μετά από κατάλληλη επεξεργασία, παρουσίασαν δύο χρωματογραφικές κορυφές, από τις οποίες η μία αντιστοιχούσε στο ακρυλαμίδιο και η άλλη στο αντιδραστήριο. Έτσι αποφασίστηκε ο απευθείας προσδιορισμός του ακρυλαμιδίου, χωρίς παραγωγοποίηση.

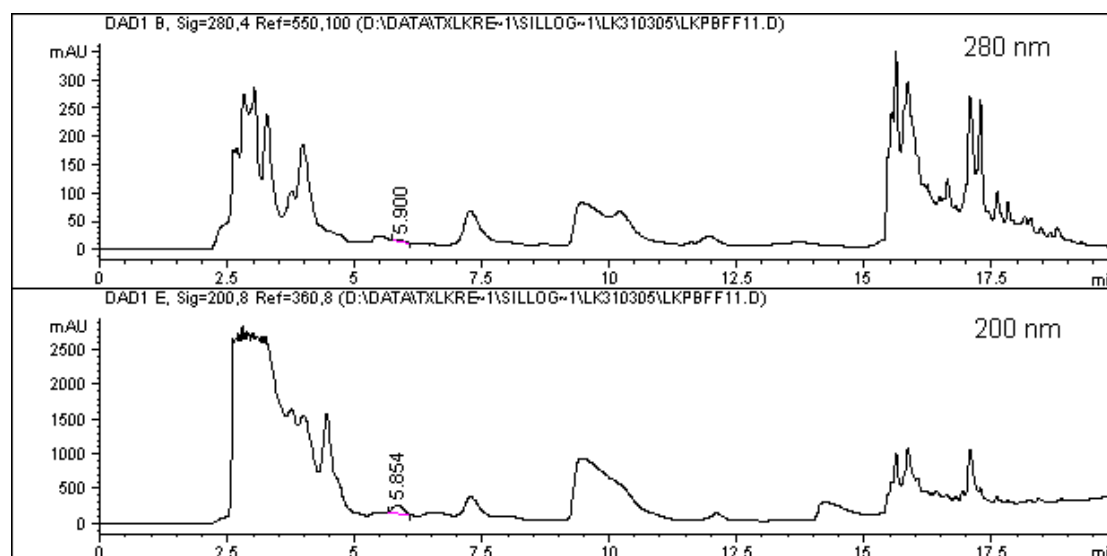
Ως μέθοδος ανάλυσης επιλέχθηκε η Μέθοδος Α' της § 3.7 της πειραματικής διαδικασίας, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως στήλη η C18 Nucleosil 100 (4,6 × 125mm, 5 μm). Στο σχήμα 4.2.1 φαίνεται το χρωματογράφημα που ελήφθη από την ανάλυση του προτύπου του ακρυλαμιδίου με αυτή την μέθοδο. Η αναλογία των εμβαδών των κορυφών στα 280 και 200 nm ήταν $\frac{200nm}{280nm} = \frac{2100}{1}$.



Σχήμα 4.2.1 Χρωματογραφήματα προτύπου ακρυλαμιδίου [στήλη: C18 Nucleosil 100 (4,6 × 125mm, 5 μm)].

Η ανίχνευση του ακρυλαμιδίου έγινε με μήκος κύματος 200 nm καθώς, όπως ήδη αναφέρθηκε, σε αυτό εμφανίζει το μέγιστο της απορρόφησής του.

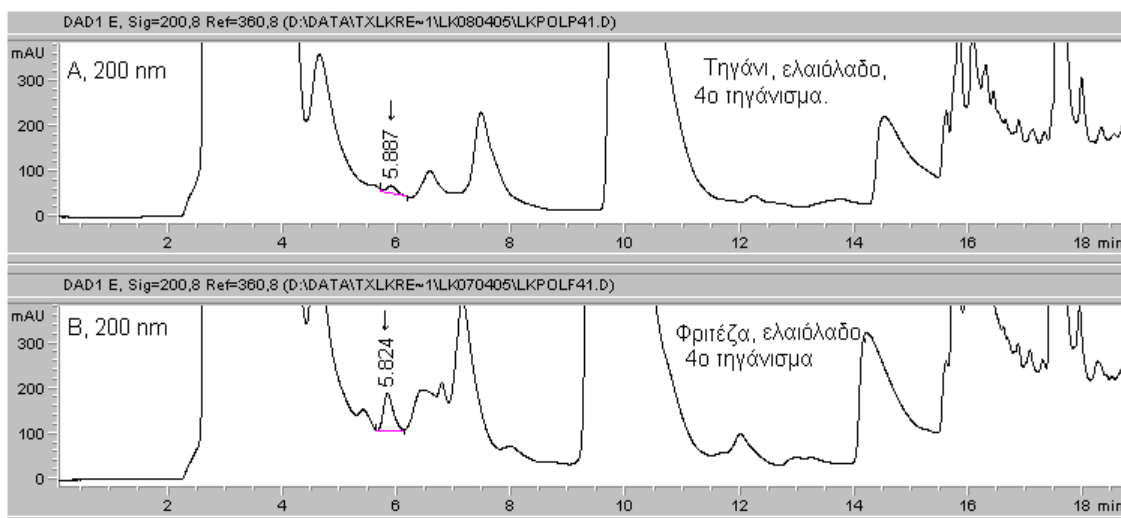
Στο σχήμα 4.2.2 φαίνεται ενδεικτικά το χρωματογράφημα που ελήφθη από εκχύλισμα τηγανισμένης πατάτας σε φριτέζα χρησιμοποιώντας ως έλαιο τηγανίσματος το Bonfrito (1^ο τηγάνισμα). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής UV-Vis σειράς φωτοδιοδίων και στο σχήμα παρουσιάζονται οι απορροφήσεις που καταγράφηκαν σε μήκος κύματος 200 nm και 280 nm. Όπως φαίνεται από το χρωματογράφημα υπάρχει κορυφή με χρόνο κατακράτησης 5,8 min, δηλαδή με χρόνο κατακράτησης αυτόν του ακρυλαμιδίου. Εντούτοις, η αναλογία των εμβαδών των κορυφών στα 200 nm και στα 280 nm ήταν $\frac{1800}{40} = \frac{45}{1}$, πολύ μικρότερη από αυτήν του προτύπου ακρυλαμιδίου ($\frac{2100}{1}$). Αυτό υποδεικνύει την πιθανή ύπαρξη προσμίξεων στο δείγμα, αφού κανονικά όπως αναφέρθηκε το ακρυλαμίδιο παρουσιάζει ελάχιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.



Σχήμα 4.2.2. Χρωματογράφηματα από υδατικό εκχύλισμα τηγανισμένης πατάτας σε φριτέζα με Bonfrito (1^ο τηγάνισμα) [στήλη: C18 Nucleosil 100 (4,6 × 125mm, 5 μm)].

Στο σχήμα 4.2.3 παρουσιάζονται και συγκρίνονται τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από εκχυλίσματα τηγανισμένης πατάτας σε φριτέζα και σε τηγάνι χρησιμοποιώντας ως έλαιο τηγανίσματος το ελαιόλαδο (4^ο τηγάνισμα). Η ύπαρξη του ακρυλαμιδίου φαίνεται και στα δύο δείγματα καθώς οι χρωματογραφικές κορυφές έχουν RT αυτόν του προτύπου. Παράλληλα, είναι εμφανής η διαφορά της έντασης των

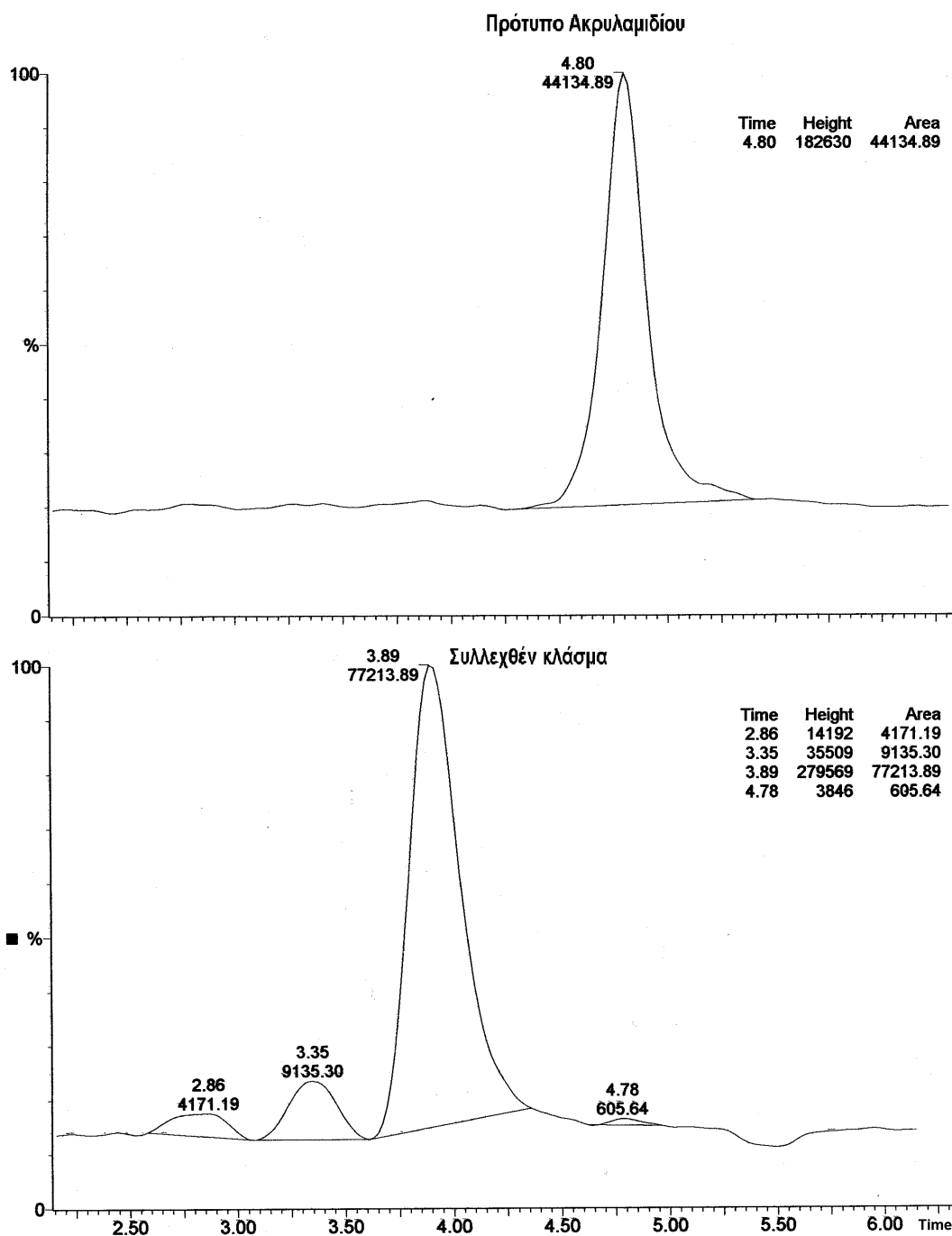
σημάτων μεταξύ των δύο διαφορετικών τρόπων τηγανίσματος. Η ένταση του σήματος για το δείγμα τηγανισμένης πατάτας σε φριτέζα είναι μεγαλύτερη από την ένταση του σήματος για το δείγμα τηγανισμένης πατάτας σε τηγάνι.



Σχήμα 4.2.3. Σύγκριση χρωματογραφήματων από εκχυλίσματα τηγανισμένης πατάτας (Α) σε τηγάνι και (Β) σε φριτέζα χρησιμοποιώντας ως έλαιο τηγανίσματος το ελαιόλαδο (4^ο τηγάνισμα) [στήλη: C18 Nucleosil 100 (4,6×125mm, 5 μm)].

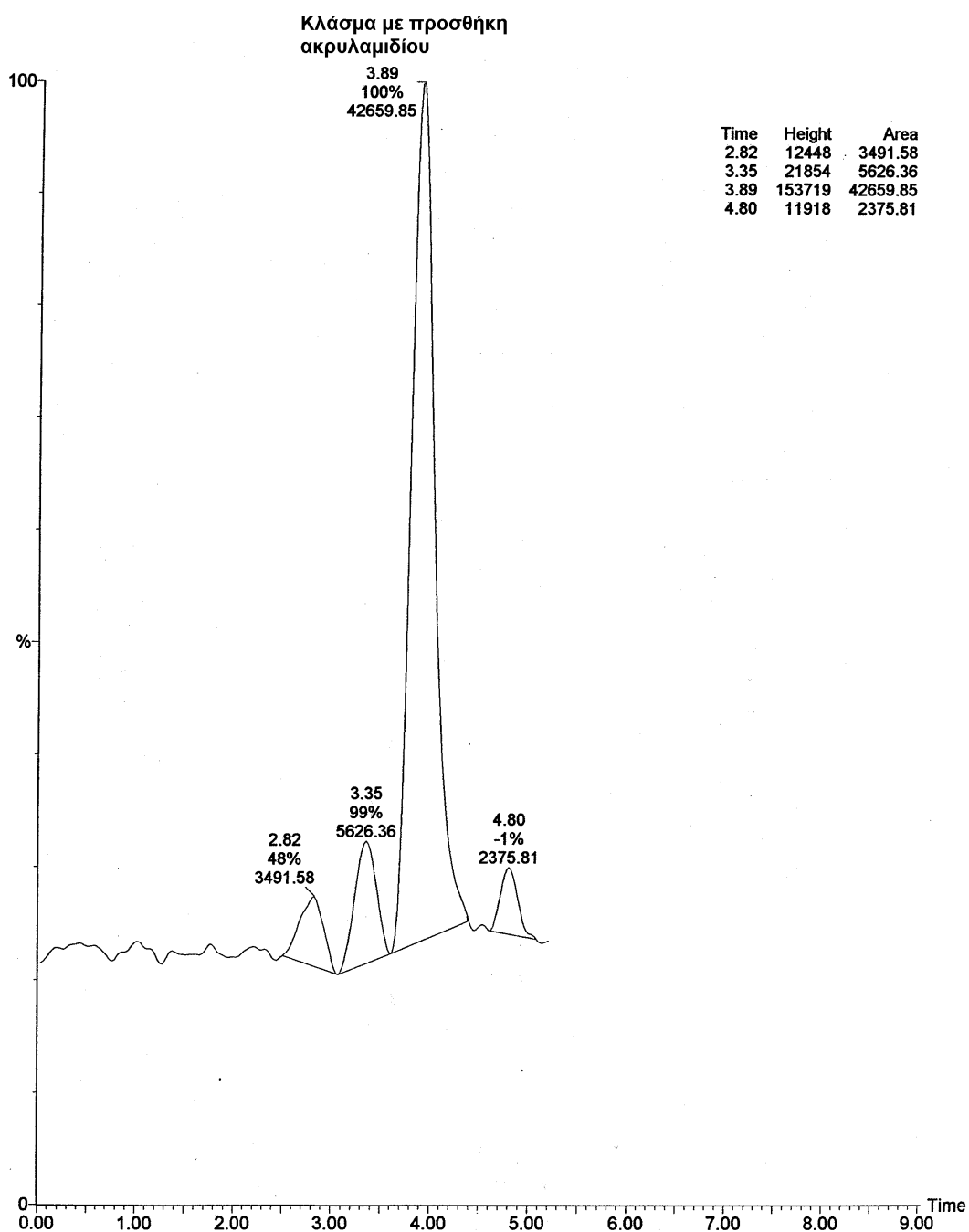
Για την επιβεβαίωση της παρουσίας του ακρυλαμιδίου στο δείγμα τηγανισμένης πατάτας έγινε ανάλυση με LC-MS (Μέθοδος Δ', § 3.7 της πειραματικής διαδικασίας). Αρχικά συλλέχθηκε, με τη Μέθοδο Α' της § 3.7 της πειραματικής διαδικασίας, η χρωματογραφική κορυφή (κλάσμα) του εκχυλίσματος τηγανισμένης πατάτας με χρόνο κατακράτησης αυτόν του προτύπου του ακρυλαμιδίου. Έγινε συλλογή τριών ενέσεων δείγματος και ακολούθησε μερική συμπύκνωση του δείγματος. Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε γι' αυτόν το σκοπό ήταν το εκχύλισμα τηγανισμένης πατάτας σε φριτέζα χρησιμοποιώντας ως έλαιο τηγανίσματος Bonfrito (4^ο τηγάνισμα).

Στο σχήμα 4.2.4 φαίνεται το χρωματογράφημα του προτύπου του ακρυλαμιδίου που ελήφθη από την ανάλυση με LC-MS καθώς και το χρωματογράφημα του παραπάνω κλάσματος που συλλέχθηκε. Με τη μέθοδο ανάλυσης που επιλέχθηκε ο χρόνος κατακράτησης του προτύπου ακρυλαμιδίου είναι RT=4,80 min. Η χρωματογραφική ανάλυση του συλλεγμένου κλάσματος από το εκχύλισμα πατάτας έδειξε την παρουσία τεσσάρων κορυφών εκ των οποίων η μία είχε χρόνο κατακράτησης αυτόν του προτύπου ακρυλαμιδίου.



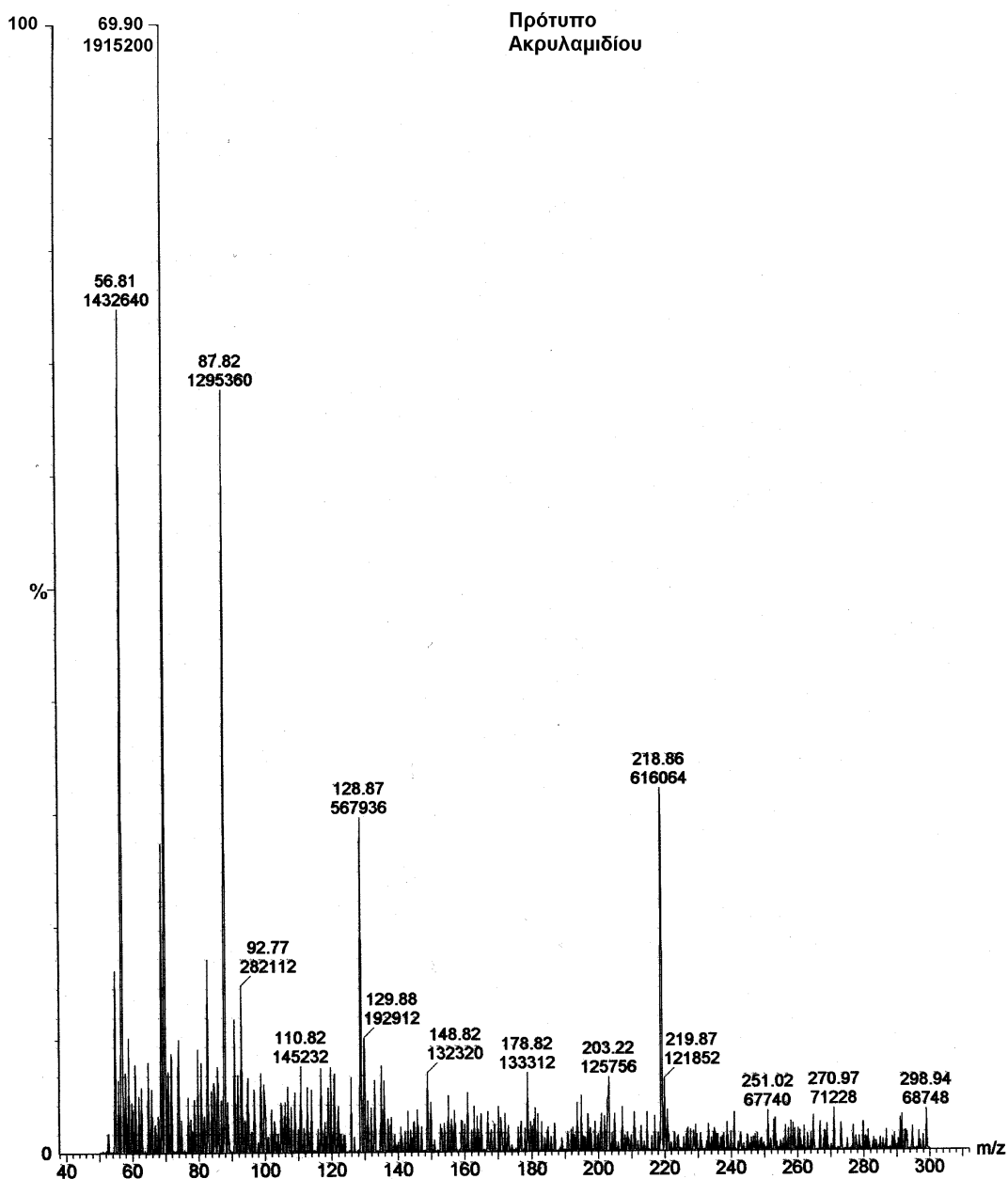
Σχήμα 4.2.4 Χρωματογράφημα (πάνω) προτύπου ακρυλαμιδίου και (κάτω) συλλεχθέντος κλάσματος (LC-MS).

Στο σχήμα 4.2.5 φαίνεται το χρωματογράφημα που προκύπτει μετά την προσθήκη προτύπου διαλύματος ακρυλαμιδίου στο κλάσμα του εκχυλίσματος (spike), όπου παρατηρείται αύξηση της έντασης του σήματος της κορυφής με RT=4,80 min.



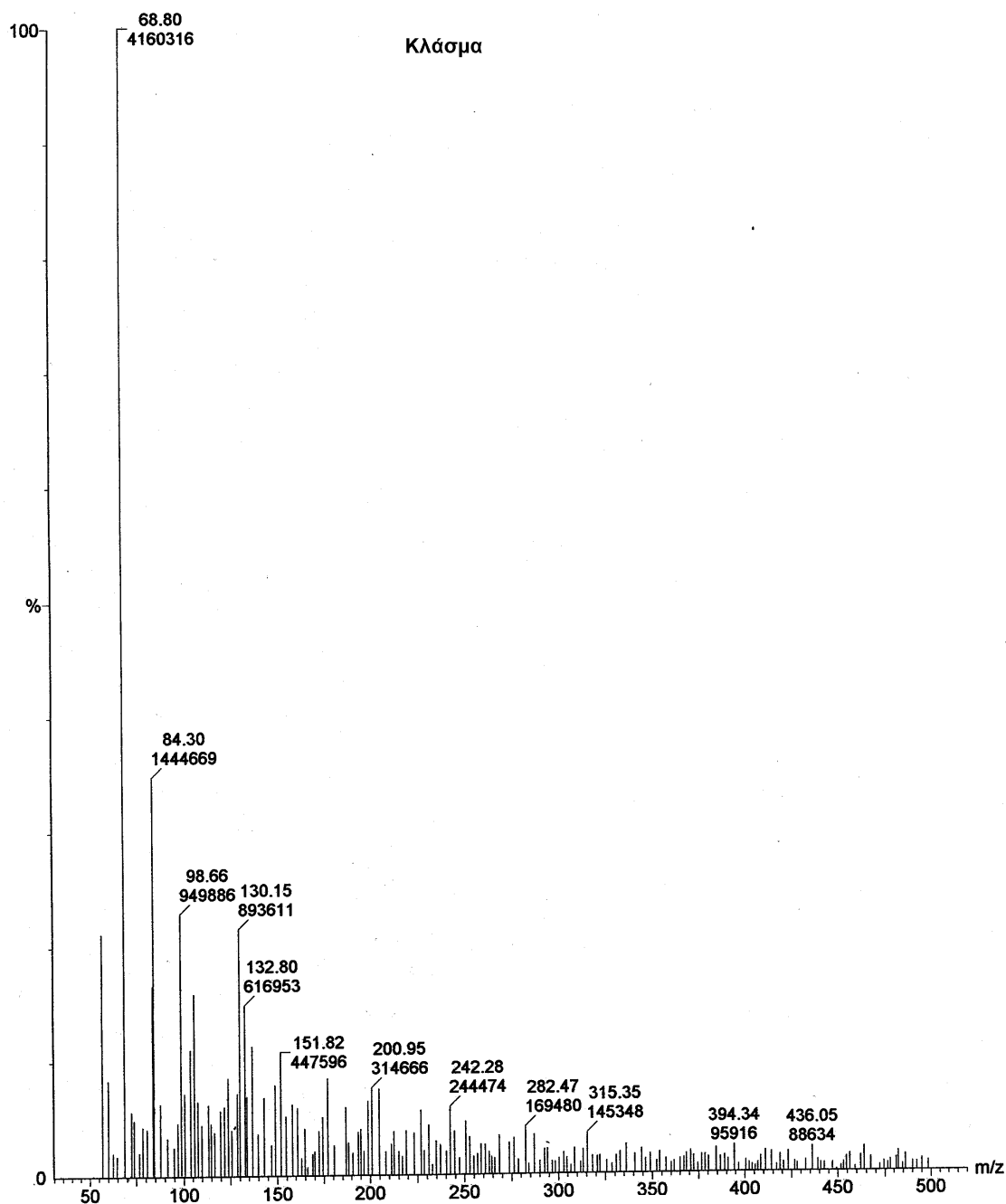
Σχήμα 4.2.5 Χρωματογράφημα συλλεχθέντος κλάσματος με προσθήκη προτύπου ακρυλαμιδίου (LC-MS).

Στο σχήμα 4.2.6 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας προτύπου ακρυλαμιδίου. Το φάσμα μάζας του ακρυλαμιδίου εμφανίζει κύρια θραύσματα τα m/z 69,90 και m/z 56,81.



Σχήμα 4.2.6 Φάσμα μάζας προτύπου ακρυλαμιδίου.

Στο σχήμα 4.2.7 φαίνεται το φάσμα μάζας της κορυφής με $RT=4,78$ min, του σχήματος 4.2.4. Παρατηρούμε ότι το φάσμα μάζας που προκύπτει εμφανίζει κύριο θραύσμα το m/z 68,80. Το γεγονός αυτό αποτελεί ισχυρή επιβεβαίωση της ύπαρξης του ακρυλαμιδίου σε αυτή τη χρωματογραφική κορυφή και συνεπώς και στο κλάσμα που συλλέχθηκε.



Σχήμα 4.2.7 Φάσμα μάζας κορυφής με RT=4,80 του σχήματος 4.2.5.

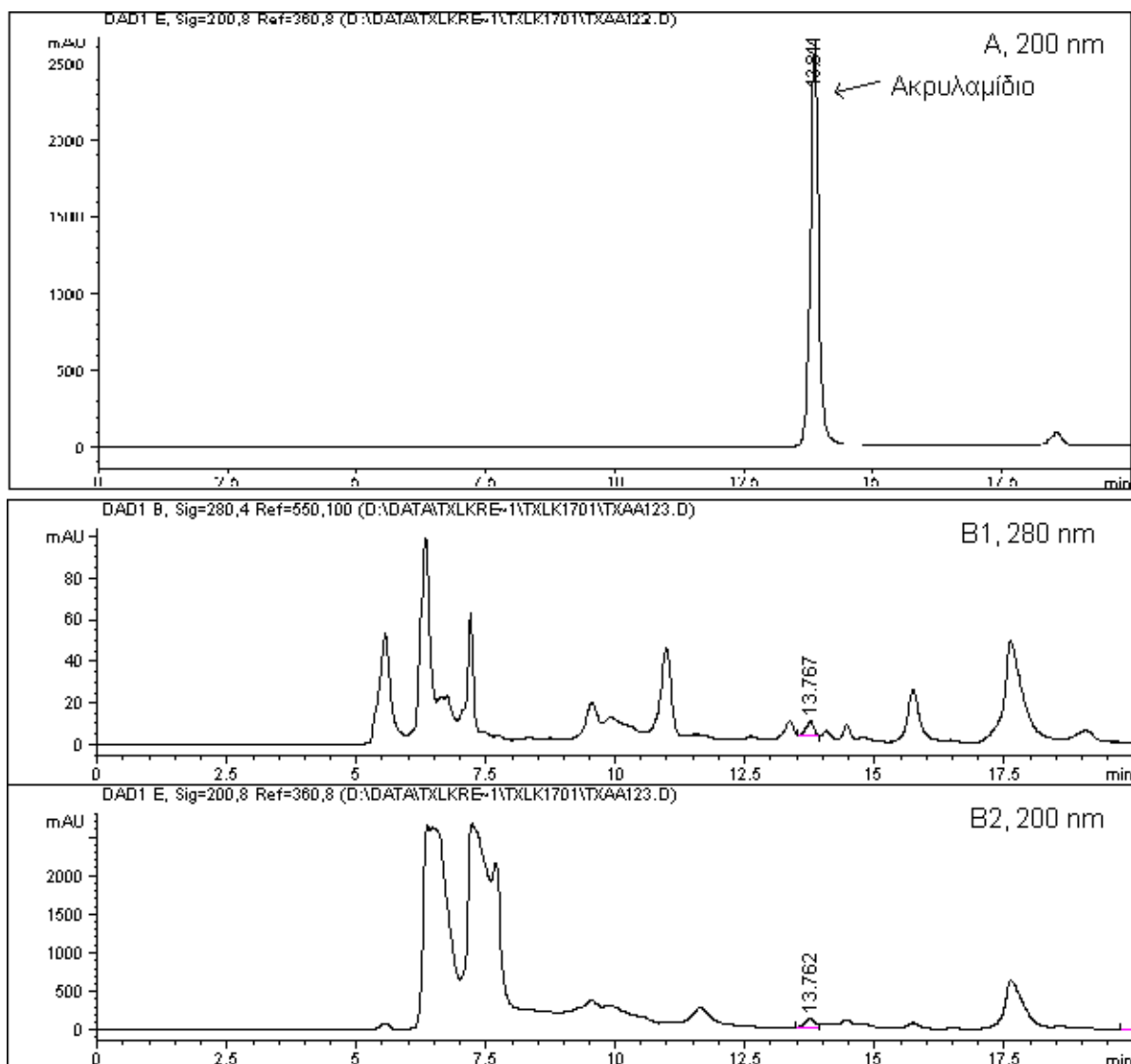
Με όλα τα παραπάνω, επιβεβαιώνεται η ύπαρξη του ακρυλαμιδίου στο εκχύλισμα των τηγανιτών πατατών και πιο συγκεκριμένα στην κορυφή με χρόνο κατακράτησης αυτόν του ακρυλαμιδίου, από την ανάλυση με HPLC (Μέθοδος Α' της § 3.7 της πειραματικής διαδικασίας). Η μέθοδος εκχύλισης που ακολουθήθηκε (με νερό) είναι κατάλληλη για την παραλαβή του ακρυλαμιδίου. Το μειονέκτημα της ανάλυσης στον υγρό χρωματογράφο με στήλη τη C18 Nucleosil 100 (4,6 × 125mm, 5 μm) είναι ότι δεν

επιτυγχάνεται επαρκής διαχωρισμός των συστατικών του εκχυλίσματος, γεγονός που επιβεβαιώθηκε με την ανάλυση στο LC-MS. Συνεπώς, κρίθηκε απαραίτητη η αλλαγή στήλης και συστήματος ανάλυσης για τον πλήρη διαχωρισμό του ακρυλαμιδίου από τα υπόλοιπα συστατικά του εκχυλίσματος ώστε να είναι εφικτή η ποσοτικοποίησή του.

4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός του ακρυλαμιδίου σε τηγανιτές πατάτες

A) Για τον διαχωρισμό του ακρυλαμιδίου από τις προσμίξεις πραγματοποιήθηκε ανάλυση στο HPLC χρησιμοποιώντας στήλη με υλικό πλήρωσης C18 αλλά με μεγαλύτερο μήκος (250 mm) (Μέθοδος Γ', § 3.7 της πειραματικής διαδικασίας).

Στο σχήμα 4.3.1 φαίνονται τα χρωματογραφήματα του προτύπου του ακρυλαμιδίου στα 200 nm και τα χρωματογραφήματα του εκχυλίσματος τηγανισμένης πατάτας σε φριτέζα με έλαιο Bonfrito (1^ο τηγάνισμα) στα 200 και 280 nm. Παρατηρούμε ότι στα χρωματογραφήματα του δείγματος εμφανίζεται κορυφή με χρόνο κατακράτησης αυτόν του προτύπου (RT=13,844 min). Παρόλα αυτά, εμφανίζεται απορρόφηση και στα δύο μήκη κύματος με αναλογία εμβαδών κορυφών $\frac{200nm}{280nm} = \frac{20}{1}$, που υποδεικνύει τον μη ικανοποιητικό διαχωρισμό του ακρυλαμιδίου από τις προσμίξεις.



Σχήμα 4.3.1 Χρωματογραφήματα (A) προτύπου ακρυλαμιδίου και (B1, B2) εκχυλίσματος τηγανισμένης πατάτας σε φριτέζα χρησιμοποιώντας Bonfrito (1^ο τηγάνισμα) σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος [στήλη: C18 Nucleosil 100 (4,6×250mm, 5 μm)].

Για το λόγο αυτό ο ποσοτικός προσδιορισμός του ακρυλαμιδίου στις τηγανιτές πατάτες έγινε όπως περιγράφεται στην πορεία B.

B) Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ακρυλαμιδίου στις τηγανιτές πατάτες έγινε αρχικά χρωματογραφική ανάλυση του υδατικού εκχυλίσματος τηγανιτής πατάτας με τη μέθοδο A' της § 3.7 της πειραματικής διαδικασίας. Συλλέχθηκε η κορυφή με RT=5,8-6 min και το συλλεχθέν κλάσμα συμπυκνώθηκε μερικώς, όπως περιγράφεται στη § 3.8, A) της πειραματικής διαδικασίας. Τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν εκχυλίσματα πατάτας τηγανισμένη με:

Bonfrito, σε φριτέζα (1^ο, 4^ο, 8^ο τηγάνισμα)

Bonfrito, σε τηγάνι (1^ο, 4^ο, 8^ο τηγάνισμα)

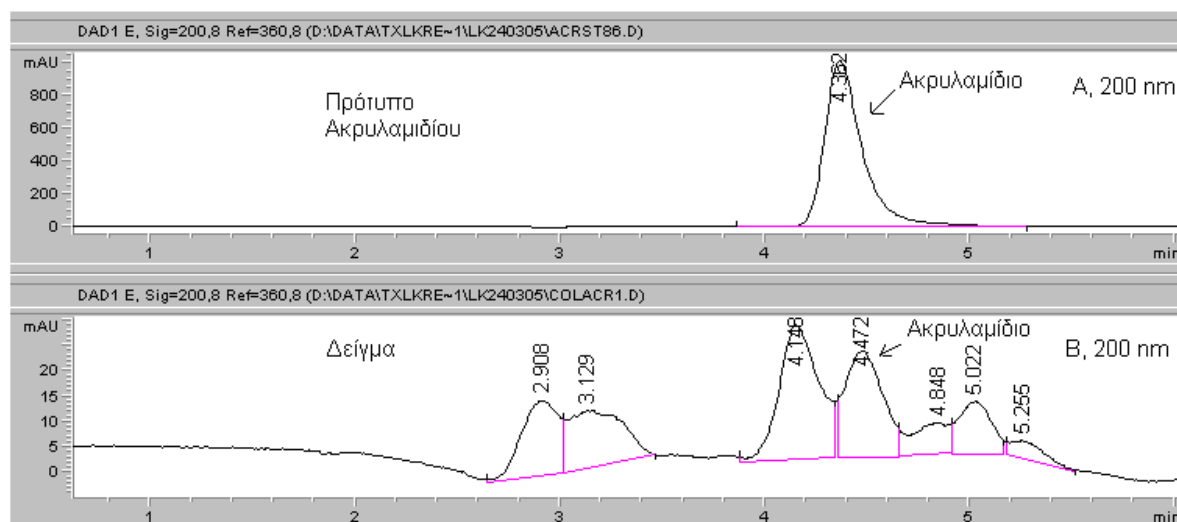
Ελαιόλαδο, σε φριτέζα (1^ο, 4^ο, 8^ο τηγάνισμα)

Ελαιόλαδο, σε τηγάνι (1^ο, 4^ο, 8^ο τηγάνισμα)

Για το δείγμα τηγανισμένης πατάτας με Bonfrito (4^ο τηγάνισμα, τηγάνι) και για το δείγμα τηγανισμένης πατάτας με ελαιόλαδο (1^ο τηγάνισμα, τηγάνι) έγινε συλλογή κλασμάτων από δύο ενέσεις, ενώ για όλα τα υπόλοιπα δείγματα συλλέχθηκε κλάσμα από μία μόνο ένεση.

Ακολούθως, τα συμπυκνωμένα κλάσματα αναλύθηκαν με τη Μέθοδο Β' της § 3.7 της πειραματικής διαδικασίας, στην οποία η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Agilent, Zorbax Edipse, XDB-C8 (4,6×150 mm, 5 μm).

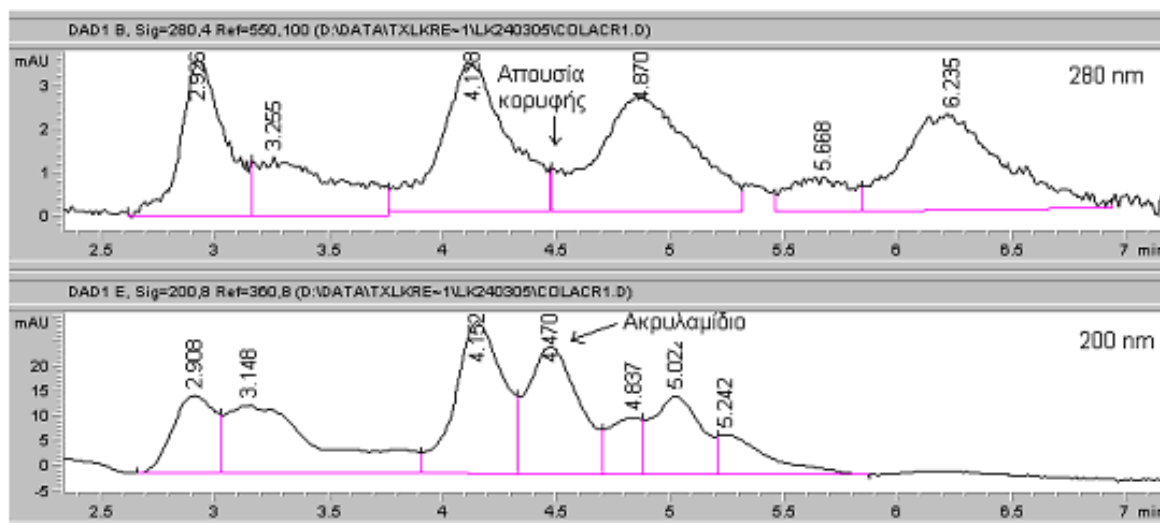
Στο σχήμα 4.3.2 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα, στα 200 nm, του προτύπου του ακρυλαμιδίου και του συλλεγμένου κλάσματος από εκχύλισμα τηγανισμένης πατάτας σε φριτέζα χρησιμοποιώντας ως έλαιο Bonfrito (4^ο τηγάνισμα). Όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα, στο συλλεχθέν κλάσμα του εκχυλίσματος τηγανιτής πατάτας υπάρχει σειρά συστατικών εκ των οποίων ένα έχει χρόνο κατακράτησης αυτό του προτύπου ακρυλαμιδίου (RT=4,4 min).



Σχήμα 4.3.2 Χρωματογραφήματα (Α) προτύπου ακρυλαμιδίου και (Β) συλλεγμένου κλάσματος από εκχύλισμα πατάτας τηγανισμένης σε φριτέζα χρησιμοποιώντας ως έλαιο Bonfrito (4^ο τηγάνισμα) [στήλη: Agilent, Zorbax Edipse, XDB-C8 (4,6×150 mm, 5 μm)].

Στο σχήμα 4.3.3 φαίνεται το χρωματογράφημα, στα 200 και 280 nm, του συλλεχθέντος κλάσματος από εκχύλισμα τηγανισμένης πατάτας σε φριτέζα χρησιμοποιώντας ως έλαιο Bonfrito (4^ο τηγάνισμα). Παρατηρούμε ότι στα 200 nm παρουσιάζεται κορυφή με RT αυτόν του προτύπου. Παράλληλα, η κορυφή αυτή δεν παρουσιάζει απορρόφηση στα 280 nm. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την εύρεση συστήματος για τον διαχωρισμό των συστατικών της κορυφής. Με το σύστημα αυτό

επιτεύχθηκε εκλεκτικός διαχωρισμός του ακρυλαμιδίου και ποσοτικοποίηση του στα δείγματα πατάτας.

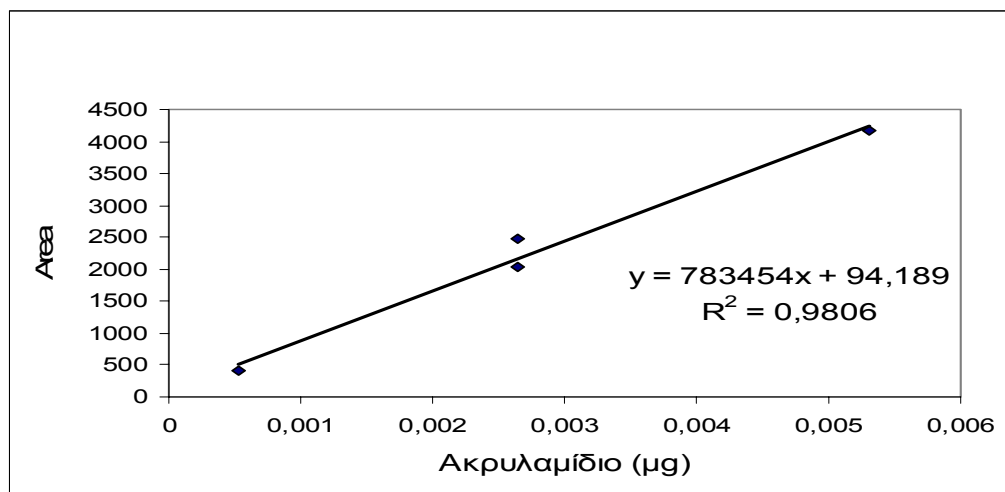


Σχήμα 4.3.3 Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος τηγανισμένης πατάτας σε φριτέζα χρησιμοποιώντας ως έλαιο Bonfrito (4^ο τηγάνισμα) [στήλη: Agilent, Zorbax Eclipse, XDB-C8 (4,6×150 mm, 5 μm)].

4.3.α Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς του Ακρυλαμιδίου

Για την ποσοτικοποίηση του ακρυλαμιδίου στα δείγματα κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς $A=f(m)$, όπου το **A** αντιπροσωπεύει το εμβαδόν (Area) της χρωματογραφικής κορυφής στα 200 nm και το **m** την ποσότητα του ακρυλαμιδίου (μg) που περιέχεται στον όγκο ένεσης (50 μL) από κάθε πρότυπο διάλυμα που αναλύθηκε.

Στο σχήμα 4.3.α.1 παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς του ακρυλαμιδίου.



Σχήμα 4.3.α.1 Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς Ακρυλαμιδίου

4.3.β Συγκέντρωση ακρυλαμιδίου στις τηγανιτές πατάτες

Μέσω της συνάρτησης της πρότυπης καμπύλης αναφοράς υπολογίζεται η ποσότητα του ακρυλαμιδίου που περιέχεται σε όγκο ένεσης (50 μL). Για το δείγμα τηγανισμένης πατάτας σε τηγάνι σε έλαιο Bonfrito (4^ο τηγάνισμα) και για το δείγμα τηγανισμένης πατάτας σε τηγάνι σε ελαιόλαδο (1^ο τηγάνισμα) έγινε συλλογή της κορυφής από δύο ενέσεις. Συνεπώς, η ποσότητα του ακρυλαμιδίου στον παρακάτω πίνακα 4.3.β.1, για τα δύο αυτά δείγματα, αντιστοιχεί σε όγκο δύο ενέσεων (100 μL).

Πίνακας 4.3.β.1 Δεδομένα δειγμάτων τηγανιτής πατάτας και ποσοτικός προσδιορισμός ακρυλαμιδίου

Έλαιο	Μέθοδος	Αριθμός τηγανίσματος	Βάρος δείγματος που εκχυλίστηκε (g)	Εμβαδόν κορυφής	Ποσότητα ακρυλαμιδίου (ng) σε 50 μL (όγκος ένεσης) από το συμπυκνωμένο κλάσμα	Ποσότητα ακρυλαμιδίου (ng) στο συνολικό συλλεχθέν κλάσμα (150 μL)
Bonfrito	Φριτέζα	1 ^ο τηγάνισμα	5,1122	1116,8	1,30	3,92
Bonfrito	Φριτέζα	3 ^ο τηγάνισμα	5,0425	980,6	1,13	3,39
Bonfrito	Φριτέζα	4 ^ο τηγάνισμα	5,0646	735,1	0,82	2,45
Bonfrito	Φριτέζα	8 ^ο τηγάνισμα	5,0041	1885	2,29	6,86
Bonfrito	Τηγάνι	1 ^ο τηγάνισμα	5,0056	222,6	0,16	0,49
Bonfrito	Τηγάνι	4 ^ο τηγάνισμα	5,1105	803,9	0,91*	2,72
Bonfrito	Τηγάνι	8 ^ο τηγάνισμα	5,1111	182,2	0,11	0,34
Ελαιόλαδο	Φριτέζα	1 ^ο τηγάνισμα	5,0451	1138	1,33	3,99
Ελαιόλαδο	Φριτέζα	4 ^ο τηγάνισμα	5,0082	627,2	0,68	2,04
Ελαιόλαδο	Φριτέζα	8 ^ο τηγάνισμα	5,0341	1088,5	1,27	3,80
Ελαιόλαδο	Τηγάνι	1 ^ο τηγάνισμα	5,1450	492,2	0,51*	1,52
Ελαιόλαδο	Τηγάνι	4 ^ο τηγάνισμα	5,0949	143,3	0,06	0,19
Ελαιόλαδο	Τηγάνι	8 ^ο τηγάνισμα	5,0801	270,6	0,23	0,67

*Για αυτά τα δείγματα έγινε συλλογή της κορυφής από δύο ενέσεις (η ποσότητα του ακρυλαμιδίου αντιστοιχεί σε όγκο 100 μL)

Στον Πίνακα 4.3.β.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των υπολογισμών που έγιναν για την συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου σε δείγματα πατάτας τηγανισμένη σε διαφορετικές συνθήκες τηγανίσματος. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου εκφράζεται σε $\mu\text{g/Kg}$ και σε $\mu\text{g}/150\text{ g}$ τηγανιτής πατάτας, δηλαδή σε μία μέση μερίδα προς κατανάλωση. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ως προς την επίδραση που ασκούν στη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου ήταν το είδος και η ποιότητα του ελαίου τηγανίσματος καθώς και ο τρόπος τηγανίσματος. Η διάρκεια τηγανίσματος ήταν σταθερή (8 min) όπως επίσης και η θερμοκρασία τηγανίσματος (170°C).

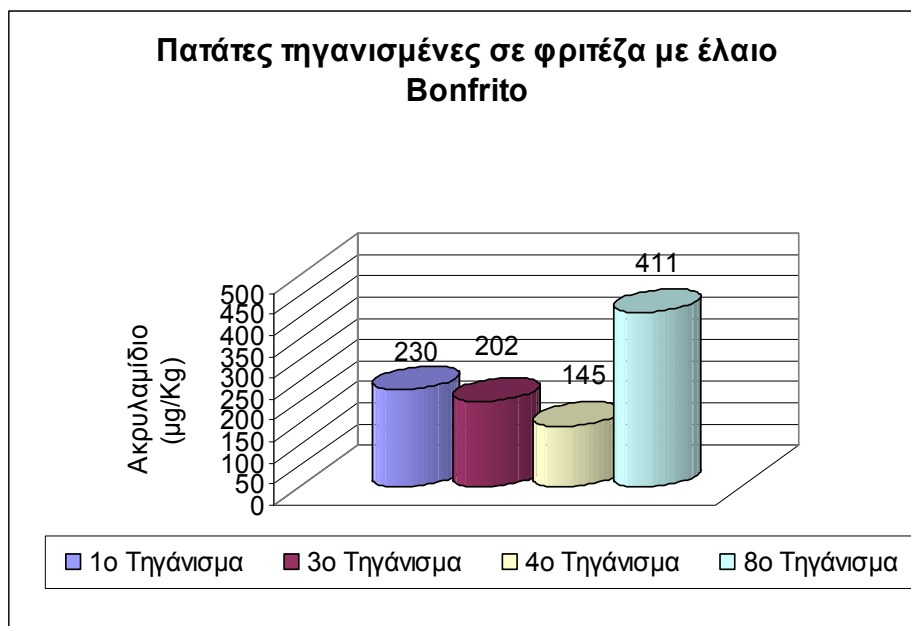
Πίνακας 4.3.β.2 Συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου σε τηγανιτές πατάτες κάτω από διάφορες συνθήκες τηγανίσματος, εκφρασμένη σε $\mu\text{g}/\text{Kg}$ και σε $\mu\text{g}/150\text{ g}$ προϊόντος.

Έλαιο	Μέθοδος	Αριθμός τηγανίσματος	Συγκέντρωση Ακρυλαμιδίου σε $\text{ppb} (\mu\text{g}/\text{Kg})$	Ποσότητα ακρυλαμιδίου σε μία μερίδα πατάτες ($\mu\text{g}/150\text{g}$)
Bonfrito	Φριτέζα	1 ^ο τηγάνισμα	230	34
Bonfrito	Φριτέζα	3 ^ο τηγάνισμα	202	30
Bonfrito	Φριτέζα	4 ^ο τηγάνισμα	145	22
Bonfrito	Φριτέζα	8 ^ο τηγάνισμα	411	62
Bonfrito	Τηγάνι	1 ^ο τηγάνισμα	29	4
Bonfrito	Τηγάνι	4 ^ο τηγάνισμα	80	12
Bonfrito	Τηγάνι	8 ^ο τηγάνισμα	20	3
Ελαιόλαδο	Φριτέζα	1 ^ο τηγάνισμα	238	37
Ελαιόλαδο	Φριτέζα	4 ^ο τηγάνισμα	122	18
Ελαιόλαδο	Φριτέζα	8 ^ο τηγάνισμα	227	34
Ελαιόλαδο	Τηγάνι	1 ^ο τηγάνισμα	44	7
Ελαιόλαδο	Τηγάνι	4 ^ο τηγάνισμα	11	2
Ελαιόλαδο	Τηγάνι	8 ^ο τηγάνισμα	40	6

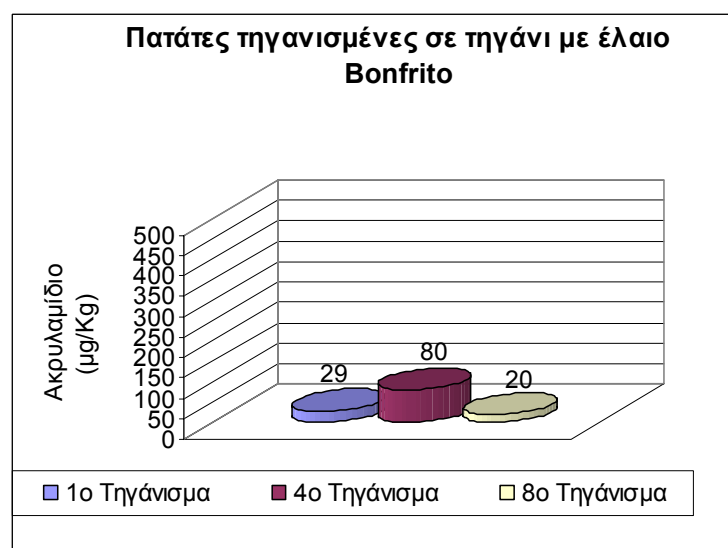
4.4 Σχολιασμός των αποτελεσμάτων

Οι παράγοντες που μελετηθήκαν για την επίδραση τους στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου ήταν το είδος του ελαίου τηγανίσματος, ο αριθμός τηγανισμάτων στο ίδιο έλαιο και ο τρόπος τηγανίσματος (βαθύ ή ρηχό τηγάνισμα). Η επιλογή των παραγόντων αυτών δεν ήταν τυχαία καθώς έχουν διεξαχθεί λίγες έρευνες που να μελετούν την επίδραση αυτών στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Παράλληλα, η θερμοκρασία και η διάρκεια τηγανίσματος αποτέλεσαν σταθερές παραμέτρους κατά το τηγάνισμα (8 min, 170°C) καθώς η επίδρασή τους στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου έχει μελετηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία.

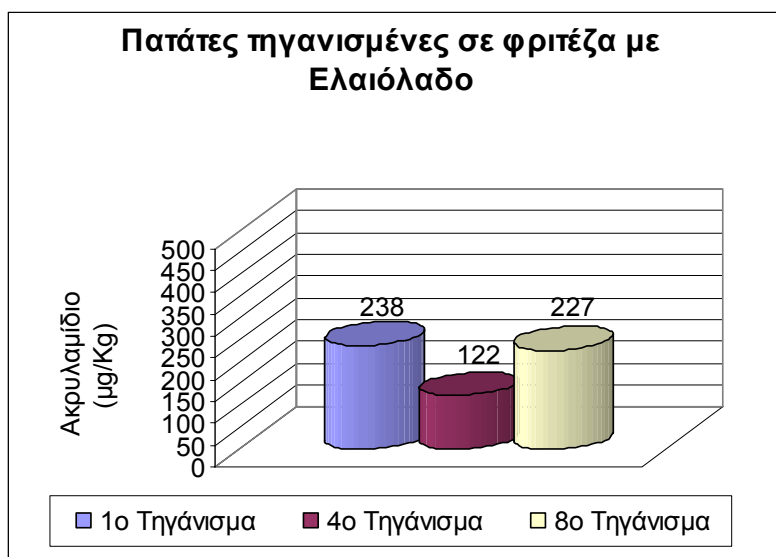
Τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου που προσδιορίστηκαν κυμαίνονται από 11-411 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Στα σχήματα 4.4.1- 4.4.4 παρουσιάζονται διαγραμματικά τα αποτελέσματα που ελήφθησαν ανάλογα με το είδος του ελαίου και τον τρόπο τηγανίσματος. Σε καθένα από αυτά παρουσιάζεται η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου για διαφορετικό αριθμό τηγανισμάτων.



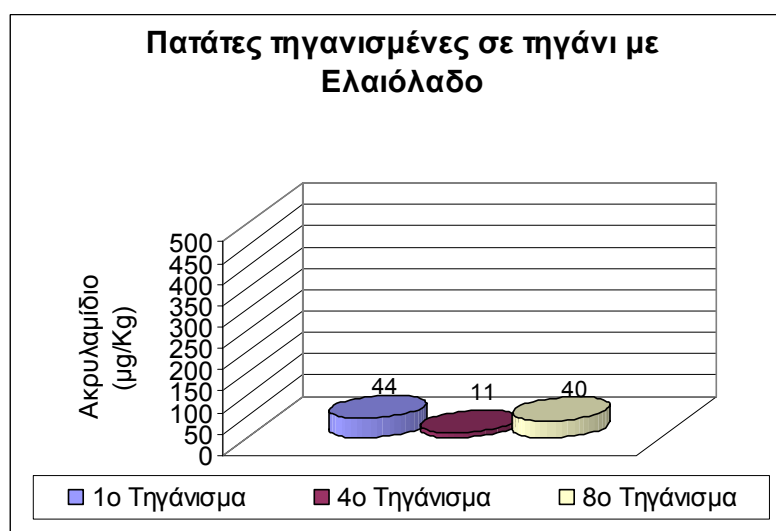
Σχήμα 4.4.1 Συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου σε δείγματα πατάτας τηγανισμένη σε φριτέζα με έλαιο Bonfrito (1^ο, 3^ο, 4^ο, 8^ο τηγάνισμα)



Σχήμα 4.4.2 Συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου σε δείγματα πατάτας τηγανισμένη σε τηγάνι με έλαιο Bonfrito (1^ο, 4^ο, 8^ο τηγάνισμα)



Σχήμα 4.4.3 Συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου σε δείγματα πατάτας τηγανισμένη σε φριτέζα με ελαιόλαδο (1^ο, 4^ο, 8^ο τηγάνισμα)



Σχήμα 4.4.4 Συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου σε δείγματα πατάτας τηγανισμένη σε τηγάνι με ελαιόλαδο (1^ο, 4^ο, 8^ο τηγάνισμα)

Σε κάθε ένα από τα παραπάνω σχήματα ξεχωριστά, παρουσιάζεται μια διακύμανση των συγκεντρώσεων του ακρυλαμιδίου σε σχέση με τον αριθμό των τηγανισμάτων. Στα σχήματα 4.4.1, 4.4.3 και 4.4.4 παρατηρούμε ότι η συκέντρωση του ακρυλαμιδίου μειώνεται στο 4^ο τηγάνισμα σε σχέση με το 1^ο, ενώ αυξάνεται στο 8^ο σε σχέση με το 4^ο.

Μία πιθανή εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι ότι η αρχική φυσική υγρασία του φρέσκου ελαίου τηγανίσματος στο 1^ο τηγάνισμα ευνοεί το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Στα επόμενα τηγανίσματα, μέχρι και το 4^ο, η υγρασία του ελαίου μειώνεται οδηγώντας σε μείωση του σχηματισμού του ακρυλαμιδίου. Μετά το 4^ο τηγάνισμα, καθώς το έλαιο υποβαθμίζεται, σχηματίζονται πολυμερείς ενώσεις που οδηγούν στον αφρισμό και τη δημιουργία γαλακτωμάτων μέσα στο έλαιο, ενώ παράλληλα αυξάνονται τα ολικά πολικά συστατικά (TPM). Λαμβάνοντας υπόψη ότι κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος μεταφέρονται συστατικά καθώς και μικρά κομμάτια του τροφίμου μέσα στο έλαιο, ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου πιθανώς λαμβάνει χώρα και μέσα σε αυτό. Λόγω της παρουσίας γαλακτωμάτων και ολικών πολικών συστατικών στο υποβαθμισμένο έλαιο, το σχηματιζόμενο ακρυλαμίδιο διαλύεται μέσα στο έλαιο και συσσωρεύεται. Η συσσώρευση του ακρυλαμιδίου μέσα στο έλαιο τηγανίσματος εντείνεται παράλληλα μέσω της εκχύλισης ακρυλαμιδίου από το τηγανιτό τρόφιμο προς το έλαιο, καθώς και μέσω της οδού σχηματισμού του ακρυλαμιδίου από την ακρολεΐνη (παρούσα στο υποβαθμισμένο έλαιο). Το ακρυλαμίδιο που συσσωρεύεται στο έλαιο τηγανίσματος μεταφέρεται στο τρόφιμο κατά το τηγάνισμα οδηγώντας σε αύξηση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου.

Αντιθέτως, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.4.2, κατά το ρηχό τηγάνισμα σε Bonfrito η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου αυξάνεται στο 4^ο τηγάνισμα σε σχέση με τα δύο άλλα τηγανίσματα.

Από τα παραπάνω παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου δεν συσχετίζεται με τον αριθμό τηγανισμάτων με τον ίδιο τρόπο στις διάφορες διαδικασίες ή είδη ελαίων που χρησιμοποιήθηκαν. Διατηρώντας σταθερό το είδος του ελαίου και τον τρόπο τηγανίσματος, και μεταβάλλοντας μόνο την ποιότητα του ελαίου η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου δεν μπορεί να προβλεφθεί. Έτσι, είναι δυνατόν να συμπεράνουμε ότι ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου στο τρόφιμο δεν επηρεάζεται από τον αριθμό τηγανισμάτων, και συνεπώς και από το βαθμό υποβάθμισης του ελαίου, παρά μόνο όταν ο αριθμός αυτός πλησιάζει τα 8 τηγανίσματα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Williams (2004), η ποιότητα του ελαίου τηγανίσματος (εκτιμημένη με τον αριθμό υπεροξειδίων) δεν επηρεάζει το επίπεδα του ακρυλαμιδίου. Παράλληλα, οι Matthäus *et al.* (2004) παρατήρησαν ότι παρά τη σταδιακή υποβάθμιση του ελαίου τηγανίσματος (εκτιμημένη με βάση τα επίπεδα των oligομερών των τριγλυκεριδίων), δεν παρουσιάστηκε αύξηση του ακρυλαμιδίου (175°C, 6 min).

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις του ακρυλαμιδίου σε πατάτες τηγανισμένες με τον ίδιο τρόπο τηγανίσματος (βαθύ ή ρηχό) αλλά με διαφορετικό είδος ελαίου, δεν παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές, παρά μόνο όταν το βαθύ τηγάνισμα σε Bonfrito έχει φτάσει ήδη τα 8 τηγανίσματα (σχήμα 4.4.3). Στις βαθέως τηγανισμένες πατάτες, για το 8^ο τηγάνισμα, η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου είναι σχεδόν διπλάσια όταν το έλαιο τηγανίσματος είναι Bonfrito σε σχέση αυτή όταν το έλαιο είναι ελαιόλαδο. Κατά το τηγάνισμα το έλαιο Bonfrito, λόγω της έλλειψης αντιοξειδωτικών, υποβαθμίζεται ευκολότερα σε σχέση με το ελαιόλαδο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ακρολεΐνης μέσω της αφυδάτωσης της γλυκερόλης που απελευθερώνεται κατά την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων. Η ακρολεΐνη έχει προταθεί ότι συμμετέχει σε έναν από τους πιθανούς μηχανισμούς σχηματισμού του ακρυλαμιδίου (Yasahura *et al.*, 2003). Παράλληλα, σύμφωνα με τους Andrikopoulos *et al.* (2002) τα αντιοξειδωτικά του ελαιολάδου δεν μειώνονται σημαντικά πριν το 8^ο τηγάνισμα, με αποτέλεσμα αυτό να προστατεύεται.

Σε γενικές όμως γραμμές, δεν παρουσιάζονται διαφορές στη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου μεταξύ πατατών που έχουν τηγανιστεί με τον ίδιο τρόπο αλλά σε διαφορετικό έλαιο, ανεξάρτητα από το αν το έλαιο είναι υποβαθμισμένο ή όχι λόγω επαναλαμβανόμενων τηγανισμάτων. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει ότι ο το είδος του ελαίου (ελαιόλαδο ή Bonfrito) δεν επηρεάζει το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου, εκτός βέβαια από ακραίες πρακτικές τηγανίσματος. Η παρατήρηση βρίσκεται σε συμφωνία με τα ευρήματα των Williams *et al.* (2004) και των Matthäus *et al.* (2004), οι οποίοι σύγκριναν τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου σε πατάτες τηγανισμένες με διάφορα είδη ελαίων και δεν παρατήρησαν διαφορές. Αντίθετα, στην έρευνα των Gertz *et al.* (2002) ανιχνεύτηκαν υψηλότερα ποσά ακρυλαμιδίου σε πατάτες τηγανισμένες με φοινικέλαιο σε σχέση με αυτές που τηγανίστηκαν με κραμβέλαιο ή ηλιέλαιο.

Οι δύο παραπάνω παρατηρήσεις, ότι το είδος του ελαίου τηγανίσματος και ο αριθμός τηγανισμάτων στο ίδιο έλαιο δεν επηρεάζουν το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου παρά μόνο σε ακραίες εφαρμογές, μπορούν να δικαιολογηθούν από το γεγονός ότι ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου βασίζεται κυρίως σε αντιδράσεις Maillard μεταξύ των συστατικών του τροφίμου (Stadler *et al.*, 2002, Zyzak, 2002, Motttram *et al.*, 2002, Becalski *et al.*, 2003, Yaylayan *et al.*, 2003). Ο μηχανισμός σχηματισμού του ακρυλαμιδίου μέσω της ακρολεΐνης, που προέρχεται από την υποβάθμιση του ελαίου, θεωρείται δευτερεύων (Yasahura *et al.*, 2003, Friedman, 2003).

Η σημαντικότερη παρατήρηση που μπορεί να γίνει σχετικά με τα αποτελέσματα, είναι η επίδραση του τρόπου τηγανίσματος (ρηχό ή βαθύ) στον σχηματισμό του

ακρυλαμιδίου. Οι συγκεντρώσεις του ακρυλαμιδίου στο ρηχό τηγάνισμα (τηγάνι) ήταν μεταξύ 11-80 ppb ενώ για το βαθύ τηγάνισμα (φριτέζα) οι συγκεντρώσεις κυμαίνονταν μεταξύ 122-411 ppb.

Οι συγκεντρώσεις για το βαθύ τηγάνισμα βρίσκονται σε συμφωνία με τις συγκεντρώσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (πχ 334 ppb αναφέρεται ως μέσος όρος από τον JECFA, 2005). Παρόλα αυτά έχουν αναφερθεί συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου στις τηγανιτές πατάτες που ξεπερνούν τα 3000-4000 bbb. Αυτές οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε υψηλές θερμοκρασίες και σε παρατεταμένους χρόνους τηγανίσματος (Pedreschi *et al.*, 2004b). Σε ήπιες θερμοκρασίες τηγανίσματος (170°C) καθώς και σε λογική διάρκεια τηγανίσματος (8 min) οι συγκεντρώσεις του ακρυλαμιδίου δεν ξεπερνούν τα 500 ppb στο βαθύ τηγάνισμα (Grob *et al.*, 2003, Matthäus *et al.*, 2004). Εξάλλου, οι συστάσεις που έχουν δοθεί ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου σε μεγάλο βαθμό αναφέρουν ότι η θερμοκρασία τηγανίσματος δεν πρέπει να ξεπερνά τους 170°-175°C (Rydberg *et al.*, 2003, Matthäus *et al.*, 2004). Στις συστάσεις όμως αυτές δεν γίνεται διάκριση μεταξύ βαθέως και ρηχού τηγανίσματος.

Οι συγκεντρώσεις που παρατηρούνται στο ρηχό τηγάνισμα (11-80 ppb) δεν είναι δυνατόν να συγκριθούν με τις συγκεντρώσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία αφού δεν έχουν διεξαχθεί μελέτες που να προσδιορίζουν τα ποσά του ακρυλαμιδίου σε πατάτες τηγανισμένες με συνθήκες ρηχού τηγανίσματος. Παρατηρούνται σαφώς χαμηλότερες τιμές ακρυλαμιδίου στο ρηχό τηγάνισμα σε σχέση με το βαθύ. Είναι δυνατόν να συμπεράνουμε ότι το βαθύ τηγάνισμα πιθανώς ευνοεί τον σχηματισμό του ακρυλαμιδίου, ανεξάρτητα από το είδος και την ποιότητα του ελαίου. Το ρηχό τηγάνισμα θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πρακτικό τρόπο μείωσης της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου με ταυτόχρονη διατήρηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τροφίμου.

Αυτή η παρατήρηση αποτελεί μία καινοτομία καθώς οι ήδη υπάρχουσες έρευνες έχουν εστιάσει κυρίως σε βιομηχανικές τεχνικές τηγανίσματος για μαζική παραγωγή και όχι τόσο σε παραδοσιακές τεχνικές οικιακής κλίμακας. Έτσι, δεν έχουν γίνει έρευνες σχετικά με το αν και πώς η μέθοδος του τηγανίσματος επηρεάζει τον σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Οι περισσότερες έρευνες που έχουν διεξαχθεί σχετικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου αναφέρονται στο βαθύ τηγάνισμα ή σε ένα μόνο τρόπο μαγειρέματος (πχ στον φούρνο). Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με περισσότερα δείγματα και πολλές επαναλήψεις των μετρήσεων ώστε να επαληθευθεί η συγκεκριμένη υπόθεση. Ένας άλλος παράγοντας που θα

μπορούσε να μελετηθεί είναι ο όγκος του ελαίου τηγανίσματος καθώς και η χρήση νωπής πατάτας αντί για προτηγανισμένης.

Μία πιθανή εξήγηση για το πώς το βαθύ τηγάνισμα πιθανώς ευνοεί το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου σχετίζεται με τις φυσικές μεταβολές που συμβαίνουν στο τρόφιμο κατά το τηγάνισμα. Στο τηγάνισμα το τρόφιμο χάνει υγρασία και απορροφά έλαιο (Kochhar *et al.*, 2004). Επειδή στο βαθύ τηγάνισμα το τρόφιμο βρίσκεται πλήρως εμβαπτισμένο στο έλαιο τηγανίσματος, ο ρυθμός μεταφοράς της θερμότητας σε αυτό να είναι πολύ υψηλός. Κάτι τέτοιο θα ήταν δυνατόν να οδηγεί σε ταχύτατη απομάκρυνση της υγρασίας από την επιφάνεια του τροφίμου και σε υψηλότερους ρυθμούς ξήρανσης σε σχέση με αυτούς στο ρηχό τηγάνισμα. Στα βαθύως τηγανισμένα τρόφιμα η επιφάνεια του τροφίμου είναι περισσότερο αφυδατωμένη. Αφού ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου στο τρόφιμο ακολουθεί αντιδράσεις Maillard, μια απότομη μείωση της υγρασίας στην εξωτερική επιφάνεια του τροφίμου, εξαιτίας του υψηλότερου ρυθμού ξήρανσης που παρατηρείται στο βαθύ τηγάνισμα, θα ήταν δυνατόν να ευνοήσει αυτές τις αντιδράσεις και συνεπώς το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου στην επιφάνεια του τροφίμου. Η ίδια εξήγηση έχει δοθεί και από τους Matthäus *et al.* (2004) για να δικαιολογηθούν τα υψηλότερα ποσά ακρυλαμιδίου σε υψηλότερες θερμοκρασίες τηγανίσματος. Είναι απαραίτητο να διεξαχθούν μελέτες σχετικά με αυτή την υπόθεση.

Μία άλλη πιθανή εξήγηση για την αύξηση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου στις βαθύως τηγανισμένες πατάτες σχετίζεται με την μεγάλη θερμοχωρητικότητα του ελαίου τηγανίσματος. Στο βαθύ τηγάνισμα, κατά την εισαγωγή του τροφίμου μέσα στο έλαιο τηγανίσματος η θερμοκρασία του ελαίου μεταβάλλεται ελάχιστα σε σχέση με το ρηχό τηγάνισμα, καθώς η αναλογία του ελαίου προς το τρόφιμο είναι μεγαλύτερη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να υπόκειται το τρόφιμο θερμικό shock κατά το οποίο ευνοείται ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου λόγω υψηλής θερμοκρασίας.

Τέλος, πρέπει να επισημανθεί ότι στις περισσότερες έρευνες προσδιορισμού του ακρυλαμιδίου σαν μέθοδοι ανάλυσης χρησιμοποιούνται GC-MS και HPLC-MS. Με τη παρούσα μέθοδο ανάλυσης (HPLC-DAD), επιτεύχθηκε εκλεκτικός διαχωρισμός του ακρυλαμιδίου και ποσοτικοποίηση του στα δείγματα πατάτας. Τα αριθμητικά αποτελέσματα που λαμβάνονται από αυτή τη μέθοδο ανάλυσης, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι σύμφωνα με αυτά που λαμβάνονται με τις δύο άλλες μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιούνται στην βιβλιογραφία. Παρόλα αυτά, η συλλογή των κλασμάτων του ακρυλαμιδίου και η ανάλυση τους με δεύτερη αναλυτική στήλη αποτελεί μειονέκτημα αυτής της μεθόδου ανάλυσης καθώς την καθιστά χρονοβόρα. Για να

αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα θα ήταν δυνατόν να εφαρμοστεί two-dimensional HPLC χρησιμοποιώντας δύο στήλες εν σειρά (on line) για την ανάλυση των δειγμάτων, κατά την οποία το κλάσμα συλλογής να μεταφέρεται μετά την έκλουσή του απευθείας στην δεύτερη στήλη ανάλυσης. Αυτή η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί και από τον Fauhl (2003) για τον διαχωρισμό του ακρυλαμιδίου από τις προσμίξεις. Έτσι, προτείνεται μία εναλλακτική μέθοδος ανάλυσης του ακρυλαμιδίου για εργαστήρια που δεν διαθέτουν GC-MS και HPLC-MS. Κρίνεται απαραίτητο να διεξαχθούν διαεργαστηριακές μελέτες στις οποίες τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με την παρούσα μέθοδο (HPL-DAD) να συγκρίνονται με τα αποτελέσματα από μία δεύτερη μέθοδο αναφοράς (πχ GC-MS). Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να ελεγχθεί η αξιοπιστία και ακρίβεια της μεθόδου ανάλυσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

Συμπεράσματα

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη, μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών συνθηκών τηγανίσματος στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου σε τηγανιτές πατάτες. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν το είδος του ελαίου τηγανίσματος, ο αριθμός τηγανισμάτων στο ίδιο έλαιο καθώς και ο τρόπος τηγανίσματος (βαθύ ή ρηχό τηγάνισμα). Με βάση τα αποτελέσματα της πτυχιακής μελέτης, είναι δυνατόν να διεξαχθούν τα συμπεράσματα που αναφέρονται παρακάτω.

Ως μέθοδος ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού σειράς φωτοδιοδίων (HPLC-DAD). Με τη μέθοδο αυτή επιτεύχθηκε ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός του ακρυλαμιδίου σε τηγανιτές πατάτες. Χρησιμοποιώντας HPLC-MS κατέστη δυνατή η επιβεβαίωση της ύπαρξης του ακρυλαμιδίου σε τηγανιτές πατάτες (και στο βαθύ και στο ρηχό τηγάνισμα).

Σε εργαστήρια που δεν διαθέτουν τον κατάλληλο εξοπλισμό για την εφαρμογή των δύο κυριότερων μεθόδων ανάλυσης (GC-MS και HPLC-MS), η παρούσα μέθοδος ανάλυσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του ακρυλαμιδίου. Προτείνεται η εφαρμογή two-dimensional ή multi-dimensional HPLC για τον διαχωρισμό του ακρυλαμιδίου από τις προσμίξεις.

Απαιτείται η διεξαγωγή συγκριτικών μελετών με άλλες τεχνικές (GC-MS και HPLC-MS) ώστε να επιβεβαιωθεί η αξιοπιστία της μεθόδου ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε.

Καινοτομία της μελέτης αποτελεί το γεγονός ότι μελετήθηκε για πρώτη φορά η επίδραση του τρόπου τηγανίσματος (βαθύ ή ρηχό τηγάνισμα) στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου είναι υψηλότερη στις βαθύως τηγανισμένες πατάτες σε σχέση με τις ρηχά τηγανισμένες. Για τον λόγο αυτό το ρηχό τηγάνισμα μπορεί να αποτελέσει έναν πρακτικό τρόπο μείωσης του ακρυλαμιδίου στις τηγανιτές πατάτες.

Πιθανώς το βαθύ τηγάνισμα να ευνοεί το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου μέσω αντιδράσεων Maillard λόγω του υψηλότερου βαθμού ξήρανσης της επιφάνειας του τροφίμου καθώς και του θερμικού shock που υπόκειται το τρόφιμο καθώς εισάγεται μέσα στο έλαιο.

Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες που να επιβεβαιώνουν ότι το βαθύ τηγάνισμα ευνοεί το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Είναι δυνατόν να μελετηθεί η επίδραση διαφόρων όγκων ελαίου τηγανίσματος στη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στις τηγανιτές πατάτες. Παράλληλα, είναι απαραίτητο να εξηγηθεί ο τρόπος με τον οποίο ευνοείται ο μηχανισμός του ακρυλαμιδίου στο βαθύ τηγάνισμα, πιθανώς μετρώντας την υγρασία της επιφάνειας του τροφίμου και τη θερμοκρασία του ελαίου μετά την εισαγωγή του τροφίμου σε αυτό.

Αντιθέτως, το είδος του ελαίου τηγανίσματος και ο αριθμός τηγανισμάτων στο ίδιο έλαιο δεν επιδρούν στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου, παρά μόνο σε ακραίες εφαρμογές τηγανίσματος. Υπάρχουν ενδείξεις ότι στα πρώτα και στα τελευταία τηγανίσματα η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου αυξάνεται. Για την επεξήγηση αυτών των αποτελεσμάτων θα πρέπει να συσχετιστούν οι συγκεντρώσεις του ακρυλαμιδίου στο τρόφιμο με τις συγκεντρώσεις του ακρυλαμιδίου στο έλαιο καθώς και με δείκτες της ποιότητας του ελαίου τηγανίσματος.

Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στις τηγανιτές πατάτες κυμαινόταν μεταξύ 11-411 $\mu\text{g/Kg}$. Στις περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες αναφέρονται επίπεδα ακρυλαμιδίου $\sim 300 \mu\text{g/Kg}$, ενώ σε ακραίες συνθήκες τηγανίσματος αναφέρονται τιμές άνω των 4000-5000 $\mu\text{g/Kg}$. Με αυτό τον τρόπο, επιβεβαιώθηκε η σύσταση ότι το τηγάνισμα στους 170°C για 8 min οδηγεί σε χαμηλά ποσά ακρυλαμιδίου.

Τέλος, απαραίτητη είναι η διεξαγωγή μελετών σύγκρισης της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου σε νωπές και προτηγανισμένες πατάτες τηγανισμένες υπό διαφορετικές συνθήκες τηγανίσματος. Οι διαδικασίες τηγανίσματος αλλά και οι μετρήσεις θα πρέπει να επαναλαμβάνονται τουλάχιστον δύο φορές ώστε να ελέγχεται η επαναληπτικότητα των αποτελεσμάτων.

Βιβλιογραφία

- 2nd Acrylamide in Food Workshop: Update Scientific Issues, Uncertainties, and Research Strategies, April 13-15, 2004, Chicago, Illinois.
- Abramsson-Zetterberg, L., (2003). The dose-response relationship at very low doses of acrylamide linear in the flow cytometer-based mouse micronucleus assay. *Mutat. Res.*, 535: 215-222.
- Adler, I. D., Schmid, T. E., Baumgartner, A., (2002). Induction of aneuploidy in male mouse germ cells detected by the sperm-FISH assay: a review of the present data base. *Mutat. Res.- Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 504: 173-182.
- Ahn, J. S., Castle, L., Clarke, D. B., Lloyd, A. S., Philo, M. R., Speck, D. R., (2002). Verification of findings of acrylamide in heated foods. *Food Additives and Contaminants*, 19: 1116-1124.
- Alexander, J.C., (1986). Heated and oxidized fats. In: *Dietary Fat and Cancer* Ip, C., D. F. Burt, A. E. Rogers and C. Mettlin, Eds. Alan R. Liss., New York. pp. 185-209.
- Alim, H., Morton, I. D., (1974). Deep fat frying and absorption by a fried product. *J. Sci. Food Agr.*, 25: 1041-1042.
- Amrein, T., Bachmann, S., Noti, A., Biedermann, M., Ferraz Barbosa, M., Biedermann-Brem, S., Grob, K., Keiser, A., Realini, P., Escher, F., Amado, R., (2003). Potential of acrylamide formation, sugars, and free asparagine in potatoes: a comparison of cultivars and farming systems. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 5556-5560.
- Amrein, T., M., Schonbacheler B., Escher F., Amado, R., (2004). Acrylamide in gingerbread: critical factors for formation and possible ways of reduction. *J. Agric. Food Chem.*, 52(13): 4282-4288.
- Andrawes, F., Greenhouse, S., Draney, D., (1987). Chemistry of acrylamide bromination for trace analysis by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 399: 269-275.
- Andrikopoulos, N. K., Kalogeropoulos, K., Falirea, A., Barbagianni, N., (2002). Performance of virgin oil and vegetable shortening during deep-frying and pan-frying of potatoes. *Inter. J. Food Sci. Tech.*, 37: 177-190.
- Arroyo, R., Cuesta, C., Sanchez-Montero, J. M., Sanchez-Muniz, F., (1995). High performance size exclusion chromatography of palm olein used for frying. *Fat Sci. Technol.*, 95: 292-96.
- Artman, N. R., (1969). The chemical and biological properties of heated and oxidised fats. In: *Advances in Lipid Research*, Vol.7, Eds. Paoletti, R., & Kritchevsky, D. Academic Press, New York.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), (1984). *Official Methods of analysis*, 14th edn, Washington, D.C.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), : Polar components in frying fats. *Official Method 982.27*, Chapter 41.1.34.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Polymerized triglycerides in oils and fats. *Method 993.25*, Chapter 41.1.67.
- Barbanti, D., Pizzirani, S., Dall Rosa, M., (1994). The frying operation. II. Chemical and physico-chemical modifications in the oil. *Ind. Alim.*, 33: 318-324.
- Becalsci, A., Lau, B., P., Lewis, D., Seaman, S., W., Hayward, S., Sahagian, M., Ramesh, M., Leclerc, Y., (2004). Acrylamide in French fries: influence of free amino acids and sugars. *J. Agric. Food Chem.*, 52(12): 3801-3806.
- Becalski, A., Lau, B. P. Y., Lewis, D., Seaman, S. W., (2003). Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 802-808.
- Bergmark, E., (1997). Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. *Chem. Res. Toxicol.*, 10: 78-84.
- Biedermann, M., Biedermann-Brem, S., Noti, A., Grob, K., (2002). Methods for determining the potential of acrylamide formation and its elimination in raw materials for food preparation, such as potatoes. *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.*, 93: 653-667.
- Biedermann, M., Biedermann-Brem, S., Noti, A., Grob, K., Egli, P., Mändli, H., (2002). Two GC-MS methods for the analysis of acrylamide in foods. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 93: 638-652 [http://www.klzh.ch/downloads/acrylamid_1.pdf].
- Biedermann-Brem, S., Noti, A., Grob, K., Imhof, D., Bazzocco, D., Pfeifferle, A., (2003). How much reducing sugar may potatoes contain to avoid excessive acrylamide formation during roasting and baking? *Eur. Food Res. Technol.*, 217: 369-373.
- Billek, G., (2000). Health aspects of thermoxidized oils and fats. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102: 587-593.
- Bognar, A., (1998). Comparative study of frying to other cooking techniques influence on the nutritive value. *Grasas Acietes*, 49: 250-260.

- Boskou, D., (2002). Frying Fats. In: Chemical and Functional Properties of Food Lipids. Eds. Sikorski, Z.E., Kolakowska, A., CRC Press, pp. 325-344.
- Bouchon, P., Aguilera, J. M., Pyle, D. L., (2000). Kinetics of oil uptake during frying. In: Proceedings of 8th International Congress on Engineering and Food ICFF, Eds. Welti-Chanes, J., Barbosa-Canovas, G. V., Technomic Publishing Co., Lancaster, 8: Vol. 2, pp. 1396-1399.
- Bouchon, P., Hollins, P., Person, M., Pyle, D. L., Tobin, M. J., (2001). Oil distribution in fried potatoes monitored by infrared micro spectroscopy. *J. Food Sci.*, 66: 918-923.
- Brütting, R., Spiteller, G., (1994). Produkte der Dimerisierung ungesättigter Fettsäuren. XII: Die Dimerisierung von Konjuefettsäuren. *Fat Sci. Technol.*, 96: 445-451.
- Bull, R. J., Robinson, M., Laurie, R. D., Stoner, G. D., Greisiger, E., Meier, J. R. J., Stober, J., (1984). Carcinogenic effects of acrylamide in Sencar and A/J mice. *Cancer Res.* 44: 107-111.
- Calleman, C. J., Bergmark, E., Costa, L. G., (1990). Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from haemoglobin adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.*, 3: 406-412.
- Castle, L., (1993). Determination of acrylamide monomer in mushrooms grown on polyacrylamide gel. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41: 1261-1263.
- Castle, L., Campos, M.-J., Gilbert, J., (1991). Determination of acrylamide monomer in hydroponically grown tomato fruits by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54: 549-555.
- Cavalli, S., Maurer, R., Höfler, F., (2002). Fast determination of acrylamide in food samples using accelerated solvent extraction followed by ion chromatography with UV or MS-detection, 2003, LC/GC Europe, The Applicationsbook, April 2, 1-3.
- Chang, S. H., Peterson, R., Ho, T. C., (1978). Chemical reactions involved in deep fat frying of foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 55: 718.
- Chapin, R. E., Fail, P. A., George, J. D., Grizzle, T. B., Heindel, J. J., Harry, G. J., Collins, B. J., Teague, J., (1995). The reproductive and neural toxicities of acrylamide and three analogues in Swiss mice, evaluated using the continuous breeding protocol. *Fundam. Appl. Toxicol.* 27: 9-24.
- Chardigny, J. M., Bretillon, L., Sebedio, J. L., (2001). New insights in health. Effects of *trans* α -linolenic acid isomers in humans. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 103: 478-482.
- Chuda, Y., Ono, H., Yada, H., Ohara-Takada, A., Matsuura-Endo, C., Mori, M., (2003). Effects of physiological changes in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) after low temperature storage on the level of acrylamide formed in potato chips. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67(5): 1188-1190.
- Clark, W. L., and Serbia, G.W., (1991). Safety aspects of frying fats and oils. *Food Technology*, 45: 84-89.
- Costa, L. G., (1996). Biomarker research in neurotoxicology: the role of mechanistic studies to bridge the gap between the laboratory and epidemiological investigations. *Environ. Health Perspect.*, 104: 55-67.
- Dearfield, K. L., Douglas, G. R., Ehling, U. H., Moore, M. M., Sega, G. A., Brusick, D. J., (1995). Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat. Res.*, 330: 71-99.
- DGF (German Society for Fat Research), (2000). Proceedings of the 3rd international symposium of deep-fat frying – final recommendations. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 102: 594.
- Dobarganes, C., Márquez-Ruiz, G., Velasco, J., (2000). Interactions between fat and food during deep-frying. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 102: 521-528.
- Dobarganes, M. C., Márquez-Ruiz, G., Pérez-Camino, M. C., (1993). Thermal stability and frying performance of genetically modified sunflower oils. *J. Agr. Food Chem.*, 41: 678-81.
- Dobarganes, M. C., Pérez-Camino, M. C., Márquez-Ruiz, G., (1988). High-performance size-exclusion chromatography of polar compounds in heated and non-heated fats. *Fat. Sci. Technol.*, 90: 308-311.
- EEC, (1992). Commission Directive 92/39/EEC, 1992, amending Directive 90/128/EEC relating to plastics materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, L168, 21-29.
- EEC, (1998). Council Directive 98/83/EC of Nov 3 1998, on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities*, L330, 32-54.
- Fauhl, C., (2003). Proficiency testing acrylamide. Presentation at the workshop 'Analytical Methods for Acrylamide Determination in Food', Oud-Turnhout, Belgium.
- Fauhl, C., Klaffke, H., Mathar, W., Palvinskas, Wittkowski, R., (2002). Acrylamide interlaboratory study 2002 [http://www.bfr.bund.de/cms/detail.php?template=internet_de_index_js].
- Fillon, L., Henry, C. J. K., (1998). Nutrient losses and gain during frying. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 49: 157-68.
- Firestone, D., Horwitz, W., Friedman, L., Shue, G. M., (1961). Heated fats. I. Studies of the effects of heating on the chemical nature of cottonseed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 38: 253.

- Fiselier, K., Grob, K., Pfefferle, A., (2004). Brown potato croquettes low in acrylamide by coating with egg/breadcrumbs. *Eur. Food Res. Technol.*, 219: 111-115.
- Friedman, M. A., Duak, L. H., Stedham, M. A., (1995). A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 27: 95-105.
- Friedman, M., (2003). Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 5404-4526.
- Fritsch, C. W., (1981). Measurements of frying fat deterioration: A Brief View. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58: 272.
- Gall, K. L., Otwell, W. S., Koburger, J. A., Apledorf, H., (1983). Effects of four cooking methods on the proximate, mineral, and fatty acid composition of fish fillets. *J. Food Sci.*, 48: 1068-1074.
- Gamble, M. H., Rice, P., Selman, J. D., (1987). Relationship between oil uptake and moisture loss during frying of potato slices from C.V. Record UK tubers. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 22: 233-241.
- Gertz, C., (1977). Zur Analytik der Fritierfette und -öle. *Lebensmittelchemie*
- Gertz, C., (2000). Chemical and physical parameters as quality indicators of used frying fats. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 102: 543-551.
- Gertz, Ch., Klostermann, S., (2002). Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104: 762-771.
- Goburdhun, D., Laulloo S. B. J., Musruck, R., (2001). Evaluation of soybean quality during conventional frying by FTIR and some chemical indexes. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 52: 31-42.
- Granath, F. N., Vaca, C. E., Ehrenberg, L. G., Tornqvist, M. A., (1999). Cancer risk estimation of genotoxic chemicals based on target dose and a multiplicative model. *Risk Anal.*, 19: 309-320.
- Grandgirard, A., Sebedio, J. L., Fleury, J., (1984). Geometrical isomerisation of linolenic acid during heat treatment of vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61: 1563-1568.
- Grob, K., Biedermann, M., Biedermann-Brem, S., Noti, A., Imhof, D., Amrein, T., Pfefferle, A., Bazzocco, D., (2003). French fries with less than 100 µg/Kg acrylamide. A collaboration between cooks and analysts. *Eur. Food Res. Technol.*, 217: 185-194.
- Guhr, G., Gertz, C., Waibel, J., Arens, M., (1981). Bestimmung der polaren Anteile in Fritierfetten. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 83: 373-376.
- Guhr, G., Waibel, J., (1978). Untersuchungen an Fritierfetten; Zusammenhänge zwischen dem Gehalt an petrolether-unlöslichen oxidierten Fettsäuren und dem Gehalt an polaren Substanzen bzw. dem Gehalt an polymeren Triglyceriden. *Fette, Seifen Anstrichmittel*, 80: 106-113.
- Gutierrez-Espleta, G. A., Hughes, L. A., Piegorsch, W. W., Shelby, M. D., Genoroso, W. M., (1992). Acrylamide: dermal exposure produces genetic damage in male mouse germ cells. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18: 189-192.
- Haase, N. U., Matthäus, B., Vosmann, K., (2003a). Acrylamid in Kartoffelerzeugnissen. *Kartoffelbau*, 12: 58-61.
- Haase, N. U., Matthäus, B., Vosmann, K., (2003b). Minimierungsansätze zur Acrylamid-Bildung in pflanzlichen Lebensmitteln- aufgezeigt am Beispiel von Kartoffelchips. *Dtsch. Lebensm.- Rundsch.*, 99: 87-90.
- Haase, N. U., Weber, L., (2003c). Variability of sugar content in potato varieties suitable for processing. *Food, Agric. Environ.*, 1: 80-81.
- Hagmar, L., Tornqvist, M., Nordander, C., Rosen, I., Bruze, M., Kautiainen, A., Magnusson, A. L., Malmberg, B., Aprea, P., Granath, F., Axmon, A., (2001). Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand. J. Work Environ. Health*, 27: 219-226.
- He, F. S., Zhang, S. L., Wang, H. L., Li, G., Zhang, Z. M., Li, F. L., Dong, X. M., Hu, F., (1989). Neurological and electroneuromyographic assessment of the adverse effects of acrylamide on occupationally exposed workers. *Scand. J. Work Environ. Health*, 15: 125-129.
- Henry, C. J. K., (1998). Impact of fried foods on macronutrient intake, with special reference to fat and protein. *Grasas y Aceites*, 49: 336-339.
- Höfler, F., Maurer, R., Cavalli, S., (2002). Schnelle Analyse von Acrylamid in Lebensmitteln mit ASE und LC/MS. *GIT Labor-Fachzeitschrift*, no. 9: 968-970.
- IARC, (1994). Some Industrial Chemicals; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France.
- IUPAC (1987). Standard Methods for the Analysis of Oils. Eds. Paquot, C., Hautfenne, A., 7th edn. International Union of Pure and Applied Chemistry. Applied Chemistry Division, Commission on Oils Fats and Derivatives. Blackwell Scientific, Boston.
- Johnson, K., Gorzinski, S., Bodner, K., Campelli, R., Wolf, C., Friedman, M., Mast, R., (1986). Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 85: 154-168.

- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), (2005). Sixty-fourth meeting Rome, Summary and conclusions. Rome, 8-17 February, 2005, pp. 7-17,45.
- Jorge, N., Márquez-Ruiz, G., Martín-Polvillo, M., Ruiz-Méndez, M.V., Dobarganes, M. C., (1996). Influence of dimethylpolysiloxane addition to frying oils. Performance of sunflower oil in discontinuous and continuous laboratory frying. *Grasas y Aceites*, 47: 20–25.
- Kaliora, A., C., Andrikopoulos, N., K., Dedoussis, G., V., Z., Chiou, A., Mylona, A., (2003). Medium polarity lipids from fried oils promote LDL oxidation in vitro. *Ital. J. Food Sci.*, 15: 511-520.
- Keller, Ch., Escher, F., Solms, J. A., (1986). Method of localising fat distribution in deep-fat fried potato products. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 19: 346–348.
- Khanna, V. K., Husain, R., Seth, P. K., (1992). Protein malnourishment: a predisposing factor in acrylamide toxicity in pregnant rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, 36: 293-305.
- Kiritsakis, A., Aspris, P., and Marakakis, P., (1989). Trans isomerization of certain vegetable oils during frying. In: *Flavors and off-flavors. Flavour chemistry of fats and oils*. Eds. Charalambous, G., Min, P.B., and Smouse, T.H. AOAS. The 6th International Flavor Conference Rethymnon, Crete, Greece, 5-7 July, 1989, pp. 893-896.
- Kita, A., Brathen, E., Knutsen, S. H., Wicklunds, T., (2004). Effective Ways of Decreasing Acrylamide Content in Potato Crisps during Processing. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 7011-7016.
- Kochhar, S.P., Gertz, C., (2004). New theoretical and practical aspects of the frying process. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 106: 722-727.
- Kreyenmeyer, F., (2003). Vergleichender Frittierversuch mit und ohne Zusatz von Dimethylpolysiloxan (E900) auf den Acrylamidgehalt in Pommes frites. Report No. 1517 German Institute for Food Technology e.V. 1–3.
- Lang, K., Kkieckebusch, W., and Griem, W., (1963). *Z. Ernährungswiss.* 7: 109
- Leonard, E.C., (1979). Polymerization-Dimer acids. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 56 (11): 782A-785A.
- Makinson, J. H., Greenfield, M. L., Wong, M. L., Wills, R. B., (1987). Fat uptake during deep-fat frying of coated and uncoated foods. *J. Food Comp. Anal.*, 1: 93–101.
- Márquez-Ruiz G., Pérez-Camino, M., C., Dobarganes, M., C., (1992). Digestibility of fatty acid monomers, dimers and polymers in the rat. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 69: 930–934
- Masson, L., Robert, P., Romero, N., Izaurieta, M., Valenzuela, S., Ortíz, J., Dobarganes, M. C., (1997). Comportamiento de aceites poliinsaturados en la preparación de patatas fritas para consumo inmediato. Formación de nuevos compuestos y comparación de métodos analíticos. *Grasas y Aceites*, 48: 273–81.
- Matsushita, S., (1975). Specific interactions of linoleic acid hydroperoxides and their secondary degradation products with enzyme proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 23: 150-154.
- Matthäus, B., Haase, N., U., Vosmann, K., (2004). Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 106: 793-801.
- May, J., Schimp, J., Wehrauch, J., Kinsella, J. E., (1978). Lipids of fish fillets: changes following cooking by different methods. *J. Food Sci.*, 43: 1669–1674.
- Mensink, R.P., and Katan, M.B., (1990). Effect of dietary trans fatty acids on high density and low-density lipoprotein cholesterol level in healthy subjects. *New Eng. J. Med.*, 323(7): 439-445.
- Moreira, R. G., Sun, X., Chen, Y., (1997). Factors affecting oil uptake in tortilla chips in deep-fat frying. *J. Food Eng.*, 31: 485–498.
- Moreira, R., Palau, J., Sun X., (1995). Simultaneous heat and mass transfer during the deep fat frying of tortilla chips. *J. Food Proc. Eng.*, 18: 307.
- Morton, I. D., Chidley, J. E., (1988). Methods and equipment in frying. In: *Frying of food. Principles, Changes and New Approaches*. Eds. Varela, G., Bender, A. E., Morton, I. D., Ellis Horwood, Chichester (England), pp. 37–51.
- Mottram, D. S., Wedzicha, B. L., Dodson, A. T., (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419: 448–449.
- National Food Administration Sweden, (2002): <http://192.71.90.8/engakrylanalysresultat.htm>. Anonymous.
- Neff, W. E., Warner, K., Byrdwell, W. C., (2000). Odor significance of undesirable degradation compounds in heated triolein and trilinolein. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77: 1303-1313.
- Nemoto, S., Takatsuki, S., Sasaki, K., Maitani, T., (2002). Determination of acrylamide in foods by GC/MS using ¹³C-labeled acrylamide as an internal standard. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 43: 371–376.
- NTP, (1989). NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of N-Methylolacrylamide (CAS No. 924-42-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.*, 352: 1-204.

- Ono, H., Chuda, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Yada, H., Ishizaka, M., Kobayashi, H., Yoshida, M., (2003). Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods. *Food Additives and Contaminants*, 20: 215–220.
- Paul, S., and Mittal, G. S., (1997). Regulating the use of degraded oil/fat in deep fat/oil food frying. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37: 635-662.
- Paulsson, B., Granath, F., Grawe, J., Ehrenberg, L., Tornqvist, M., (2001). The multiplicative model for cancer risk assessment: applicability to acrylamide. *Carcinogenesis*, 22: 817-819.
- Paulsson, B., Grawe, J., Tornqvist, M., (2002) Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment. *Mutat. Res.*, 516: 101-111.
- Paulsson, B., Kotova, N., Grawe, J., Henderson, A., Granath, F., Golding, B., Tornqvist, M., (2003). Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide. *Mutat. Res.*, 535: 15-24.
- Pedersen, J. R., Olsson, J. O., (2003). Soxhlet extraction of acrylamide from potato chips. *Analyst*, 128: 332–334.
- Pedreschi, F., Aguilera, J. M., Arbildua, J. J., (1999). CLSM study of oil location in fried potato slices. *Microsc. Microanal.*, 39: 21–22.
- Pedreschi, F., Kaark, K., Granby, K., (2004b). Reduction of acrylamide formation in potato slices during frying. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 37: 679-685.
- Pedreschi, F., Moyano, P., Kaark, K., Granby, K., (2004a). Color changes and acrylamide formation in fried potato slices. *J. Food Res.* Article in press.
- Perez, H. L., Cheong, H. K., Yang, J. S., Osterman-Golkar, S., (1999). Simultaneous analysis of hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 274: 59-68.
- Pérez-Camino, M. C., Márquez-Ruiz, G., Ruiz-Méndez, M. V., Dobarganes, M. C., (1991). Lipid changes during the frying of frozen prefried foods. *J. Food Sci.*, 56: 1644–1647.
- Perkins, E. G., (1967). Formation of non-volatile decomposition products in heated fats and oils. *Food Tech.*, 21: 125.
- Pinthus, E. J., Weinberg, P., Saguy, I., (1995a). Oil uptake in deep-fat frying as affected by porosity. *J. Food Sci.*, 60: 767–769.
- Pinthus, E. J., Weinberg, P., Saguy, I., (1995b). Deep-fat fried potato product oil uptake as affected by crust physical properties. *J. Food Sci.*, 60: 770–772.
- Pokorný, J., (1980). Effect of browning reactions on the formation of flavour substances. *Nahrung*, 24: 115–127.
- Pokorný, J., (1989). Flavor Chemistry of deep fat frying in oil. In: *Flavor Chemistry of Lipid Foods*. Eds. Min, D. B., Smouse, T. H., American Oil Chemist's Society, Champaign, IL (USA), pp. 113-115.
- Pokorný, J., (1998). Substrate influence on the frying process. *Grasas y Aceites*, 49: 265–70.
- Pokorný, J., (1999). Changes in nutrients at frying temperatures. In: *Frying of Food*. Eds. Boskou D., Elmadfa I. CRC Press.
- Pozo Díaz, R. M., Masoud Musa, T. A., Pérez-Camino, M. C., Dobarganes, M. C., (1995). Intercambio lipídico durante la fritura de patatas prefritas congeladas en aceite de girasol alto oleico. *Grasas y Aceites*, 46 : 85–91.
- Pyle, D. L., and co-workers, (2004), personal communication, University of Reading, Reading (UK).
- Richardson, D. L., Davies, H. D., Ross, H. A., (1990). Potato tuber sugar content during development and storage. *Potato Res.*, 33: 241–245.
- Rojo, J., and Perkins, E., (1987). Cyclic fatty acid monomer formation in frying fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64: 414.
- Rosén, J., and Hellenäs, K. E., (2002). Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst*, 127: 880–882.
- Rydberg, P., Erikson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L., Törnqvist, M., (2003). Investigation of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 7012–7018.
- Rydberg, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L., Törnqvist, (2003). Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 7012-7018.
- Saguy, I. S., Gremaud, E., Gloria, H., Turesky, R. J., (1997). Distribution and quantification of oil uptake in French fries utilising a radio-labelled ¹⁴C palmitic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 4286–4289.
- Saguy, I. S., Pinthus, E. J., (1995). Oil uptake during deep-fat frying. *Food Technol.*, 49: 142–145.
- Sakamoto, J., Hashimoto, K., (1986). Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in miceeffects on fertility and sperm morphology. *Arch. Toxicol.* 59: 201-205.
- Sanchez-Muniz, F. J., Viejo, J. M., Medina, R., (1992). Deep-frying of sardines in different culinary fats. Changes in fatty acid composition of sardines and frying fats. *J. Agr. Food Chem.*, 40: 2252–2256.

- Sanders, T.A.B, (1989). Nutritional aspects of rancidity. In :Rancidity in foods. Second Edition. Eds. Allen, J. C., Hamilton, R. J., Elsevier Applied Science, New York.
- Schaller, U., (2003). Experiences with acrylamide determination – view from a retailer's laboratory. Presentation at the workshop 'Analytical Methods for Acrylamide Determination in Food', Oud-Turnhout, Belgium.
- Schettgen, T., Broding, H. C., Angerer, J., Drexler, H., (2002). Hemoglobin adducts of ethylene oxide, propylene oxide, acrylonitrile and acrylamides biomarkers in occupational and environmental medicine. *Toxicol. Lett.*, 134: 65-70.
- Schettgen, T., Weiss, T., Drexler, H., Angerer, J., (2003). A first approach to estimate the internal exposure to acrylamide in smoking and non-smoking adults from Germany. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 206: 9-14.
- Sébédio, J. L., Bonpunt, A., Grandgirard, A., Prevost, J., (1990). Deep fat frying of frozen prefried foods: Influence of the amount of linolenic acid in the frying medium. *J. Agr. Food Chem.*, 38: 1862–67.
- Sébédio, J. L., Dobarganes, M. C., Márquez, G., Wester, I., Christie, W.W., Dobson, G., Zwobada, F., Chardigny, J. M., Mairot, Th., Lahtinen, R., (1996). Industrial production of crisps and prefried french fries using sunflower oil. *Grasas y Aceites*, 47: 5–13.
- Sébédio, J. L., Ratnayake, W. M. N., Ackman, R. G., Prévost, J., (1993). Stability of polyunsaturated n-3 fatty acids during deep fat frying of Atlantic mackerel. *Food Res. Int.*, 26: 163–172.
- Selke, E., Rohwedder, W. K., Dutton, H. J., (1977). Volatile components from triolein heated in air. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54: 62.
- Selke, E., Rohwedder, W. K., Dutton, H. J., (1980). Volatile components from trilinolein in air. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 57: 25.
- Shelby, M. D., Cain, K. T., Cornett, C. V., Generoso, W. M., (1987). Acrylamide: induction of heritable translocations in male mice. *Environ. Mutagen.*, 9: 363-368.
- Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., Robert, M. C., Riediker, S., (2002). Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419: 449-450.
- Steiner, J., (1993). Current, future ways to measure trans. *Inform.* 4(4): 455-456.
- Stevenson, S. G., Vaisey-Genser, M., Eskin, N. A. M., (1984). Quality control in the use of deep frying oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61: 1102–1108.
- Stier, R. F., (1996). Quick tests for fats and oils. *Baking & Snack*, 18: 62–66.
- Surdyk, N., Rosén, J., Andersson, R., Åman, P., (2004). Effects of asparagine, fructose, and baking conditions on acrylamide content in yeast-leavened wheat bread. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 2047-2051.
- Swedish National Food Administration, (2002). Information about acrylamide in food [<http://www.slv.se/engdefault.asp>]
- Swiss Federal Office of Public Health, (2002). Determination of acrylamide in food [http://www.bag.admin.ch/verbrau/aktuell/d/AA_methode.pdf].
- Swiss Quality Testing Service (SQTS), (2003). Untersuchungsmethode zur Bestimmung von Acrylamid mit GC/MS. Standard Operation Procedure (SOP) received from SQTS (Doetikon: Switzerland).
- Takata, K., Okamoto, T., 1991, A method for determination of acrylamide in environmental samples by gas chromatography using bromination-dehydrobromination. *Kankyo Kagaku*, 1: 559–565.
- Takatsuki, S., Nemoto, S., Sasaki, K., Maitani, T., (2003). Determination of acrylamide in processed foods by LC/MS using column switching. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 44: 89–95.
- Takatsuki, S., Nemoto, S., Sasaki, K., Maitani, T., (2004). Production of acrylamide in agricultural products by cooking. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 45(1): 44-48.
- Takeoka, G., Perrina, C., Buttery, R., (1996). Volatile Constituents of Used Frying Oils. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44: 654-660.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson M., Törnqvist, S., (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 4998–5006.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Törnqvist, M., (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50: 4998–5006.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Törnqvist, M., (2000). Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chemical Research in Toxicology*, 13: 517–522.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Törnqvist, S., Eriksson M., (2000). Acrylamide – a cooking carcinogen? *Chem. Res. Toxicol.*, 13: 517–522.
- Tateo, E., and Bononi, M., (2003). A GC/MS method for the routine determination of acrylamide in food. *Italian Journal of Food Science*, 15: 149–151.
- Taubert, D., Harlfinger, S., Henkes, L., Berkels, R., Schöming, E., (2004). Influence of processing parameters on acrylamide formation during frying of potatoes. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 2735-2739.
- Thomson, L. U., Aust, R., (1983). Lipid changes in french fries and heated oils during commercial deep frying and their nutritional and toxicological implications. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 16: 246–53.

- Tornqvist, M., Ehrenberg, L., (2001). Estimation of cancer risk caused by environmental chemicals based on in vivo dose measurement. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 20: 263-271.
- Tung, Y.-H., Ko, J.-L., Yin, L., Pu, Y., Lin, P., (2001). Cooking oil fume-induced cytokine expression and oxidative stress in human lung epithelial cells. *Env. Res. Sc.*, 87: 47-54.
- Tyl, R. W., Friedman, M. A., (2003). Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reprod. Toxicol.*, 17: 1-13.
- Tyl, R. W., Marr, M. C., Myers, C. B., Ross, W. P., Friedman, M. A., (2000). Relationship between acrylamide reproductive and neurotoxicity in male rats. *Reprod. Toxicol.*, 14: 147-157.
- Ufheil, G., Escher, F., (1996). Dynamics of oil uptake during deep-fat frying of potato slices. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 29: 640-644.
- US Food and Drug Administration (FDA), (2003). Draft: Detection and quantitation of acrylamide in foods [http://vm.cfsan.fda.gov/_dms/acrylami.html].
- Varela, G., (1977). Les grasses chauffées: contribution a l'étude des processus de la friture des aliments. *Nutrit. Dieta*, 25: 112-119.
- Vattem, D. A., Shetty, K., (2003). Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* 4: 331-338.
- Velasco, J., Marmesat, S., Marquez-Ruiz, G., Dobarganes, M.C., (2004). Formation of short-chain glycerol-bound oxidation products and oxidised monomeric triacylglycerols during deep-frying and occurrence in used frying fats. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 106: 728-735.
- Viola, P., and Bianchi, A., (1988). Clinical aspects of the frying of foods In: *Frying of Food*, Eds. Valera, G., Bender, A. E., and Morton, I. D., Ellis Horwood Ltd., Chichester, England.
- Vitrac, O., Trystramb, G., Raoult-Wacka, A.-L., (2000). Deep-fat frying of food: heat and mass transfer, transformations and reactions inside the frying material. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 102: 529- 538.
- Waltking, A. E., Wessels, H., (1981). Chromatographic separation of polar and nonpolar components of frying fats. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64: 1329-1330.
- Warner, K., (2002). Chemistry of Frying Oils. In: *FOOD LIPIDS: chemistry, nutrition and biotechnology*. Eds. Akoh, C.C., Min, D.B., Marcel Dekker, New York (USA), pp. 205-221.
- Warner, K., Neff, W. E., Byrdwell, W. C., Gardner, H. W., (2001). Effect of oleic and linoleic acids in the production of deep fried odor in heated triolein and trilinolein. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 899-905.
- Weißhaar, R., Gutsche, B., (2002). Formation of acrylamide in heated potato products – model experiments pointing to asparagines as precursor. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.*, 98: 397-400.
- Wenzl, T., Beatriz de la Calle, M., Anklam, E., (2003). Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review. *Food Addit. Contam.*, 20: 885-902.
- Wessels, H., (1983). Determination of polar compounds in frying fats. *Pure Appl. Chem.*, 55: 1381.
- WHO, (1985). Acrylamide. Environmental Health Criteria 49 (Geneva: World Health Organisation).
- WHO, (1996). Guidelines for Drinking-Water Quality, 2nd edn (Geneva: World Health Organisation), vol. 2: 940-949.
- Wiertz-Eggert-Jörissen (WEJ) GmbH, (2003). Standard operation procedure for the determination of acrylamide in baby food. Standard Operation Procedure (SOP) WEJ GmbH (Hamburg: Germany).
- Williams, J., S., E., (2004). Influence of variety and processing conditions on acrylamide levels in fried potato crisps. *J. Food Chemistry*. Article in press.
- Wise, L. D., Gordon, L. R., Soper, K. A., Duchai, D. M., Morissey, R. E., (1995). Developmental neurotoxicity evaluation of acrylamide in Sprague-Dawley rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 17: 189-198.
- Wu, S.-C., and Yen, G. C., (2004). Effects of cooking oil fumes on the genotoxicity and oxidative stress in human lung carcinoma (A-549) cells. *Toxicology in vitro*, In press.
- Yasahura, A., Tanaka, Y., Hengel, M., Shibamoto, T., (2003). Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model system. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 3999-4003.
- Yaylayan, V. A., Wnorowski, A., Perez Locas, C., (2003). Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 1753-1757.
- Zenick, H., Hope, E., Smith, M. K., (1986). Reproductive toxicity associated with acrylamide treatment in male and female mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, 17: 457-472.
- Zyzak, D. V., (2002). Acrylamide formation mechanism in heated food. JIFSAN/NCFST Acrylamide in Food Workshop. http://www.jifsan.umd.edu/Acrylamide/acrylamide_workshop.html.
- Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A., Rizzi, G. P., Villagran, M. D., (2003). Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 4782-4787.
- Ανδρικόπουλος, Ν., Κ., (1999). Φυσικοχημεία και βιοχημεία τροφίμων, Τόμος II, Εργαστηριακές Ασκήσεις, Αθήνα, Καλλιθέα, σελ. 33-36.
- Δημόπουλος, Κ., Α., και Ανδρικόπουλος, Ν., Κ., (1996). Διατροφή. Εκδόσεις Μπιστικά, Αθήνα, σελ. 244-251.

Μπόσκου, Γ., 2005. Επαγγελματική μαγειρική. Σημειώσεις του μαθήματος Οργάνωση και Διαχείριση Μονάδων Διατροφής. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Μάρτιος, 2005. σελ. 57-70.
Μπόσκου, Δ., (1997). Χημεία Τροφίμων, Εκδόσεις Γαρταγάνη, σελ. 79-84.

Διευθύνσεις στο διαδίκτυο σχετικές με το ακρυλαμίδιο:

http://europa.eu.int/comm/food/fs/sfp/fcr/acrylamide/acryl_database_en.html
<http://www.acrylamide-food.org>
<http://www.cordis.lu/euroabstracts/en>
http://www.fao.org/es/ESN/jecfa/acrylamide_en.stm
<http://www.foodrisk.org/acrylamide.cfm>
<http://www.ifst.org/acrylmd.html>
<http://www.irmm.jrc.be/ffu/acrylamidemonitoringdatabase-statusDecember04.xls>
<http://www.who.int/foodsafety/en.html>
<http://www.who.int/topics/acrylamide/en/index>