

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**FARMACEUTSKI FAKULTET**

**Veselin M. Delević**

**ISPITIVANJE UTICAJA TERMIČKOG  
TRETMANA NA NASTAJANJE AKRILAMIDA U  
NAMIRNICAMA SA VISOKIM SADRŽAJEM  
SKROBA PRIMENOM UNAPREĐENE METODE  
GASNE HROMATOGRAFIJE**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2015**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**

**FACULTY OF PHARMACY**

**Veselin M. Delević**

**STUDY OF THE EFFECT OF HEAT TREATMENT  
ON THE FORMATION OF ACRYLAMIDE IN  
FOODS WITH HIGH STARCH CONTENT USING  
IMPROVED METHOD OF GAS  
CHROMATOGRAPHY**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2015**

**MENTOR:**

**Dr sc. Ivan Stanković, redovni profesor**

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**Dr sc. Brižita Đorđević, vanredni profesor**

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

**Dr sc. Biljana Stojanović, vanredni profesor**

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

**Dr sc. Refik Zejnilović, redovni profesor**

Farmaceutski fakultet, Univerzitet Crne Gore, Podgorica

---

***„Znanje nije dovoljno. Moramo ga primijeniti!***

***Volja nije dovoljna. Moramo to i uraditi!“***

***Goethe***

*Veliku zahvalnost dugujem profesorima: Dr Ivanu Stankoviću, Dr Brižiti Đorđević, Dr Biljani Stojanović, Dr Refiku Zejniloviću.*

*Dr Ivanu Stankoviću zahvaljujem na upornosti, stručnom vođenju, povjerenju i podršci koju mi je nesebično pružao tokom pripreme i izrade ovog rada.*

*Posebnu zahvalnost dugujem i Dr Brižiti Đorđević i Dr Biljani Stojanović koje su bezrezervno podijelile svoje znanje i dale stručan doprinos u konačnom oblikovanju rada.*

*Zahvalnost dugujem i koleginicama i kolegama iz Instituta za javno zdravlje u Podgorici kao i kolegama iz službe Zdravstveno-Sanitarne inspekcije koji su svojim entuzijazmom i zalaganjem postali neodvojiv dio ovog istraživanja.*

*Na posletku, ovaj rad posvećujem svojoj porodici: supruzi Oliveri i našoj djeci Emiliji i Mitru, jer su umjeli da me čekaju i sve vrijeme vjerovali u mene.*

## **Ispitivanje uticaja termičkog tretmana na nastajanje akrilamida u namirnicama sa visokim sadržajem skroba primenom unaprijedene metode gasne hromatografije**

### **Sažetak**

Akrilamid je mala, bezbojna ili bijela hidrofилna supstanca, specifičnog mirisa, klasifikovan kao potencijalni karcinogen od strane međunarodne Agencije za istraživanje kancera (eng. *International Agency for Research on Cancer, IRAC*). Prvi put su 2002. godine publikovani podaci da je akrilamid nalazi u nizu termički tretiranih namirnica koje su bogate ugljenim hidratima i kao i da akrilamid u njima nastaje *Maillard*-ovom reakcijom između aminokiseline asparagina i redukujućih šećera.

Nakon ovih događaja zajednički FAO/WHO ekspertski komitet za aditive za hranu (eng. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA*) započeo je sveobuhvatnu evaluaciju podataka iz mnogih zemalja, uglavnom iz Evrope i Sjeverne Amerike, o prisustvu akrilamida u namirnicama.

Termički tretman hrane dovodi do formiranja toksičnih i potencijalno kancerogenih jedinjenja kojima pripada i akrilamid. Akrilamid se nalazi u različitim vrstama prehrambenih proizvoda kao na primjer: proizvodi od žitarica, proizvodi od krompira, kafa i dr. Među proizvodima bogatim skrobom najveći izvor akrilamida su proizvodi od krompira: čips i pomfrit kao i razne vrste peciva i hleba. Glavni mehanizam nastajanja akrilamida u namirnicama je reakcija slobodne amino kiseline asparagina sa redukujućim šećerima *Maillard*-ovom reakcijom. Termički tretman je od ključnog značaja za sintezu akrilamida, odnosno kombinacija temperature i vremena zagrijavanja kojima se namirnica podvrgava. Formiranje akrilamida se prvenstveno odvija pod dejstvom visokih temperatura većih od 120° C pri smanjenoj vlažnosti.

U ovom radu vršeno je praćenje uticaja različitih termičkih tretmana (kuvanje, pečenje i prženje) na sintezu akrilamida kod namirnica bogatih škrobom, primenom unapređene metode za kvantifikaciju akrilamida u namirnicama pomoću gasne hromatografije sa NPD (azot-fosforom detektorom) koju je moguće primijeniti u većini bromatoloških laboratorija, jer je metoda tačna, jednostavna i ekonomična, pa je zbog toga veoma pogodna za praktičnu primjenu.

Razvijena je i derivatizaciona metoda za kvantifikaciju akrilamida u namirnicama metodom gasne hromatografije u tandemu sa masenom spektrometrijom, kao i metoda za pripremu uzoraka različitih namirnica za kvantifikaciju akrilamida upotrebom smanjene količine broma.

Takođe, u fazi pripreme uzorka primijenjena je metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi (eng. *Solid Phase Extraction* – SPE) čime je postupak značajno pojednostavljen i veoma je prihvatljiv za praktičnu primjenu. GC-MS metoda je validirana sa limitom detekcije 6,86 µg/kg čime je potvrđena i njena osjetljivost. Metoda je uspješno primijenjena za ispitivanje sadržaja akrilamida u različitim uzorcima termički tretiranih namirnica kao što su krompir, čips, hljeb i dr. i primijenjena je u međulaboratorijskom ispitivanju, gdje je dobijena prihvatljiva srednja vrijednost z-skora -0.3..

**Ključne riječi:** akrilamid, termički tretirane namirnice, ekstrakcija na čvrstoj fazi, GC-MS metoda, GC-NPD metoda, optimizacija bromovanja.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Hemija hrane i dijetetskih proizvoda

UDK broj: 664.2:[661.717.53:543.544.3] (043.3)

## **Study of the effect of heat treatment on the formation of acrylamide in foods with high starch content using improved method of gas chromatography**

### **Abstract**

Acrylamide is colorless or white hydrophilic substance, with specific odor, classified as a potential carcinogen by the International Agency for Research on Cancer, IARC. In 2002, data were published that the acrylamide is present in a series of heat-treated foods which are rich in carbohydrates, and that the acrylamide is formed in the Maillard reaction between amino acid asparagine and reducing sugars.

After these events Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) has started a comprehensive review of data on the occurrence of acrylamide in foods from many countries, mainly from Europe and North America.

Heat treatment of food leads to the formation of toxic and potentially carcinogenic compounds to which acrylamide belongs. Acrylamide is found in various types of food products such as: cereal products, potato products, coffee and others. Among other products rich in starch, the utmost source of acrylamide were potato products: chips and French fries, as well as various kinds of pastry and bread. The main mechanism of the formation of acrylamide in foods is the reaction of free amino acids asparagine with reducing sugars in the Maillard reaction. Heat treatment is essential for the synthesis of acrylamide, respectively a combination of temperature and heating time which food undergoes. The formation primarily takes place under the influence of high temperatures greater than 120° C at low humidity.

In this research, the impact of different thermal treatments (cooking, baking and frying) on the synthesis of acrylamide in foods rich in starch was assessed, using the improved method for the quantification of acrylamide in foods by gas chromatography with NPD (Nitrogen-phosphorus detector) that can be applied in the most bromatological laboratories. The method is accurate, simple, economical, and is therefore very suitable for practical use.

Improved derivatization method for the quantification of acrylamide in foods using gas chromatography coupled to mass spectrometry was also developed, as well as the methods for the preparation of samples of different foods to quantify acrylamide using reduced amounts of bromine.

Also, the solid phase extraction (SPE) method was applied in preparation of the sample, which significantly simplified the procedure and it is acceptable for practical use. GC-MS method was validated with a limit of detection of 6.86 mg / kg, which confirmed its sensitivity. The method has been successfully applied to examine the content of acrylamide in a variety of samples, such as potato chips, bread etc. and it has been applied in the interlaboratory study, where the acceptable middle value of z-score -0.3 was obtained.

**Key words:** acrylamide, heat-treated foods, solid phase extraction, GC-MS method, GC-NPD method, optimization of bromination.

Scientific field: Pharmacy

Scientific topic: Chemistry of food and dietary products

UDK number: 664.2:[661.717.53:543.544.3] (043.3)



## LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

<b>AA</b>	Akrilamid
<b>3-APA</b>	3- aminopropion amid
<b>CEN</b>	European Committee for Standardisation – Evropski komitet za standardizaciju
<b>DG SANCO</b>	Directorate General for Health and Consumer Protection - Generalni direktorat za zdravlje i zaštitu potročaša EU
<b>DNK</b>	Dezoksiribonukleinska kisjelina
<b>EC</b>	European countries – Evropske zemlje
<b>EFSA</b>	European food safety authority - Evropska agencija za bezbjednost hrane
<b>ESI</b>	Elektrosprej jonizacija
<b>ETT</b>	Ekstrakcija tečnost-tečnost
<b>EU</b>	Evropska unija
<b>FA</b>	Food associations – Evropska udruženja proizvođača hrane
<b>FAPAS</b>	Food Analysis Performance Assessment Scheme
<b>HCCP</b>	Hazard Analysis and Critical Control Points
<b>HEATOX</b>	Heat-generated food toxicants, identification, characterisation and risk minimisation
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer – Međunarodna agencija za istraživanje raka
<b>JECFA</b>	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – zajednički ekspertski komitet Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih Nacija (FAO) i Svetske zdravstvene organizacije (WHO) za aditive za hranu
<b>JRC</b>	Joint Research Centre
<b>LC-MS</b>	Tečno masena spektrometrija
<b>MS/MS</b>	Tandem masena spektrometrija
<b>NOAEL</b>	No Observed Adverse Effect Level – najmanja količina koja ne pokazuje štetan

efekat

**NPD** Azot fosforni detektor

**SIM** Selected Ion Monitoring – monitoring selektovanog jona

**SNFA** Swedish National Food Administration – Švedska nacionalna administracija za hranu

**SPE** Solid Phase Exstaction – ekstrakcija na čvrstoj fazi

**SPME** Solid Phase Micro Exstaction – mikroekstrakcija na čvrstoj fazik

## Sadržaj

1	Uvod .....	1
2	Opšti dio.....	7
2.1	Termički tretman namirnica .....	8
2.2	Hemija akrilamida.....	10
2.3	Akrilamid u namirnicama.....	12
2.4	Metabolizam i toksikologija akrilamida.....	15
2.6	Faktori koji uslovljavaju sintezu akrilamida u namirnicama.....	22
2.6.1	Ugljeni hidrati .....	22
2.6.2	Masti.....	22
2.6.3	Proteini.....	22
2.6.4	Voda .....	23
2.7	Uticaj matriksa, skladištenja i pripreme na sadržaj u namirnicama.....	24
2.7.1	Uticaj matriksa i skladištenja .....	24
2.7.2	Uticaj pripreme namirnica .....	25
2.8	Ekstrakcija na čvrstoj fazi - <i>Solid - Phase</i> ekstrakcija (SPE) .....	28
2.8.1	Selektivnost i kapacitet SPE .....	32
2.9	Pregled analitičkih metoda za određivanje akrilamida.....	36
2.10	Zakonska regulativa .....	38
3	Cilj istraživanja.....	41
4	Eksperimentalni dio.....	43
4.1	Termički tretman namirnica bogatih škrobom.....	44
4.2	Priprema uzoraka i kvantifikacija akrilamida metodom gasne hromatografije u tandemu sa masenom spektrometrijom (GC-MS) .....	45
4.2.1	Aparatura i reagensi.....	45
4.2.2	Priprema rastvora .....	45
4.2.3	Postupak pripreme uzoraka.....	45
4.2.4	Validacija GC-MS metode za određivanje akrilamida u namirnicama .....	47
4.2.5	Postupak GC – MS analize .....	48
4.2.6	Statistička analiza.....	49
4.3	Priprema uzoraka i kvantifikacija akrilamida metodom gasne hromatografije sa fosforim detektorom (NPD) .....	51

4.3.1	Aparatura i reagensi.....	51
4.3.2	Priprema rastvora .....	51
4.3.3	Postupak pripreme uzoraka.....	51
4.3.4	Validacija GC-NPD metode za određivanje akrilamida u namirnicama .....	52
4.3.5	Postupak GC-NPD analize.....	52
5	Rezultati i diskusija.....	54
5.1	Kvantifikacija akrilamida metodom gasne hromatografije u tandemu sa masenom spektrometrijom (GC-MS).....	55
5.2	Kvantifikacija akrilamida metodom gasne hromatografije sa azot-sosforomnim detektorom (GC-NPD) 69	
6	Zaključak.....	76
7	Literatura.....	80

# **1 Uvod**

Otkriće akrilamida u hrani datira od 1997. godine kada je utvrđeno da radnici na izgradnji železničkog tunela u jugozapadnoj Švedskoj imaju visok nivo akrilamida u krvi (0,07 – 17,7 nanomol/g hemoglobina). Ova koncentracija akrilamida u krvi radnika je premašila najveću dozu ili nivo izloženosti pri kojoj se ne javljaju štetni efekti po zdravlje (eng. NOAEL - *No Observed Adverse Effect Level*) [1]. Ovi rezultati su podstakli dalja istraživanja budući da je akrilamid klasifikovan kao potencijalno kancerogena supstanca od strane međunarodne Agencije za istraživanje kancera (eng. *International Agency for Research on Cancer, IARC*) i definisan je kao jedinjenje sa potencijalom da izazove spektar toksičnih efekata [2, 3]. Istraga o porijeklu akrilamida u krvi radnika pokazala je da nije moguće utvrditi korelaciju između profesionalne izloženosti i koncentracije akrilamida u krvi radnika. To je dovelo do pretpostavke da bi hrana koju su konzumirali radnici mogla biti izvor akrilamida u njihovoj krvi [4, 5].

Uradu publikovanom 2000. godine prikazano je da pacovi hranjeni hranom koja je termički tretirana prženjem pokazuju desetostruki porast sadržaja akrilamida u hemoglobinu u poređenju sa kontrolnom grupom. Sadržaj akrilamida u prženoj hrani u korelaciji je sa povećanjem nivoa akrilamida u hemoglobinu pacova hranjenih sa tom hranom [6]. U 2002 godini ista istraživačka grupa je publikovala podatke da se akrilamid nalazi u nizu termički tretiranih namirnica koje su bogate ugljenim hidratima i da akrilamid u njima nastaje Maillard-ovom reakcijom između amino kiseline asparagina i redukujućih šećera.

Nakon ovih događaja zajednički FAO/WHO ekspertski komitet za aditive hrane (eng. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA*) započeo je sveobuhvatan evaluaciju podataka o pojavi akrilamida u namirnicama iz mnogih zemalja uglavnom iz Evrope i Sjeverne Amerike i istaklo je važnost dobijanja što više validnih podataka o sadržaju akrilamida u namirnicama koje se konzumiraju u zemljama u razvoju kao vrijedan instrument u za procenu unosa, kako bi se redukovala izloženost ljudi [7].

Za kvantifikaciju akrilamida u namirnicama poslednjih godina se preporučuju metode hromatografije spregnute sa detektorima odgovarajuće osetljivosti. Pod hromatografijom se podrazumeva skup metoda koje omogućavaju istovremenu analizu smeše analita koji mogu biti struktorno slični, ili potpuno različite hemijske strukture. podrazumijevalo samo razdvajanje uzorka-smeše na njene sastavne komponente, ali je uvođenje najsavremenijih tipova detektora

proširilo osnovno značenje hromatografije. Danas hromatografske metode služe ne samo za pročišćavanje složenih uzoraka, već i za delimičnu analizu razdvojenih komponenti smeše.

Naziv hromatografija potiče od grčke riječi *hromos* – što znači boja i *graphein* – pisati. Sam pojam hromatografija datira još od početka 20. vijeka, kada je ruski naučnik Cveti proučavao zeleni alkoholni ekstrakt iz lista [8]. On usmjerava svoju pažnju na mogućnost adsorpcionog upijanja hlorofila od strane tkiva lista. Cveti je razdvojio hlorofil na dve komponente poznate kao hlorofil A i B na taj način što je u staklenoj cijevi (koloni) napunjenoj čvrstim nosačem (kalcijum-karbonatom) na vrh kolone stavio alkoholni ekstrakt hlorofila, a zatim lagano ispirao kolonu petrol-etrom i tako započeo spiranje hlorofila. Prilikom ispiranja, pojedine komponente biljnog ekstrakta kretale su se kroz kolonu različitom brzinom i međusobno se razdvojile u obojene trake ili zone. Pokazalo se da je apsorpcija dva hlorofila različita u odnosu na čvrst nosač, tako da su se izdvojila dva sloja - dva hlorofila A i B. Pošto su razdvojene komponente bile obojene, Cveti je ovu metodu nazvao hromatografija. Takođe, opisuje i obrazlaže detaljno metodu kojoj daje naziv hromatografska analiza: „Slično sunčevim zracima u spektru različitih komponenti složenog obojivača raspoređuju se zakonomerno jedan preko drugog na stubu upijača i postaju dostupni za kvalitativno i kvantitativno određivanje.“ Cveti pravilno ocenjuje značaj metoda odvajanja i analize ne samo obojenih, već i bezbojnih materija. Trebalo je da prođe dosta vremena da bi se shvatili značaj i mogućnosti otkrivene metode odvajanja.

Krajem tridesetih godina prošlog vijeka razvijena je tankoslojna hromatografija, a 1941. godine Marin i Synge dobili su Nobelovu nagradu za radove iz oblasti hromatografije. Njihov fundamentalni rad postavio je osnove za razvoj gasne, tečne i papirne hromatografije. Prvi rad iz gasne hromatografije publikovan je 1952. godine (Martin i James), a zatim je ova metoda razvijena u veoma moćnu analitičku tehniku. Tečna hromatografija se razvila šezdesetih godina prošlog veka, da bi danas prevazišla ranije otkrivenu gasnu hromatografiju.

Princip hromatografskog razdvajanja smeše zasniva se na razlikama u raspodjeli pojedinih komponenata smeše između pokretne i nepokretne faze. Sama raspodjela posledica je raznih fizičko-hemijskih procesa kao što su adsorpcija, desorpcija, apsorpcija, podjela između dva rastvarača i jonska izmena. Prema agregatnom stanju pokretne faze, hromatografija se deli na gasnu i tečnu hromatografiju.

Hromatografski sistemi i tehnike kao fizičko-hemijski procesi na kojima se zasniva razdvajanje dati su u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Hromatografski sistemi i tehnike

<b>Pokretna faza</b>	<b>Stacionarna faza</b>	<b>Tehnike</b>	<b>Fizičko-hemijski procesi</b>
Gasna	Čvrsta	Hromatografija gasne faze u koloni i kapilarnoj koloni	Adsorpcija
Gasna	Tečna	Hromatografija gasne faze u koloni i kapilarnoj koloni	Podjela, reverzno-fazna podjela
Tečna	Čvrsta	Kolona, hromatografija na tankom sloju i na hartiji	Adsorpcija, jonska izmjena, gel filtracija
Tečna	Tečna	Kolona, hromatografija na tankom sloju i na hartiji	Podjela, reverzno-fazna podjela

U zavisnosti od prirode supstance zavisi i koji će se sistem primijeniti za razdvajanje smeše što je prikazano je u tabeli 2.

**Tabela 2.** Vrsta hromatografije za razdvajanje smeše

<b>Razdvajanje supstanci</b>	<b>Vrsta hromatografije</b>
Gasovi i isparljive supstance	Hromatografija u gasnoj fazi
Supstance sličnog hemijskog sastava	Podeona hromatografija i reverzno-fazna podeona hromatografija
Supstance različitog hemijskog sastava	Adsorpciona hromatografija
Neorganske i jonske supstance	Jonska izmena, hromatografija na tankom sloju i na hartiji
Jonske i nejonske supstance	Jonska izmena i gel hromatografija
Biološki materijali i jedinjenja velike molekulske mase	Gel hromatografija

Princip gasno hromatografske metode analize zasniva se na prolasku uzorka kroz kolonu u kojoj se vrši razdvajanje uzorka na komponente u zavisnosti od njihovih fizičkih i hemijskih osobina. Identifikacija komponenata smeše vrši se na osnovu retencionog vremena, odnosno



vremena zadržavanja svake komponente na stacionarnoj fazi. Svaka supstanca ima svoje karakteristično vrijeme zadržavanja na odgovarajućoj koloni. Na kraju kolone nalazi se detektor koji registruje odvojene komponente uzorka prevodeći ih u električni signal i prikazuje ih u vidu hromatograma. U gasno hromatografskoj analizi koriste se različite vrste detektora [9]. Najširu upotrebu imaju plameno jonizacioni (*Flame Ionization. Detector* - FID) i azot-fosforni detektor (*Nitrogen Phosphorus Detector* - NPD). Oba ova detektora imaju širok opseg primjene na različitim organskim jedinjenjima, u širokoj oblasti koncentracije. Kao detektor često se koristi maseni spektrometar. On ima široku oblast primjene, a njime se mogu detektovati analiti u opsegu koncentracija od 0,25 – 100 pg [10]. Masena spektrometrija je tehnika koja se često primjenjuje kako za rutinske tako i u istraživačke svrhe. Najvažnija primjena ove tehnike je za određivanje molekulske mase uzorka. Masena spektrometrija se primjenjuje u izučavanju kompleksnih vrsta u rastvoru. Jedina je tehnika koja daje eksperimentalnu potvrdu broja i identifikaciju vrsta u rastvoru (specijaciona analiza).

Zbog navedenih prednosti, u ovoj disertaciji masena spektrometrija je korišćena za određivanje sadržaja akrilamida u uzorcima namirnica bogatih skrobom.

Masena spektrometrija je veoma osjetljiva analitička metoda koja se zasniva na pretvaranju ispitivanog uzorka u jonski snop i razdvajanju tog snopa u sastavne komponente na bazi njihovih odnosa mase i naelektrisanja ( $m/e$ ). Masena spektrometrija se zasniva na tome da se analizirani uzorak (organsko jedinjenje) prevodi u stanje jonizovanog gasa (termalnom metodom, primjenom električnog polja ili bombardovanjem ubrzanim elektronima, jonima ili fotonima pri čemu nastaje snop jednakih energija), različitog odnosa mase i naelektrisanja. Kretanjem naelektrisanih čestica tj. jona u električnom ili magnetnom polju polazni snop jona se razlaže na osnovu razlike količnika mase i naelektrisanja jona  $m/z$ . Formirani joni mogu biti jednostruko jonizovani atomi, klasteri, molekuli ili njihovi fragmenti. Nastali joni se provode kroz analizator, koji razdvaja jone u prostoru i/ili vremenu. Iz analizatora, joni idu na detektor gdje formiraju električni signal koji se registruje na računaru.

Kvalitativna i kvantitativna analiza vrše se na osnovu vrijednosti  $m/z$  i relativne zastupljenosti vrsta.

Da bi jedinjenje bilo analizirano u masenom spektrometru mora biti naelektrisano. Međutim, većina organskih molekula je neutralna pa ih je potrebno jonizovati u izvoru. Osnovni deo masenog spektrometra je jonizacioni izvor koji obezbeđuje naelektrisane čestice tj. jone, ubrzava ih i šalje u sledeći deo koji obezbeđuje naelektrisane čestice, jone, analizator. Analizator vrši selekciju, tj. razdvajanje jona u zavisnosti od njihovog odnosa mase i naelektrisanja  $m/z$ . Razdvojeni joni se detektuju i signal se beleži u bazi podataka radi dalje analize. Važan dio spektrometra je sistem za odražavanje niskog pritiska  $10^{-2} - 10^{-5}$  Pa tj. sistem za visoki vakuum. Visoki vakuum obezbeđuje minimalnu verovatnoću molekulske reakcije jona tj. omogućava jonima da sa jednog kraja instrumenta dođu na drugi kraj, a da ne dođe do sudara tih jona sa drugim molekulima i do njihove neutralizacije, rasejanja, ili reakcije fragmentacije. Osnovne funkcije masenog spektrometra su: jonizacija reprezentativnog dela molekula iz uzorka, razdvajanje jona prema njihovoj masi ili prema odnosu mase i naelektrisanja  $m/z$  i merenje relativne zastupljenosti (prinos jona u % na određenoj masi, tj. na  $m/z$ ).

Prikupljanje podataka i snimanje masenih spektara može se vršiti jednom od dve metode: SCAN – podrazumeva snimanje kompletnog masenog spektra i SIM – u kome se prate samo odabrani joni. SCAN tehnika podrazumeva skeniranje mase u zadatom opsegu unosa, uz istovremeno praćenje retencionog vremena, čime se omogućava identifikacija analita. Zadati maseni opseg i brzina skeniranja hromatograma određuju vreme praćenja određene mase (*dwell time*). SIM tehnika se koristi u kvantitativnim određivanjima [11]. Pre njene upotrebe, da bi se postigli optimalni uslovi, mora se izvesti analiza SCAN metodom. SIM tehnikom se detektuju vrednosti  $m/z$  samo reprezentativnih jona posmatranog molekula. Vrijeme praćenja jona je veće pa se samim tim povećava i osetljivost čak od 100 do 1000 puta. Karakteristični joni, vrijeme početka snimanja (*start time*) i vrijeme praćenja jona (*dwell time*) biraju se na osnovu podataka dobijenih pomoću SCAN tehnike. Hromatogram se dobija kao zavisnost ukupne jonske struje sabrane tokom analize od vremena, a daje podatke o kvalitetu (retenciono vrijeme) i kvantitetu (površina pika) posmatrane komponente [12].

## **2 Opšti dio**

## 2.1 Termički tretman namirnica

Ako se preradom namirnica definišu svi tretmani namirnica od početka proizvodnje do konzumiranja, može se zaključiti da se 95% namirnica na neki način prerađuje.

Tretman namirnica uključuje svaki postupak koji mijenja ili pretvara sirov biljni ili životinjski materijal u sigurnu, jestivu i senzorno prihvatljivu namirnicu. Različite pojave koje se odigravaju za vrijeme pripreme, prerade i čuvanja hrane su veoma složene, usled hemijske heterogenosti namirnica i kompleksnih reakcija koje rezultuju iz interakcija osnovnih nutrimenata. Bez prerade hrane bilo bi nemoguće zadovoljiti nutritivne potrebe urbanog stanovništva, a izbor namirnica bi bio ograničen i sezonski uslovljen. Razvojem društva potrebe savremenog čovjeka se mijenjaju i pojavljuju se zahtjevi za specifičnim namirnicama kao što su pripremljene namirnice za konzumiranje, polupripremljene namirnice, funkcionalne namirnice itd.

Teorijski posmatrano, sve namirnice se podvrgavaju nekakvom tretmanu. Osobinu da sebi priprema hranu koristeći različite postupke prerade čovjek je stekao evolucijom i ona ga čini različitim od životinjskog svijeta. Prvobitno korišćeni postupci u tretiranju namirnica su bili malobrojni i primitivni, a razvojem civilizacije oni se usložnjavaju i postaju mnogobrojniji.

Najstariji tradicionalni tretmani su dimljenje, sušenje na suncu, usoljavanje. Fermentisanje i smrzavanje su odavno uobičajeni tretmani. Konzervisanje, pasterizacija i sterilizacija se decenijama primjenjuju i još uvijek su značajne tehnike savremene prehrambene industrije. Novi trendovi za dobijanjem manje tretirane hrane se ogledaju u primjeni tzv. netermičkih tretmana odnosno minimalnih tehnika procesuiranja.

Uopšteno govoreći, termički tretman hrane je uglavnom veoma koristan, rezultuje povećanom digestivnošću hrane, uništenjem antagonista vitamina i enzima i prisutnih mikroorganizama. Termički tretman hrane dovodi do formiranja proizvoda koji utiču na ukus, aromu, fiziološki aktivna jedinjenja, kao i na smanjenje nutritivne vrijednosti namirnica, ali i do formiranja toksičnih i potencijalno kancerogenih jedinjenja kojima pripada i akrilamid.

Termički tretman namirnica izaziva promjene na svim sastojcima hrane u različitom stepenu. Pored dobro poznatih, ali i dalje aktuelnih interakcija osnovnih sastojaka hrane

(Maillard-ova reakcija), u novije vrijeme predmet interesovanja je i odnos termičkog tretmana i biološki aktivnih jedinjenja.

## 2.2 Hemija akrilamida

Akrilamid je mala, bezbojna ili bijela hidrofилna supstanca, specifičnog mirisa (Tabela 3). Rastvorljiv je u brojnim polarnim rastvaračima kao što su aceton, acetonitril, voda i dr. [13].

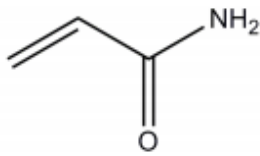
**Tabela 3.** Fizičke karakteristike akrilamida

Parametar	Specifikacija
Hemijska formula	$C_3H_5NO$
Molekulska masa	71,08 g/mol
Tačka topljenja	84 – 85°C
Rastvorljivost	216g / 100 g vode na 30 °C
Tačka topljenja	125 °C na 3,34 kPa
Pritisak pare	0,007 mm Hg na 20°C
Specifična težina	1,1222 kg/dm <sup>3</sup> na 30 °C

Akrilamid (Slika 1) posjeduje dvije funkcionalne grupe, amidnu grupu i elektron-deficitarnu vinil dvostruku vezu koja omogućava širok spektar reakcija uključujući i nukleofilne reakcije koje su od značaja u biološkim sistemima. Amidna grupa omogućava hidrolizu, dehidraciju i kondenzaciju sa aldehidima, dok vinilna dvostruka veza reaguje sa amonijakom, alifatičnim aminima, fosforom, hlorom, bromom, bisulfitima, ditiokarbamatima, kao i sa proteinima [14, 15].

Akrilamid formira polimere i dimere koji imaju široke spektre aplikacija uglavnom u poljoprivredi i industriji. On je biorazgradivo jedinjenje koje se koristi za prečišćavanje vode za piće, kao flokulant [16, 17]. Stabilnost akrilamida i njegova reaktivnost sa nukleofilima porijeklom iz namirnica na određenim temperaturama je proučavana od strane Adamsa i saradnika [18], koji su prikazali da je akrilamid stabilan u vodenim rastvorima, a da su vrsta pufera i pH vrijednost imali značajan uticaj na smanjenje slobodnog akrilamida. Prisustvo amino

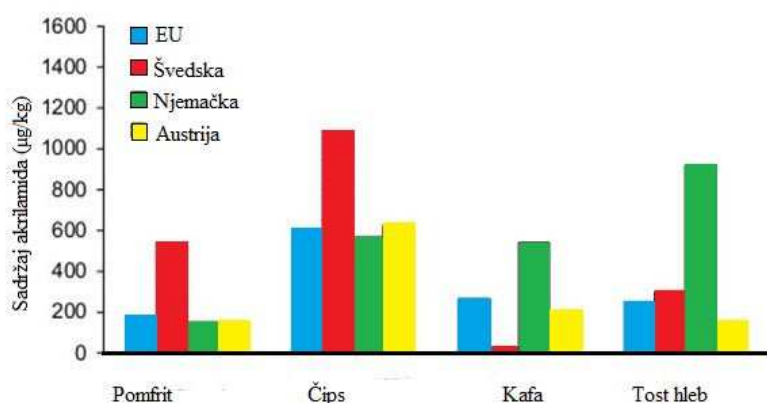
kisjelina u bočnom lancu nukleofila značajno je smanjilo nivo slobodnog akrilamida. Najveću reaktivnost akrilamid je imao sa cisteinom, pri čemu nastaje mono-adicioni proizvod cistein-S- $\beta$ -propanamid kao proizvod adicije. Ostale aminokisjeline poput lizina, arginina i serina su imale manju reaktivnost, ali su dale proizvode kondenzacije koji su se mogli porediti.



**Slika 1.** Hemijska struktura molekule akrilamida

## 2.3 Akrilamid u namirnicama

Akrilamid se nalazi u različitim vrstama prehrambenih proizvoda, kao na primjer: proizvodi od žitarica, proizvodi od krompira, kafa i dr. (Tabela 4). Među proizvodima bogatim skrobom najveći izvor akrilamida su proizvodi od krompira: čips i pomfrit kao i razne vrste peciva i hljeba [19]. Prikazani su na Slici 2.



**Slika 2.** Sadržaj akrilamida u prehrambenim proizvodima u nekim Evropskim zemljama [19].

Doprinos svakog pojedinačnog proizvoda na unos akrilamida u organizam varira od zemlje do zemlje, zavisno od navika u ishrani i mnogih drugih faktora (Slika 2). Kafa i kakao proizvodi pripadaju proizvodima sa visokim sadržajem akrilamida, dok su mliječni proizvodi, riba i morski plodovi namirnice sa najmanjim sadržajem akrilamida.

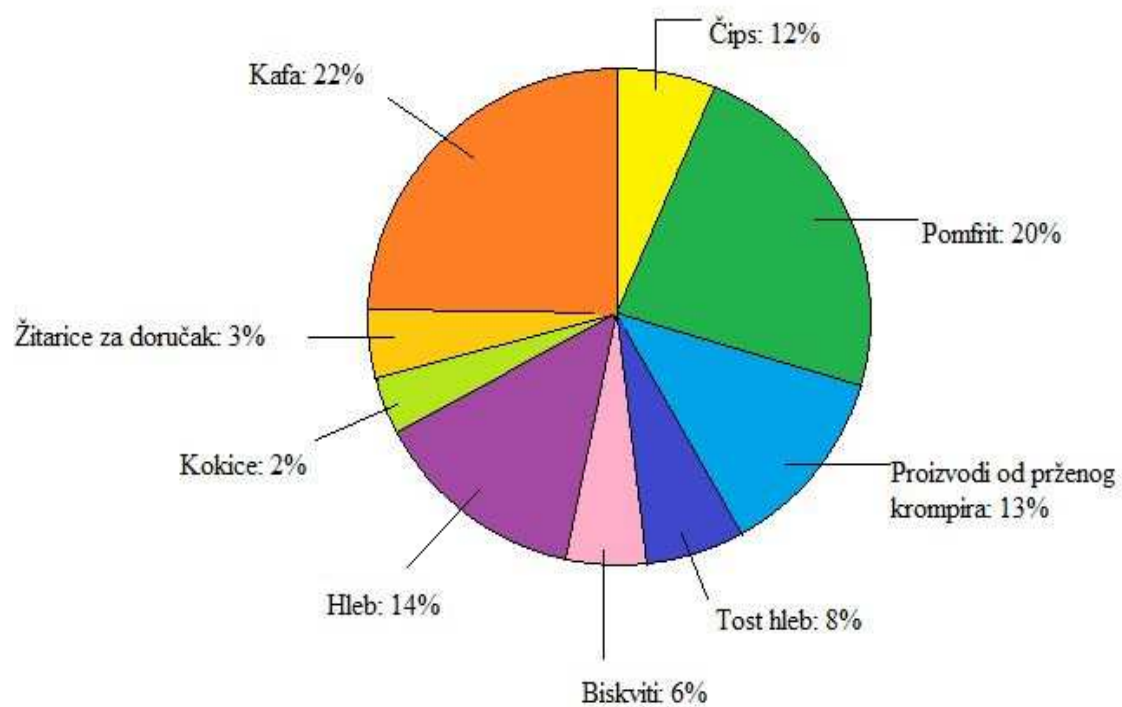
Sadržaj akrilamida u različitim namirnicama pokazuje širok spektar varijacija, pa shodno tome stopa prosječne izloženosti akrilamidu razlikuje se ne samo među zemljama, već i među starosnim grupama. Na primer, u Holandiji djeca i tinejdžeri imaju veću stopu izloženosti akrilamidu. Literaturni podaci prikazuju na osnovu analiza majčinog mlijeka i infant formula da je unos akrilamida kod odojčadi u prvoj godini života u Švedskoj u rasponu od 0,04 – 1,2 µg/kg tjelesne mase na dan [20]. U Nemačkoj doprinos unosu akrilamida od 18%-46% potiče od konzumiranja hljeba [21]. U Švedskoj glavni izvor akrilamida su proizvodi od krompira, zatim kafa i hljeb, Slika 3 [22].



**Tabela 4.** Sadržaj akrilamida u različitim grupama namirnica izvor: EFSA Journal 2012 [19]

Vrsta namirnice	Broj uzoraka	Srednja vrijednost konc. A.A (µg/kg)	CV (%)
Žitarice i proizvodi od žitarica (ukupno)	11327	366	151
Hljeb i peciva	5145	446	130
Keks	4980	350	162
Žitarice za doručak	1130	96	131
Pica	85	33	270
Riba i morski plodovi	107	25	180
Meso i iznutrice	325	19	174
Mlijeko i mliječni proizvodi	147	5.8	119
Koštichavo voće i sjemenke	203	84	233
Proizvodi od krompira (ukupno)	10077	477	108
Pečeni krompir			
Krompirov čips	99	169	150
Pomfrit	3555	752	73
	6309	334	128
Kafa i čaj	1455	509	120
Kafa (kuvana)	93	13	100
Kafa (sirova, pečena)	709	288	51
Kafa bez kofeina	34	688	169
Ekstrakti kafe	119	1100	93
Zamjena za kafu	368	845	90
Zeleni čaj (pečen)	101	306	69
Proizvodi od kakaoa	23	220	111
Šećeri i med	113	24	87
Povrće	193	17	206
Preradjeno i sušeno voće	49	131	125
Alkoholna pića	99	6.6	147
Infant formula	117	<5	82
Hrana za bebe (u prahu)	24	16	73
Hrana za bebe(keks itd)	32	181	106

Ekspertski komitet za aditive za hranu (eng. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA*) u svom izveštaju je identifikovala i procijenila da je prosječan unos akrilamida u rasponu od 0,3 – 2,0 µg/kg tjelesne mase na dan, sa srednjom vrijednosti od 1,0 µg/kg tjelesne mase na dan za opštu populaciju, kao i unos u rasponu od 0,6 – 5,51 µg/kg tjelesne mase na dan sa srednjom vrijednošću od 4,0 µg/kg tjelesne mase na dan za potrošače na većem nivou izloženosti [23].



**Slika 3.** Procenat doprinosa različitih namirnica unosu akrilamida u Švedskoj. Srednja vrijednost unosa po glavi stanovnika je procijenjena na 26  $\mu\text{g}/\text{dan}$  [22].

## 2.4 Metabolizam i toksikologija akrilamida

Akrilamid se zbog svoje male molekulske mase brzo i lako apsorbira u crijevima, a zatim se pomoću krvi distribuira po organizmu. U ćelijama se uz citohrome P 450 biotransformira u glicidamid (Slika 4), koji potom djeluje genotoksično [24]. Kako se akrilamid osim u namirnicama i vodi za piće, nalazi i u duvanskom dimu, pušači imaju veći nivo izloženosti akrilamidu nego nepušači [25-28]. Ispitivanjima akrilamida Ames-ovim testom mutagenosti, dokazano je da on nema mutageno djelovanje, dok je dodatkom metaboličkih enzima i njegovom transformacijom u glicinamid došlo do pozitivnog rezultata na mutagenost. U ogledima sa eksperimentalnim životinjama akrilamid u molekuli DNK razmjenjuje adenine sa guaninom i guanine sa citozinom, prouzrokujući maligne promjene na štitnoj žlijezdi, testisima, mliječnim žlijezdama, plućima i mozgu.

Toksičnost koja je dokazana kod eksperimentalnih životinja može se ekstrapolirati i na ljude, iako epidemiološke studije nijesu pokazale korelaciju između povećanog unosa termički tretiranih namirnica i učestalosti malignih bolesti. Upkos tome, akrilamid je ostao na listi potencijalno kancerogenih jedinjenja za čovjeka, dok se ne sprovedu detaljne studije i dokaže obrnuto. Zbog toga, količina akrilamida u namirnicama treba da bude što je moguće niža, pogotovo u hrani najosjetljivijeg dijela populacije kao što su djeca i osobe sklone unosu velikih količina pržene hrane.

## 2.5 Nastajanje akrilamida

Glavni mehanizam nastajanja akrilamida u namirnicama je reakcija slobodne amino kisjeline asparagina sa redukujućim šećerima *Maillard*-ovom reakcijom. Nastajanje akrilamida može se odvijati sledećim mehanizmima:

- Kondenzacijom asparagina i glukoze, pri čemu na početku *Maillard*-ove reakcije nastaje N-glikozilasparagin koji se smatra prekursorom nastanka akrilamida.
- Strecker-ova reakcija asparagina i nastajanje Strecker-ovog aldehida.
- Dekarboksilacija asparagina pri čemu nastaje 3-aminopropionamid, koji tokom zagrijavanja prelazi u akrilamid (Slika 4).
- Reakcioni mehanizam koji uključuje akrolein i akrilnu kiselinu smatra se vrlo verovatnim.

Nastajanje akrilamida u termički tretiranim namirnicama po *Maillard*-ovoj reakciji objasnili su Stadler i sar. [29] i Mottram i sar. [30] tokom 2002. godine. Ove rezultate su potvrdili Becalski i sar. [31]. Mottram i sar. su pokazali da akrilamid nastaje na temperaturama iznad 100° C u prisustvu aminokisjeline asparagina. Osim ovog načina nastanka akrilamida, oni su prikazali i mogući put nastanka akrilamida iz akroleina i akrilne kisjeline (slika 5.). Po Stadleru i sar. reakcija između redukujućih šećera asparagina na početku *Maillard*-ove reakcije je mogući put nastanka akrilamida. Yaylayan i sar. [32] smatraju da akrilamid nastaje iz N-glikozilasparagina koji nastaje na početku *Maillard*-ove reakcije.

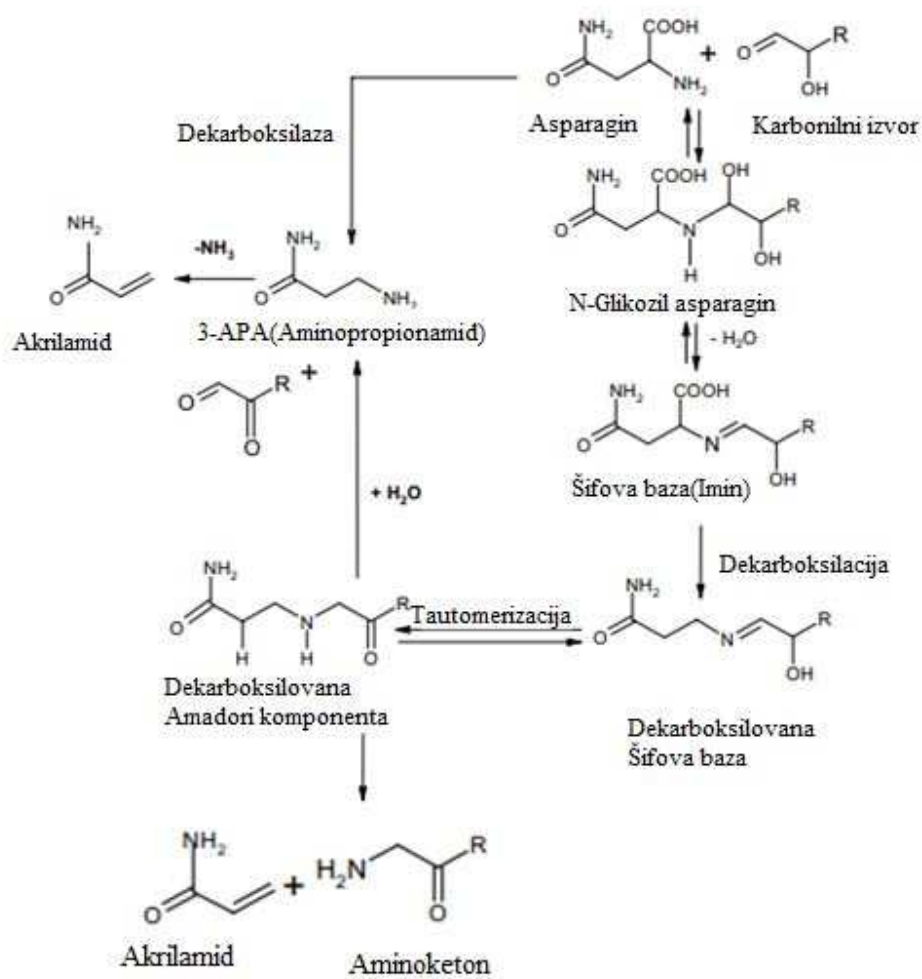
U Tabeli 5 dat je prikaz predloženih mehanizama nastajanja akrilamida.

**Tabela 5.** Predloženi mehanizmi formiranja akrilamida

Predloženi intermedijeri i/ili putevi nastanka	Referenca
Dekarboksilacija Šifove baze	<i>Yaylayan i sar.</i> 2003. [32] <i>Zyzak i sar.</i> 2003. [33] <i>Stadler i sar.</i> 2004. [45]
Dekarboksilovani Amadori proizvodi	<i>Yaylayan i sar.</i> 2003. [32] <i>Stadler i sar.</i> 2004. [32]
3 – APA	<i>Granvogl i sar.</i> 2004. [34] <i>Zyzak i sar.</i> 2003[33]
Akrilna kisjelina i amonijak (NH <sub>3</sub> iz termičke degradacije amino kisjelina)	<i>Stadler i sar.</i> 2004. [32]
Akrolein – asparagin Akrolein + NH <sub>3</sub> Akrilna kisjelina + NH <sub>3</sub>	<i>Yasuhara i sar.</i> 2003. [35]

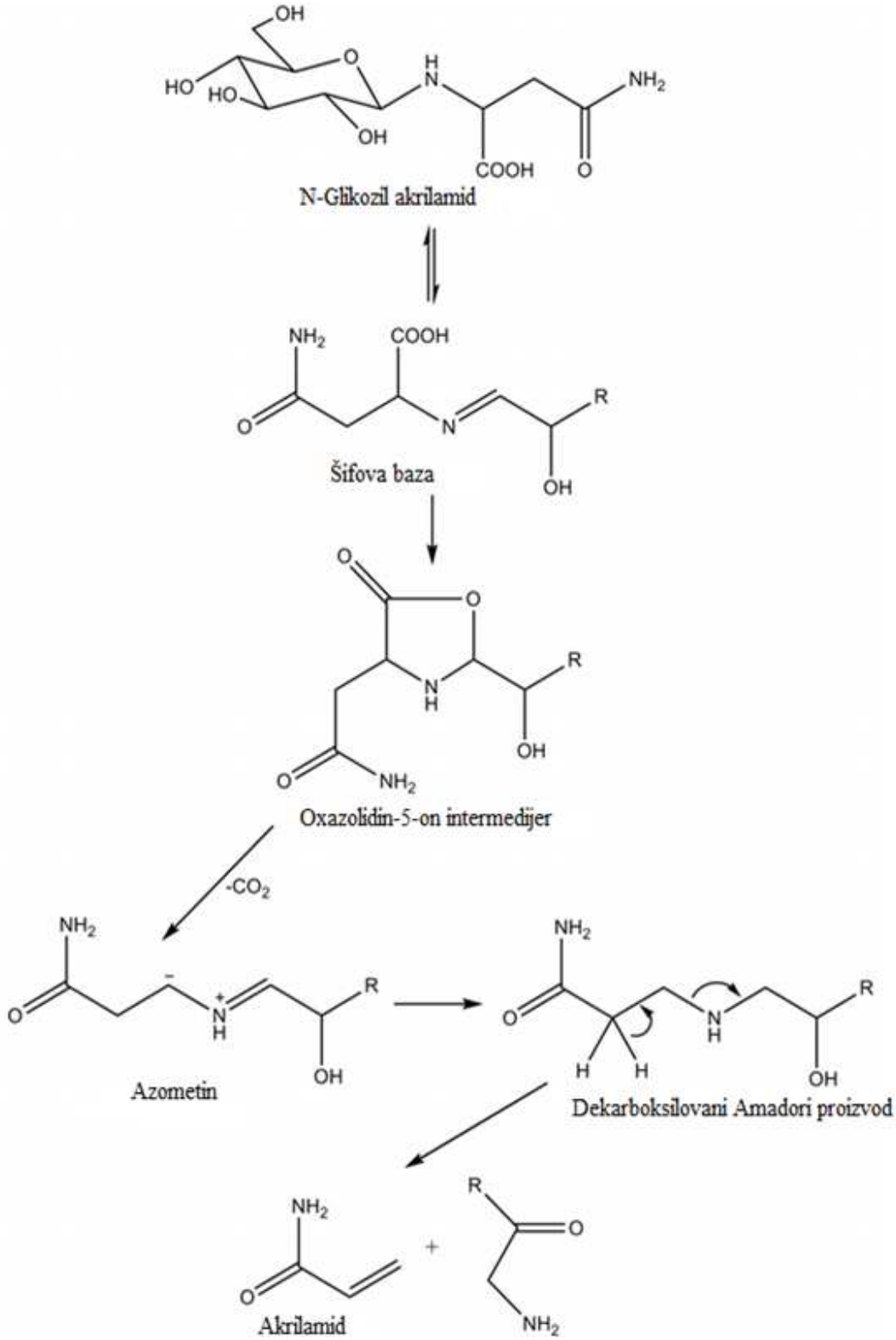
Intramolekulska ciklizacija i naknadna dekarboksilacija dovode do nastanka Amadori proizvoda koji oslobađaju akrilamid na povišenim temperaturama (Slika 6). *Zizak i sar.* [33] potvrđuju da dekarboksilacija nije apsolutno neophodan korak za formiranje akrilamida već da asparagin reaguje sa karbonilnom grupom *Schiff*-ove baze na visokim temperaturama i da nastaje 3-aminopropionamid koji se razlaže na amonijak i akrilamid (Slika 7). Prema tome, molekul 3-aminopropionamida se smatra prekursorom nastanka akrilamida u termički tretiranim namirnicama. Međutim, *Granvogl i sar.* [34] su ispitali mogućnost dekarboksilacije i deaminacije asparagina pomoću toplote koristeći sir gaudu kao primer za namirnicu sa niskim sadržajem 3-aminopropionamida i visokim sadržajem asparagina i bez prisustva redukujućih šećera došlo je do nastanka akrilamida.

Mogućnost nastanka akrilamida iz akroleina i akrilne kiseline prikazao je *Yashura i sar.* [35]. Po njima akrolein nastaje tokom degradacije lipida, a da amonijak u namirnicama nastaje deaminacijom aminokiselina ili *Strecker*-ovom degradacijom. Oni su predložili put nastanka akrilamida tako što akrolein oksidiše akrilnu kiselinu i potom reaguje sa amonijakom stvarajući akrilamid.



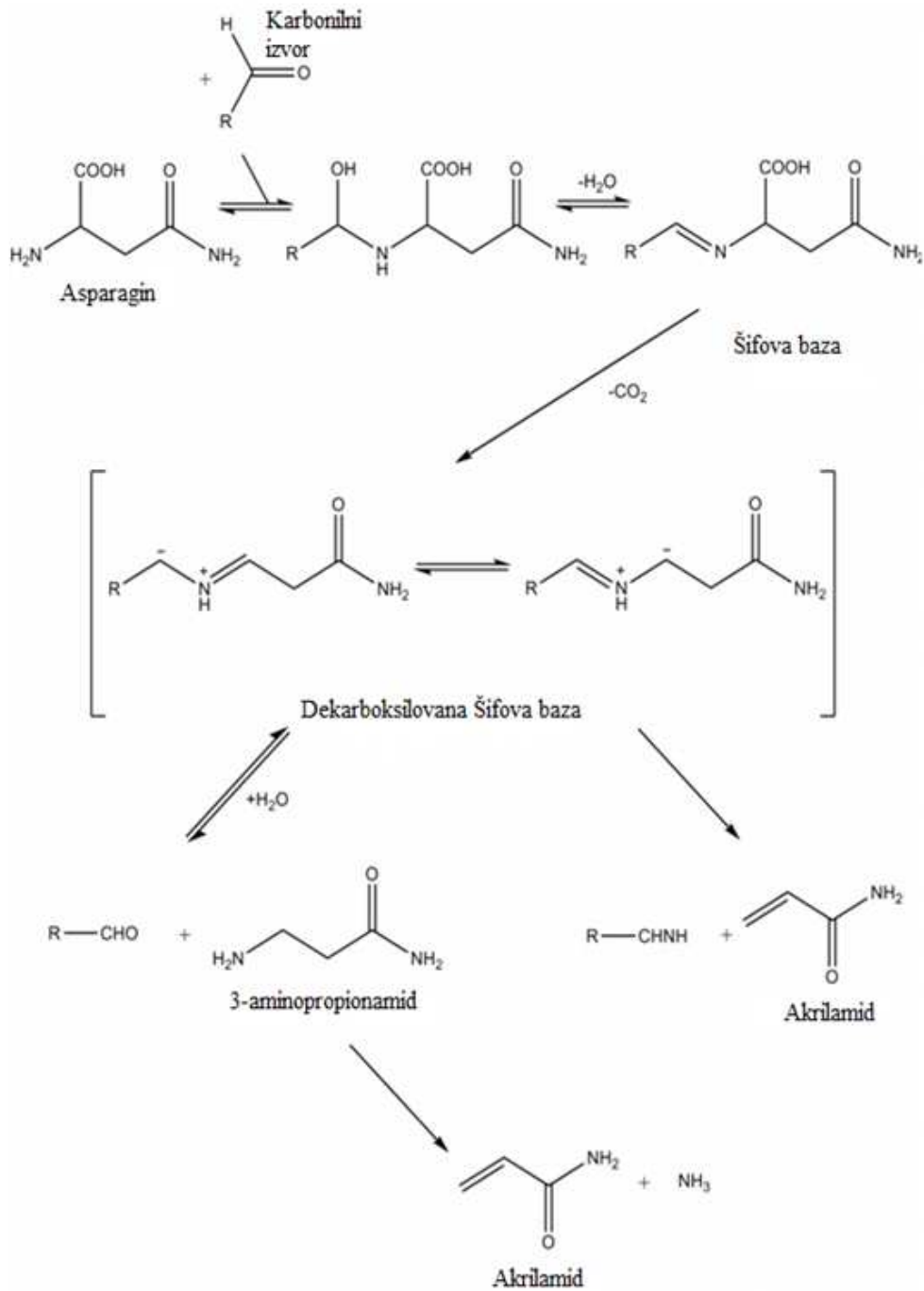
**Slika 4.** Mogući načini formiranja akrilamida iz asparagina







**Slika 6.** Reakcije nastanka akrilamida iz N-glikozilaspargina koje su predložili *Yaylayan* i sar. 2003.



**Slika 7.** Reakcije nastanka akrilamida nakon reakcije asparagina sa karbonilnom grupom *Schiff*-ove baze koje su predložili *Zyzak* i sar. 2003.

## **2.6 Faktori koji uslovljavaju sintezu akrilamida u namirnicama**

Da bi razjasnili mehanizam nastanka akrilamida u namirnicama istraživači koriste model-namirnice kako bi pojasnili uticaj osnovnih sastojaka hrane na sintezu akrilamida. U tom cilju različiti autori su koristili namirnice pripremljene u industriji kao i one pripremljene u domaćinstvu. Ne postoji jasna linija razgraničenja između tretmana namirnica koji se primenjuju u industriji i onih koji se primenjuju u domaćinstvu. U suštini se radi o istim postupcima, pa se oni mogu razmatrati zajedno.

### **2.6.1 Ugljeni hidrati**

Pomoću eksperimenta kojeg su prikazali Biedermann i sar. fruktoza povećava prinos akrilamida u odnosu na glukozu [36]. *Pollien* i sar. [37] su objasnili da fruktoza povećava prinos akrilamida za 50 % više od glukoze. Učešće saharoze u sintezi akrilamida je uslovljeno hidrolizom ovog neredukujućeg disaharida kao preduslov za naknadnu reakciju njenih komponenti glukoze i fruktoze [32].

### **2.6.2 Masti**

Moguća uloga masti u sintezi akrilamida se i danas intenzivno ispituje. Prije svega, najveće koncentracije akrilamida u namirnicama se generalno stvaraju tokom termičke obrade prženjem. Naknadne studije su se bazirale na pitanja kako dodavanje ulja namirnicama dovodi do povećanog formiranja akrilamida, kao i kako utiču različite vrste ulja na sintezu akrilamida u namirnicama. Ove studije dale su kontradiktorne rezultate, tako je priprema namirnica u različitim vrstama ulja rezultirala povećanim prinosom [31, 38], dok studije [36], nijesu pokazale uticaj upotrebe različitih vrsta ulja na prinos akrilamida u namirnicama. Iz ovih razloga ova studija isključuje mogućnost nastajanja akrilamida iz akroleina kao tipičnog oksidacionog proizvoda lipida. Usporedna ispitivanja sa uljima porijeklom od različitih biljaka [39] pokazala su da vrsta ulja nije imala značajan uticaj na prinos akrilamida u namirnicama pripremanim u takvim uljima.

### **2.6.3 Proteini**

Literaturni podaci [31, 40] generalno, u namirnicama bogatim proteinima kao što je meso i proizvodi od mesa prikazuju da se u njima detektuju veoma male količine akrilamida kao i

veoma male količine slobodnog asparagina. Svakako, reakcije između akrilamida i tipičnih komponenti mesa su moguće [36].

Becalski i saradnici [31] u svojim istraživanjima su prikazali da dodavanje asparagina i cisteina krompirovom skrobu dovodi do manjeg prinosa akrilamida u odnosu na dodavanje samo asparagina. Veza formirana između akrilamida i SH-grupa može se smatrati mogućim razlogom za ovaj efekat. Sposobnost amino kisjelina da formiraju akrilamid već je razmatrana u studijama koje se odnose na mehanizme nastajanja akrilamida. Od svih amino kisjelina, jedino metionin nije dao prinose akrilamida nakon zagrijavanja sa redukujućim šećerima.

#### 2.6.4 Voda

Kako se akrilamid dominantno stvara tokom *Maillard*-ove reakcije, sadržaj vlage u matriksu je veoma važan faktor. Uticaj vode na nastajanje akrilamida prikazali su *Elmor* i saradnici [41] na eksperimentima izvedenim na tijestu za proizvodnju hljeba koje je sadržalo različite količine vode. Oni su prikazali da se tokom termičke obrade tijesta sadržaj vode opada, dok sadržaj akrilamida se povećava i došli su do zaključka da nizak nivo vode u matriksu povećava prinos akrilamida u namirnici. Međutim, neki autori među kojima i *Mestdagh* i saradnici [42], dobili su kontradiktorne rezultate i došli su do zaključka da nizak nivo vode u matriksu smanjuje prinos akrilamida u namirnici. Rezultati *Elmor*-a i saradnika [41] su objašnjeni toplotom koja djeluje na tijesto, kao prvo, unutrašnja temperatura tijesta rijetko prelazi 100°C i voda na toj temperaturi ne isparava i ne stvara se značajna količina akrilamida. Samo intenzivno zagrijavanje i isparavanje vode dovodi do povećanog prinosa akrilamida.

## 2.7 Uticaj matriksa, skladištenja i pripreme na sadržaj u namirnicama

Ubrzo nakon prvog izveštaja od strane Švedske nacionalne administracije za hranu – SNFA (*Swedish National Food Administration*), u aprilu 2002. godine o visokom sadržaju akrilamida u pojedinim prehranbenim proizvodima pokrenut je veliki broj istraživačkih aktivnosti između kojih i o mehanizmu sinteze akrilamida, efektima pripreme namirnica i o mogućih efektima skladištenja, na sintezu akrilamida u namirnicama. Tokom mnogih procesa priprema namirnica, Maillard-ova reakcija je dominantan hemijski proces koji formira boju, ukus i teksturu termički tretirane hrane na osnovu visoko složenih reakcija amino kisjelina i ugljenih hidrata. U ovim procesima, termički tretman je od ključnog značaja za sintezu akrilamida, odnosno kombinacija temperature i vremena zagrijavanja kojima se namirnica podvrgava. Formiranje se prvenstveno odvija pod dejstvom visokih temperatura većih od 120° C i smanjenoj vlažnosti. Stoga, se akrilamid generalno ne detektuje u povišenim količinama u namirnicama pripremljenim na temperaturama manjim od 120° C. Tokom poslednjih godina brojne istraživačke aktivnosti prikazane u literaturi [43, 44] su sprovedene kako bi prikazale uticaj više faktora na nivo akrilamida u namirnicama.

### 2.7.1 Uticaj matriksa i skladištenja

Rani rezultati o pojavi akrilamida u namirnicama pokazuju značajne koncentracije u namirnicama bogatim ugljenim hidratima naročito skrobom, kao što su krompirov čips i pomfrit. Stadler i saradnici, Vinci i saradnici i Bethke i saradnici [45, 46, 47] su sumirali značajne rezultate različitih istraživačkih studija koji mogu smanjiti nivo akrilamida u namirnicama.

Kao osnova tih istraživanja došlo se do zaključka da su asparagin i redukujući šećeri važan preduslov za formiranje akrilamida, kao i da je relativna redukcija koncentracije akrilamida moguća kroz kontrolu nivoa redukujućeg šećera u krompirovim kulturama [48]. Pored izbora adekvatne sorte, takođe, adekvatni skladištni uslovi su veoma važni. U ovom kontekstu, dokazano je da skladištenje na temperaturi ispod 8° C će dovesti do koncentrovanja ugljenih hidrata u krtoli krompira [49]. Powers i saradnici [50] su pokazali na oko 40000 uzoraka svježe isječenog krompirovog čipsa iz 20 Evropskih zemalja da su efekti skladištenja krompira

na nivo sinteze akrilamida evidentni su značajno većim koncentracijama akrilamida u prvih 6 mjeseci u odnosu na drugu polovinu godine. *Kumar* i saradnici [51] su u svom radu prikazali da osim temperature skladištenja i atmosfera također može imati uticaja na sadržaj šećera u krompiru, prethodno nizak nivo kiselonika smanjuje akumulaciju šećera, dok povećanje ugljen dioksida ima suprotan efekat. *Halford* i saradnici [52] prikazali su efekte skladištenja devet sorti krompira na koncentracije asparagina i redukujućih šećera, pri čemu su došli do zaključka da je asparagin dominantna slobodna amino kiselina u krtoli krompira, i obično čini jednu trećinu slobodnih amino kiselina. U različitim sortama krompira gajenih u staklenicama, u saksijama koje sadrže vermikulit (filosilikatni mineral) koji dovodi do povećanja koncentracije slobodnog asparagina zbog nedostatka sumpora u vodi za zalivanje [53]. Uticaj đubrenja azotom i sumporom na koncentracije slobodnih amino kiselina i redukujućih šećera u krtolama krompira proučavali su *Muttucumaru* i saradnici [54] i došli su do zaključka da se dodavanjem sumpora smanjuje koncentracija glukoze u krtoli krompira.

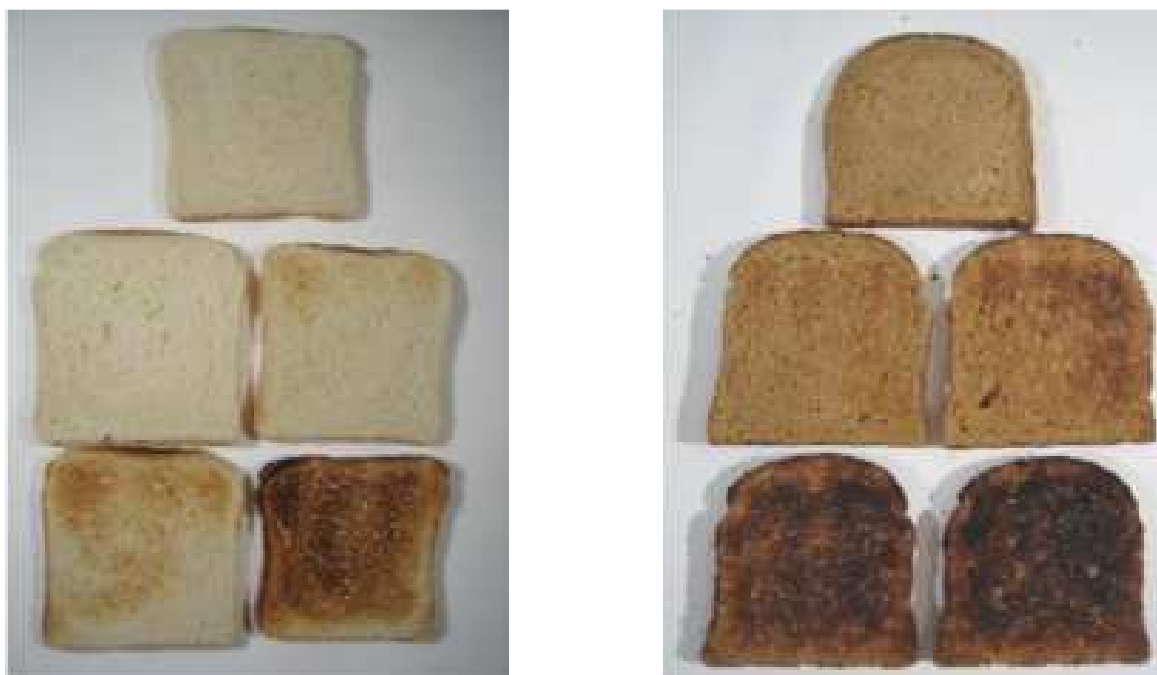
### **2.7.2 Uticaj pripreme namirnica**

U literaturi je prikazan veliki broj istraživanja o uticaju različitih parametara na formiranje akrilamida u termički tretiranoj hrani, kao što su: vrsta ulja za prženje, broj upotreba ulja kao i dodavanje aditiva [45, 55, 56]. Međutim, važan determinacioni faktor za sintezu akrilamida u namirnicama koje se podvrgavaju termičkom tretmanu je slobodan asparagin, koji pokazuje širok raspon koncentracija u namirnicama bogatim škrobom, kao i prisustvo redukujućih šećera. Dakle, postoji mogućnost da se smanji sadržaj slobodnog asparagina u sirovim namirnicama bogatim škrobom, prije termičkog tretmana, dodavanjem enzima asparaginaze koji hidrolizuje asparagin do asparaginske kiseline. Značajno smanjenje sinteze akrilamida u finalnim proizvodima koristeći takav način tretiranja sirovina je kod jednog broja proizvoda na bazi žita, također, i kod određenih proizvoda na bazi krompira [57]. U odnosu na preradu namirnica na bazi krompira, prerada žitarica i proizvodnja pekarskih proizvoda je složeniji postupak zbog različitih količina vode u proizvodu kao i tehnologije pečenja. Temperature na kojima se vrši termički tretman u kombinaciji sa sadržajem vode je također, važan faktor pri sintezi akrilamida. Na primjer, koncentracija akrilamida u tost hljebu može se

smanjiti optimizacijom ulazne i izlazne temperature u retni, pridržavajući se maksimalnog sadržaja vode u proizvodu na koncentraciju od 7%, kao i povećanjem vremena pečenja. Ovakvo smanjenje koncentracije akrilamida u pekarskim proizvodima se objašnjava činjenicom da prenos toplote tokom procesa pečenja na namirnicu nije toliko efikasan kao prilikom prženja namirnice u ulju.

Pekarski proizvodi kojima se dodaje amonijum-bikarbonat, kao uobičajeni pekarski „agens“ mogu sadržati visoke koncentracije akrilamida. U eksperimentalnim istraživanjima [58] prikazano je da amonijum-karbonat ili bikarbonat koji se koriste za narastanje tijesta, značajno povećavaju koncentraciju akrilamida, tako što povećavaju prinos akrilamida iz asparagina i smanjuju koncentraciju redukujućih šećera za deset puta. Ova istraživanja pokazala su da je formiranje akrilamida proporcionalno količini dodatog amonijum-bikarbonata, a njegovo uklanjanje iz pekarskih proizvoda rezultiralo je prisustvom akrilamida u tragovima. U preglednom radu [59], prikazan je uticaj sastojaka, aditiva i uslova pripreme na sintezu akrilamida u medenjacima, i da se značajna redukcija koncentracije akrilamida u njima može postići upotrebom natrijum-hidrogen karbonata kao pekarskog agensa, minimizirajući slobodni asparagin primjenom asparaginaze i izbjegavanjem produženog pečenja.

Kao dio HEATOX (eng. *Heat-generated food toxicants, identification, characterisation and risk minimisation*) projekta, sadržaj akrilamida u tost hljebovima (dva tost hljeba pripremljena od pšeničnog i dva tost hljeba pripremljena od pšeničnog i ražanog brašna) je proučavan u cilju određivanja sadržaja akrilamida u tost hljebu pripremljenom u kućnim uslovima. Komadi hljeba su pripremani u tosteru tokom četiri različita vremena pečenja od 1 do 4 minuta, pri čemu je došlo i do promjene boje tost hljeba koja se u početku nije mijenjala do stvaranja tamno-braon boje sa crnim djelovima, što ilustruje Slika 8. Sadržaj akrilamida prije pečenja su bili od 3 do 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u bijelom tost hljebu, dok je u ražanom tost hlebu sadržaj akrilamida bio od 29 do 42  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Sadržaj akrilamida za nivo srednjeg pečenja (vrijeme pečenja 3 minuta za bijeli i 2 minuta za ražani tost hljeb) bio je od 16 – 61  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [60-62]. Sadržaj akrilamida u tost hljebu tostiranom 4 minuta dio je u granicama od 31 do 118  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Autori su ovo objasnili činjenicom da se tamnijem tost hljebu dodaju glukoza i fruktoza pored saharoze, dok se u proizvodnji bijelog tost hljeba koristi samo saharoza.



**Slika 8.** Slika levo prikazuje tost hljeb napravljen od pšeničnog brašna, slika desno prikazuje tost hljeb napravljen od pšeničnog i ražanog brašna. Parče na vrhu nije tostirano, dok su sledeća parčad sa lijeva na desno tostirana tokom 1, 2, 3 i 4 minuta u običnom kućnom tosteru.

Pečenjem hljeba na srednjim temperaturama dolazi do sinteze malih do umjerenih koncentracija akrilamida  $< 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Hljeb napravljen od krompirovog brašna imao je znatno veću koncentraciju akrilamida nakon pečenja u odnosu na pečeni hljeb napravljen od pšeničnog, ražanog ili miješanog brašna. Na primjer, tost hljeb napravljen od krompirovog brašna imao je koncentraciju akrilamida od  $600 \mu\text{g}/\text{kg}$ , zbog većih koncentracija asparagina u odnosu na hljeb napravljen od drugih vrsta brašna [63].

U literaturi je prikazan pregledan rad u kojem tokom pečenja kafe dolazi do sinteze akrilamida, a sa povećanjem temperature pečenja smanjuje se njegova koncentracija [64, 65]. Akrilamid se formira na početku procesa pečenja, dostižući prividnu maksimalnu vrijednost, a zatim opada pred kraj procesa. Autori su zaključili da su vrijeme i stepen pečenja glavni faktori koji utiču na koncentraciju akrilamida u kafi.

## 2.8 Ekstrakcija na čvrstoj fazi - *Solid - Phase* ekstrakcija (SPE)

Čvrsto-tečna ekstrakcija (eng. *Solid Phase Extraction* – SPE) je jedna od najčešće korišćenih metoda za pripremu uzorka za hromatografsku analizu. Koristi se za pripremu različitih uzoraka kao što su uzorci biološkog materijala, životnih namirnica, nekih farmaceutskih oblika, itd. Na slici 9 dat je shematski prikaz kertridža, kao i vrsta uzoraka koji mogu biti analizirani odvim putem.



**Slika 9.** Izgled kolone (kertridža) za SPE

Prednosti SPE u poređenju sa klasičnim tečno-tečnim ekstrakcijama su upotreba male količine rastvarača, velika ušteda vremena i veliki potencijal automatizacije. Pored toga, postoje različite vrste kertridža (reverzno-fazni, normalno-fazni, jonoizmenjivački, itd) koji sa analitom mogu da ostvare različite vrste interakcija (hidrofobne, polarne, jonske...) pa se u skladu sa fizičko-hemijskih svojstvima analita mogu birati različiti kertridži. Uz to, ovaj tip pripreme uzorka daje mogućnost za optimizaciju postupka čime se značajno može poboljšati prinos i unaprediti sama metoda [75].

Za hromatografske analize velike osjetljivosti, osnovno je dobro pripremiti uzorak, jer to štiti interferentnih komponenti matriksa postiže se veća osjetljivost. Pripremanje



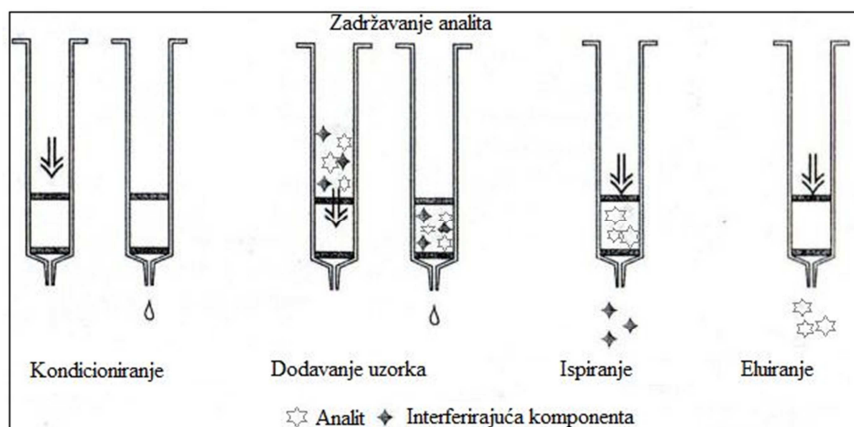
jednog specifičnog i selektivnog uzorka je stoga preduslov za jasne, ekonomične i osetljive analize.

Glavni ciljevi SPE-e su:

- uklanjanje interferentnih komponenti iz matriksa,
- koncentrisanje analita,
- izolacije analita.

Jedna od značajnih primjena SPE analiza ogleda se u koncentrisanju analita, što je posebno značajno u analizi tragova gde su koncentracije veoma niske i zahtevalo bi se dodatno opterećivanje.

Prilikom SPE nalize, analiti mogu biti ili adsorbovani na materijalu za SPE dok interferentne supstance prolaze kroz kolonu i obrnuto. Najčešće dolazi do dvije generalne procedure razdvajanja. Prvi slučaj je prikazan na Slici 10.

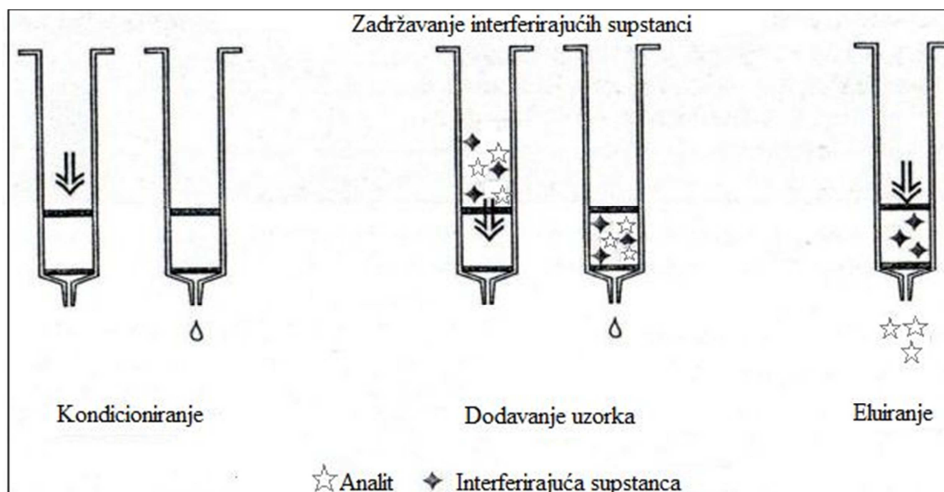


**Slika 10.** Zadržavanje analita na koloni za SPE ekstrakciju

Uzorak se propušta kroz čvrstu fazu pri čemu se analit vezuje za adsorbens dok interferirajuće komponente zajedno sa rastvaračem prolaze kroz kolonu. Nakon toga, odgovarajućim rastvaračem ili smešom rastvarača uklanjaju se zaostale interferirajuće komponente. Na kraju, željeni analit se eluira sa rastvaračem dovoljno velike eluacione moći.

U nekim slučajevima, druge interferirajuće komponente mogu da se zadrže na adsorbensu. Tako snažna adsorpcija interferirajućih komponenti nudi drugu mogućnost

prečišćavanja veoma složenih matriksa. Ako analiti ne pokažu interakciju sa adsorbensom, i ako se samo interferirajuće komponente zadrže, može se primijeniti čvrsta faza radi jednostavnog "filtriranja" uzorka, kao što je prikazano na Slici 11.



**Slika 11.** Zadržavanje ometajućih supstanci na koloni za SPE ekstrakciju

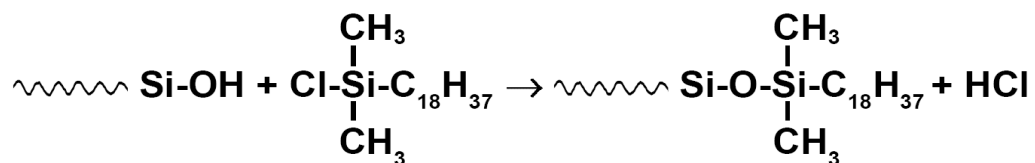
Adsorbovana supstanca se može ukloniti sa adsorbenta eluiranjem rastvaračem veće eluacione moći (tehnika step gradijenta). Međutim, ova metoda se može efikasno iskoristiti za preraspodelu grupa jedinjenja ili pojedinačnog analita na matriksu.

Što se tiče interakcija koje se odigravaju na koloni, one mogu biti različite i zavise od funkcionalnih grupa koje ima analit i od vrste stacionarne faze. Većina organskih jedinjenja imaju nepolarni deo strukture koje sa nepolarnim adsorbensom mogu ostvariti Van-der-Waals-ove interakcije. Takođe, nepolarne interakcije se odigravaju između ugljovodoničnih komponenti funkcionalnih grupa adsorbensa i analita. Gotovo sva organska jedinjenja imaju određeni potencijal za nepolarne interakcije. Izuzeci su jedinjenja koja imaju veliki broj polarnih ili čak jonskih grupa, koje okružuju nepolarni dio skeleta ugljenika (ugljeni hidrati).

Sa druge strane, nemodifikovani silicijum dioksid ne pokazuje nikakve nepolarne interakcije. S obzirom da su funkcionalne grupe većine modifikovanih silicijum dioksida vezane za površinu silicijum dioksida ugljovodonikom, ove modifikovane varijante pokazuju izvestan stepen nepolarnih interakcija.

Najčešće korišćeni adsorbensi nepolarnog karaktera su na pr. C18, C18 Hydra i C8 modifikovani silicijum dioksid. Njih karakteriše primijetno niska selektivnost, jer njihove funkcionalne grupe, alkilni supstituenti, mogu da reaguju sa skoro svim nepolarnim analitima. Ovo se može koristiti za izolaciju grupa supstanci različitih struktura (Slika 12).

Polarne interakcije uključuju vodonične veze, dipol-dipol i  $\pi$  -  $\pi$  interakcije, do kojih može doći između različitih adsorbenasa i funkcionalnih grupa analita. Neke od ovih interakcija moguće su između amino, hidroksilnih i karbonilnih grupa vezanih za aromatične prstenove, dvostruke veze i grupa sa hetero-atomima, kao što je slučaj kod azota, sumpora, fosfora i kiseonika. Tipični adsorbensi za polarne interakcije su nemodifikovani silicijum-dioksid, cijano-, amino- i dihidroksi-modifikovani silicijum-dioksid [76].



**Slika 12.** Modifikacija silikagela monohlor-dimetil-oktadecil silanom

Polarna jedinjenja se lako adsorbuju na polarnim adsorbensima iz nekog nepolarnog okruženja i eluiraju se jednim polarnim rastvaračem. Suprotno važi za nepolarna jedinjenja. Ona se jednostavno adsorbuju iz jedne polarne sredine na nepolarne površine. Eluiranje se postiže rastvaračima manje polarosti.

Jonske interakcije se javljaju između naelektrisanih analita i jednog adsorbensa sa jednom funkcionalnom grupom suprotnog naelektrisanja. Katjonske grupe su prisutne kod primarnih, sekundarnih, tercijarnih i kvaternarnih amina i neorganskih katjona, npr. kalcijuma, natrijuma, magnezijuma itd. Primjeri neorganskih grupa su karboksilne i sumporne kisjeline, fosfati i slične grupe. Razdvajanje koje se događa putem interakcije razmjene jona je pojačano na matriksu niske jonske snage i suprotnog jona niske selektivnosti (npr. acetat,  $\text{Na}^+$ ). Za eluiranje je prioritetan rastvarač visoke jonske snage i visoke selektivnosti (npr. citrat ili  $\text{Ca}^{2+}$ ).

### 2.8.1 Selektivnost i kapacitet SPE

Selektivnost je sposobnost adsorbensa da “napravi” razliku između analita i ostalih komponenti uzorka. Uopšteno govoreći, to opisuje sposobnost čvrste faze da adsorbuje analit, dok se nepoželjne komponente ne zadržavaju.

Selektivnost zavisi od hemijske strukture analita, karakteristika adsorbensa, sastava matriksa uzorka i korišćenog eluenta. Optimalna selektivnost se postiže funkcionalnim grupama analita, koje nijesu prisutne u matriksu uzorka i ostalim interferentnim komponentama.

Kapacitet jednog adsorbensa se definiše kao ukupna količina jednog analita, koja je adsorbovana od poznate količine adsorbensa u optimalnim uslovima. Za razmenjivače jona, kapacitet se obično daje u miliekvivalentima po gramu (meq/g). Za ostale silicijum dioksid adsorbense, vrijednosti kapaciteta su oko 3 - 5% od količine adsorbensa. Polistiren-divinilbenzen, baziran na adsorbentnim smolama HR-P i Easy Feature ima izrazito visok kapacitet od 30%. Stoga, ako su kapacitet i količina analita poznati, možemo odrediti potrebnu količinu adsorbensa.

Silicijum dioksidi sa modifikovanom površinom su stabilni u pH opsegu od oko 2,0 do 8,0. Međutim, u praksi kertridži se često koriste u širem pH opsegu. Modifikovani silicijum dioksidi su stabilni kod skoro svih organskih rastvarača. To su teški materijali, i oni ne pokazuju ni oticanje ni skupljanje, suprotno poliamidu i adsorbentnim smolama HR-P i Easy.

**Tabela 6.** Tipični rastvarači za *SPE* ekstrakciju

RASTVARAČ	MIJEŠANJE SA VODOM
Glac. Sirćetna kisjelina	da
Voda	da
Metanol	da
Izopropanol	da
Acetonitril	da
Aceton	da
Etil-acetat	da
Dietiletar	da
Tetrahidrofuran	da
Metilen hlorid	ne
Hloroform	ne
Ugljentetra hlorid	ne
Cikloheksan	ne
Petroletar	ne
Izooktan	ne
Heksan	ne

Preporučeni rastvarači za eluiranje treba da budu samo inicijalni izbor. Primjena drugih rastvarača ili njihovih kombinacija se određuje polaritetom koji je neophodan za razdvajanje. U tabeli 7 je prikazano kako se smanjenjem polarnosti rastvarača smanjuje i njegova eluaciona moć za polarne analite. S druge strane, smanjenjem polarnosti rastvarača raste eluaciona moć za nepolarne analite, odnosno reverzno faznu ekstrakciju [77].

Izbor optimalnih uslova za ekstrakciju akrilamida i naknadnih koraka za prečišćavanje ekstrakta zavise od matriksa namirnice. Voda i smješe vode i organskih rastvarača kao što su etil-acetat, metanol, aceton i metilen-hlorid su najčešće upotrebljavani rastvarači za ekstrakciju uglavnom na sobnoj temperaturi.

**Tabela 7.** Eluaciona moć rastvarača u odnosu na polarnost rastvarača

Rastvarač	Eluaciona moć (E) (E)	Po Polarnost (P) (P)
Glac. sirćetna kisjelina	>0,73	6,2
Voda	>0,73	10,2
Metanol	0,73	6,6
2-propanol	0,63	4,3
Piridin	0,55	5,3
Acetonitril	0,50	6,2
Etil-acetat	0,45	4,3
Aceton	0,43	5,4
Metilen-hlorid	0,32	3,4
Hloroform	0,31	4,4
Toluen	0,20	2,4
Cikloheksan	0,03	0,0
n-eksan	0,0	0,06

U zavisnosti od sadržaja masti u namirnici za prečišćavanje ekstrakta moguće je upotrijebiti veliki broj kombinacija materijala za SPE ekstrakciju. SPE ekstrakcija je moćno sredstvo za bržu i lakšu pripremu uzoraka (Slika 13), a samim tim i dobijanje boljih rezultata kvantitativnog određivanja. U praktičnom radu priprema uzoraka često je dugotrajan proces, koji zahtijeva veću potrošnju hemikalija a samim tim i povećava troškove kvantitativnih određivanja



**Slika 13.** Šema ekstrakcije na čvrstoj fazi

Kako su klasične metode prečišćavanja ekstrakta još u upotrebi i druge procedure za prečišćavanje kao što su SPME (eng. *Solid Phase Micro Exstaction*) postaju sve popularnije jer zahtijevaju manje reagenasa i bržu pripremu uzoraka [72].

## 2.9 Pregled analitičkih metoda za određivanje akrilamida

Tokom poslednjih godina objavljen je veliki broj opsežnih analitičkih metoda za određivanje akrilamida u namirnicama [66-69]. Mala molekulska masa akrilamida, njegova visoka reaktivnost i nedostatak hromofora su izazovi u kvantifikaciji akrilamida u malim koncentracijama u kojima je prisutan u životnim namirnicama.

Izbor optimalnih uslova za ekstrakciju i odgovarajućih koraka za prečišćavanje uzoraka su od posebne važnosti za adekvatnu pripremu uzoraka. Voda i smješe vode i organskih rastvarača su poželjni rastvarači za ekstrakciju uglavnom na sobnoj temperaturi [67, 68]. U literaturi su prikazane ekstrakcione procedure u kojima je posebna pažnja posvećena „bubrenju“ uzorka u vodi na temperaturi od 70° C [66, 67, 68, 94, 95, 97]. Da bi se poboljšao prinos ekstrakcije takođe je predloženo da se ekstrakcija izvede u ultrazvučnom kupatilu nekoliko minuta. U zavisnosti od sadržaja masti u uzorku namirnice nekada je potrebno uraditi i korak za odmašćivanje uzorka [68]. Takođe, u literaturi su prikazani i postupci za mikro ekstrakciju na čvrstoj fazi (*Solid Phase Micro Exstaction* - SPME) [69].

U literaturi postoji veliki broj opisanih GC-MS metoda za određivanje akrilamida u životnim namirnicama [65, 69, 72, 73, 74] i relativno mali broj metoda za pripremu uzoraka metodom ekstrakcije na čvrstoj fazi koja je brza, jednostavna, daje čistije uzorke i dovodi do slabije supresije jona u odnosu na metode tečno-tečne ekstrakcije [59, 76, 84].

Poslednjih godina za kvantitativno određivanje akrilamida u namirnicama se preporučuje metoda tečne hromatografije u tandemu sa dvostukom masenom spektrometrijom LC-MS/MS kao separaciona metoda za detekciju akrilamida u SIM (eng. *Selected Ion Monitoring*) modu. U preglednim radovima [70, 71], kao prihvatljivija alternativa za kvantifikaciju akrilamida u namirnicama opisuju se HPLC/DAD (eng. *High Performance Liquid Chromatography / Diode Array Detector*) metode. Ovakva određivanja se uglavnom rade na reversno – faznoj koloni ili pomoću jonoizmjenjivačke hromatografije, identifikacija i kvantifikacija se prvenstveno izvode u MS/MS modu. Takođe, sve popularnija metoda za kvantifikaciju akrilamida je UPLC (eng. *Ultra - Performance Liquid Chromatography*). Zbog visoke senzitivnosti i selektivnosti, a bez potrebe za derivatizacijom, HPLC-MS/MS i UPLC- MS/MS metode su sve više u primjeni. Primjena GC metoda ima određene prednosti u istraživanjima jer su GC instrumenti relativno jeftini i dostupni



većini bromatoloških laboratorija. Na početku eksperimenta cilj je bio da se optimizuje i primijeni jednostavna i dovoljno osjetljiva GC metoda za određivanje akrilamida u namirnicama bogatim škrobom koja bi bila dovoljno dobra alternativa LCMS/MS metodi.

Kvantifikacija akrilamida u namirnicama GC - MS (eng. *Gas chromatography - Mass Spectrometry*) metodama se može izvoditi sa ili bez derivatizacije. Derivatizacija se najčešće izvodi pomoću bromovanja. Bromovani akrilamid je manje polaran nego početna komponenta i samim tim se bolje rastvara u nepolarnim organskim rastvaračima, a kao efektivan korak prečišćavanja može da se koristi tečno – tečna ekstrakcija između vodene i organske faze. Prednost postupka derivatizacije se ogleda u tome da se povećava molekulska masa, što rezultira, osim veće rastvorljivosti i većom selektivnošću. U svakom slučaju, derivatizacija je proces koji zahtijeva vrijeme, zato što, na primjer, višak broma mora biti odstranjen nakon reakcije. Glavni nedostatak GC – MS metode bez derivatizacije je nedostatak karakterističnih jona zbog male molekulske težine akrilamida. U elektron jonizacionom modu (eng. *Electron ionisation mode*) glavni fragmenti jona za identifikaciju i kvantifikaciju akrilamida imaju  $m/z$  71 i 55.

U literaturi je publikovano i nekoliko mikroforetskih metoda za određivanje akrilamida baziranih na elektroforezi. Te metode su: kapilarna elektroforeza - CE (eng. *Capillary Electrophoresis*), kapilarne zone elektroforeze - CZE (eng. *Capillary Zone electrophoresis*), bezvodna kapilarna elektroforeza – NACE (eng. *Non-Aqueous capillary Electrophoresis*) i micelarna elektrokinetička hromatografija – MEKC (eng. *Micellar Electrokinetic Chromatography*) [72-74].

Druge analitičke tehnike kao što je pirolitička gasna hromatografija-masena spektrometrija - Py-GC-MS (eng. *Pyrolysis Gas Chromatography/Mas Spectrometry*) i FT-IR (eng. *Fourier Transform Infrared Analysis*) su se najčešće koristile u analitici koja teži da objasni formiranje akrilamida u namirnicama ali ne i u kvantifikaciji akrilamida.

## 2.10 Zakonska regulativa

U cilju zaštite javnog zdravlja, član 2. Uredbe Savjeta EU broj 315/93 [78]. propisano je da će se uspostaviti potrebni maksimalni nivoi tolerancije za specifične kontaminante. Akrilamid u hrani do sada kod nas nije obuhvaćen nijednim zakonskim ili podzakonskim aktom, a takođe nije obuhvaćen nijednom Uredbom Savjeta Evropske Unije. Preporukom Evropske komisije 2010/307/ EU [79]. Države članice EU su u obavezi da prate nivoje akrilamida u određenim namirnicama i da godišnje dostave podatke EFSA-i (eng. *European Food Safety Authority*). Monitoring se ciljano odnosi na namirnice za koje je poznato da sadrže visoke koncentracije akrilamida, i na namirnice koje imaju značajan udio u ishrani ljudi. Pored vrste namirnica, takođe, treba naznačiti mjesto uzorkovanja, broj uzoraka i frekvenciju njihovog uzorkovanja, kao i minimalne dodatne informacije o uzorku. Na osnovu rezultata monitoringa u državama članicama EU od 2007 – 2011 godine, Evropska Komisija je odredila „indikativne vrijednosti” akrilamida za određene namirnice koje su date u Tabeli 8, a koja je sastavljena po preporuci komisije 2013/647/EU [80]. Prema ovoj preporuci „indikativne vrijednosti” nijesu maksimalno dozvoljene koncentracije akrilamida, već nam ukazuju na potrebu detaljnijeg praćenja koncentracija akrilamida u toj namirnici, a zabrana upotrebe i izdavanje upozorenja sprovoditi samo na osnovu procjene rizika u zavisnosti od slučaja do slučaja a ne i samo zato što je „indikativna vrijednost” prekoračena. Preporuka navodi da treba obuhvatiti i osobe koje posluju sa hranom, što je u skladu sa zahtjevima HCCP (eng. *Hazard Analysis and Critical Control Points*) sistema kontrole kritičnih tačaka. Na osnovu ovakvih podataka nadležni organi treba da procijene u kojoj mjeri su poznate mogućnosti smanjenja koncentracija akrilamida, na primjer: one predložene u Kodeksu Prakse za akrilamid koji je usvojila komisija Kodeks alimentarius (eng. *Codex Alimentarius*).

Direktiva 98/33/EC [81] o kvalitetu vode za piće određuje maksimalno dozvoljenu vrijednost akrilamida od 0,1 µg/L, koja je određena na osnovu dostupnih naučnih znanja kao i principa predostrožnosti kako bi se obezbijedio kvalitet vode namijenjen za ljučku upotrebu i kako bi se obezbijedilo bezbjedno konzumiranje vode za piće, i predstavlja visok nivo zdravstvene zaštite.

Ova vrijednost, odnosi se na rezidualnu koncentraciju akrilamida u vodi za piće, koja je izračunata u skladu sa specifičnom migracijom iz polimera koji su u kontaktu sa vodom za piće.

**Tabela 8.** Indikativne vrijednosti za akrilamid u namirnicama po preporuci Komisije Evropske Unije 2013/647/EU [80]

<b>Namirnice</b>	<b>Indikativna vrijednost (µg/kg)</b>
Pomfrit	600
Krompirov čips Krekeri od krompira	1000
Hljeb -Hljeb od pšeničnog brašna -Hljebovi od ostalih tipova brašna	80 150
Žitarice za doručak -Proizvodi od mekinja i žitarice u znu -Proizvodi od pšenice i raži -Proizvodi od kukuruza,ovsa i ječma	400 300 200
Biskviti i vafli -Krekeri(izuzev krekeri na bazi krompira) -Tost hljeb -Medenjaci -Proizvodi slični ostalim proizvodima iz ove kategorije	500 500 450 1000 500
Kafa	450
Instant kafa	900
Zamjene za kafu -Zamjene za kafu na bazi žitarica -Ostale zamjene za kafu	2000 4000
Hrana za bebe,sve osim hrane na bazi žitarica -Bez suvih šljiva -Sa suvim šljivama	50 80
Keks namijenjen bebama i maloj djeci	200
Hrana na bazi žitarica za bebe i malu djecu	50

Prema članu 6. Direktive 98/33/EC [81] maksimalno dozvoljena koncentracija se odnosi na:

- Vodu iz distributivne mreže uzetu sa česme koja se koristi za ljudsku upotrebu ili za pripremu namirnica za ishranu ljudi.
- Vodu iz rezervoara uzetu na mjestu gdje voda izlazi iz rezervoara i koristi se kao voda za ili za pripremu namirnica za ishranu ljudi.

- Vodu koja se pakuje u flaše namijenjenu za prodaju na mjestu gdje se voda sipa u flaše.
- Voda koja se koristi za proizvodnju namirnica na mjestu gdje se voda dodaje namirnicama.

Uredba Savjeta EU broj 10/2011 [82] o plastičnim materijalima i ambalaži koja dolazi u kontakt sa namirnicama navodi akrilamid u Aneksu I kao supstancu koja se koristi kao monomer, ali se ne smije koristiti kao aditiv ili polimer u procesu proizvodnje. Specifična migracija akrilamida iz materijala koji dolaze u kontakt sa namirnicama nije određena.

Uredba Savjeta EU broj 1223/2009 [83] o listi kozmetičkih proizvoda, u Aneksu II navodi da je zabranjena upotreba akrilamida u proizvodnji kozmetičkih proizvoda, dok u Aneksu III ove Uredbe predviđeno je da preparati za njegu tijela sadrže maksimalnu rezidualnu koncentraciju akrilamida iznosi 0,1 mg/kg, a da maksimalna rezidualna koncentracija za akrilamid iz poliakrilamida koji se dodaju kozmetičkim proizvodima iznosi 0,5 mg/kg.

## **3 Cilj istraživanja**

Ciljevi ovog istraživanja su:

- Praćenje uticaja termičkih tretmana (kuvanje, pečenje i prženje) na sintezu akrilamida kod namirnica bogatih škrobom.
- Razvoj derivatizacione metode za kvantifikaciju akrilamida u namirnicama metodom gasne hromatografije u tandemu sa masenom spektrometrijom.
- Razvoj metode za pripremu uzoraka različitih namirnica za kvantifikaciju akrilamida upotrebom smanjene količine broma.
- Razvoj metode za kvantifikaciju akrilamida u namirnicama pomoću gasne hromatografije sa NPD (Azot-fosforim detektorom).

## **4 Eksperimentalni dio**

## 4.1 Termički tretman namirnica bogatih skrobom

U cilju praćenja uticaja različitih termičkih tretmana (kuvanje, pečenje i prženje) na sintezu akrilamida u namirnicama bogatim skrobom kao što je krompir, po šest uzoraka krompira pripremljeni su za konzumiranje na tri različita termička tretmana:

- Kuvanjem u vodi na temperaturi do 110°C u trajanju od 15 minuta.
- Pečenjem u rerni na temperaturi od 180°C u trajanju od 15 minuta
- Prženjem u fritezi na temperaturama ulja od 190°C do 250°C u trajanju od 1 do 15 minuta.

Kako bi se proučio uticaj termičkih tretmana na sintezu akrilamida, krompir je podvrgnut različitim termičkim tretmanima u različitim vremenskim intervalima. Način pripreme odabran iz razloga što je tradicionalna ishrana bazirana na namirnicama bogatim ugljenim hidratima (pečeni i prženi krompir, pekarski proizvodi i dr.), koje se podvrgavaju termičkom tretmanu na visokim temperaturama, a skoro svakodnevno pečeni ili prženi krompir su prisutni u našoj ishrani. Ovakav način ishrane može predstavljati rizik u smislu unosa većih količina akrilamida. Generalno na temperaturi od 250°C dolazi do sinteze akrilamida u većim koncentracijama, smanjenjem temperature prženja sa 250°C na 170°C smanjen je sadržaj akrilamida u pomfritu, ali on je bio neprivlačnih organoleptičkih osobina (neukusan i manje hrskav) i mnogo manje privlačan za konzumaciju.



## 4.2 Priprema uzoraka i kvantifikacija akrilamida metodom gasne hromatografije u tandemu sa masenom spektrometrijom (GC-MS)

### 4.2.1 Aparatura i reagensi

Za određivanje akrilamida korišćen je gasni hromatograf Shimadzu GC-MS-model QP2010 plus (*Shimadzu Inc., Koyoto, Japan*), sa kapilarnom kolonom HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  veličine čestica, J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Obrada podataka i kontrola GC-MS sistema vršena je pomoću softvera „Lab solution“ (*Shimadzu Inc., Koyoto, Japan*). Kao standard korišćen je rastvor akrilamida (čistoće > 99,8%) proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Kao interni standard korišćen je rastvor izotopa akrilamida – [ $^{13}\text{C}_3$ ] koncentracije 1mg/ml u metanolu ( $\text{H}_2^{13}\text{C}=\text{CH}^{13}\text{CONH}_2$ ) proizvođača Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA). Organski rastvarači: *n*-heksan, metanol, etil-acetat, kao i kalijum-bromid, natrijum-tiosulfat, trietilamin i anhidrovani natrijum-sulfat takođe su od proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Kertridži za ekstrakciju na čvrstoj fazi (SPE) su OASIS MCX 3cc (60 mg) i tečna faza OASIS HLB 6cc (200 mg) su od proizvođača Waters Corporation (Massachusetts, USA). Kalijum-bromid i natrijum-sulfat su žareni na 600<sup>0</sup> C u trajanju od 6 sati u peći za žarenje (Carbolite Furnaces; Chelmsford/Essex, England). Ostali reagensi su korišteni bez daljeg prečišćavanja [85].

### 4.2.2 Priprema rastvora

Osnovni standard akrilamida koncentracije 1 mg/mL pripremljen je rastvaranjem u etil-acetatu. Radni rastvor pripremljen je rastvaranjem osnovnog rastvora standarda u opsegu koncentracija od 5 do 80  $\mu\text{g/L}$  u etil-acetatu.

Interni standard izotopa akrilamida [ $^{13}\text{C}_3$ ] koncentracije 4 mg/L dodat je ispitivanom uzorku u količini od 10  $\mu\text{l}$  i dobijena je koncentracija internog standarda od 40  $\mu\text{g/L}$ .

### 4.2.3 Postupak pripreme uzoraka

Kompletan postupak se sastoji od četiri faze koje su u ovom dijelu detaljno opisane. Uzorci koji su analizirani bili su proizvodi na bazi kukuruznog brašna su prikupljeni od strane službe sanitarne inspekcije u okviru redovnog sanitarnog nadzora nad kuhinjama dječijih vrtića u Podgorici.

Posebna pažnja tokom ekstrakcionih procedura posvećena je „bubrenju“ suvog matriksa namirnica, kako bi rastvarač za ekstrakciju dobio bolji pristup potencijalno prisutnom akrilamidu u ispitivanim uzorcima namirnica [86]. Da bi se dobio bolji prinos ekstrakcije, pristupilo se povećanju temperature dejonizovane vode koju smo koristili kao rastvarač za ekstrakciju na  $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  u trajanju od najmanje 60 minuta. U svakom slučaju, tokom ekstrakcije se mora voditi računa da ne dođe do isparavanja rastvarača za ekstrakciju, naročito ako se koriste organski rastvarači, tada se ekstrakcija mora izvoditi sa povratnim hladnjakom. Iz tih razloga izabrana je dejonizovana voda kao rastvarač za ekstrakciju koja na temperaturi  $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  ne isparava a i smanjuje troškove u odnosu na organske rastvarače.

Faza 1. Homogenizacija i dodavanje internog standarda: Izmjeri se 20 g dobro homogenizovanog uzorka i ostavi da bubri upijajući 200 mL dejonizovane vode ( $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) u trajanju od najmanje 60 minuta. Smeša se ponovo dobro izhomogenizuje pomoću homogenizatora Ultra-turrax (IKA-T25 Basel, Switzerland). 1 g homogenizovane smješe se prenese u kivetu za centrifugiranje i doda se 3 mL 2M NaCl, smješa se ponovo dobro izhomogenizuje. Zapremina od 10  $\mu\text{L}$  internog standarda koncentracije 4 mg/L izotopa [ $^{13}\text{C}_3$ ] akrilamida doda se u smješu, i smješa se homogenizuje na vorteks mikseru (Stuart Scientific, Manchester, England) u toku 1 minuta. U smješu se doda 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  odnosno 40 ng/g internog standarda.

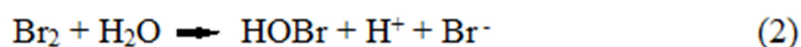
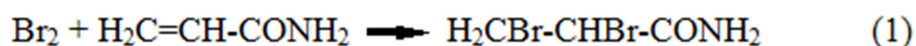
Faza 2. Prečišćavanje: Postoje mnoge prednosti za upotrebu ekstrakcije na čvrstoj fazi, ali četiri su glavne zbog kojih je SPE ekstrakcija odabrana za kvantifikaciju akrilamida metodom GC-MS, a to su:

- Izdvajanje analita iz složenih matriksa uzorka, kao što je izdvajanje akrilamida iz različitih uzoraka termički tretiranih namirnica;
- Redukcija supresije jona;
- Mogućnost razdvajanja jedinjenja prema grupama;

- Određivanje analita u niskim koncentracijama, tzv. koncentracijama u tragovima.

Smješa koja sadrži interni standard centrifugira se na 10.000 obrtaja pomoću centrifuge (Sigma, Gillingham Dorset, UK) u trajanju od 30 minuta, dobijeni supernatant se profiltrira kroz stakleni filter pora 0,45 μm (Witeg Labortechnik GmbH, Germany) kako bi se izdvojila eventualno zaostala mast. Kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi (HLB, MCX) kondicioniraju se sa 3 mL metanola, zatim sa 3 mL vode. Nakon kondicioniranja, na kolonu se nanosi uzorak filtrata a zatim se vrši eluiranje sa 50 mL dejonizovane vode. U eluat se zatim doda 7,5 g kalijum-bromida čija je pH vrednost podešena na pH = 2,0 dodavanjem oko 15 kapi 47% bromovodonične kiseline.

Faza 3. Bromovanje: Ekstraktima uzoraka uz miješanje doda se po 2 mL zasićenog rastvora bromne vode (1,6 % v/v) što je prikazano reakcijama (1) i (2). Uzorci se čuvaju na 0 °C u trajanju od 24 sata kako bi se završila reakcija bromovanja.



Faza 4. Finalno prečišćavanje za GC-MS određivanje: nakon završetka reakcija bromovanja višak broma ukloni se dodavanjem 50 μL 1M natrijum-tiosulfata i višak broma se obezbojio. Zatim se doda po 10 g anhidrovanog natrijum-sulfata i smješa se dobro izmiješa. Smješa se prenese u lijevak za odvajanje zapremine 250 mL, doda se 20 ml smješe etil-acetat/heksan (4:1 v/v) i dobro se izmiješa. Organska faza se zatim prenese u kivetu za centrifugiranje u kojoj je odmjereno 4 g anhidrovanog natrijum-sulfata. Ovaj korak se ponovi dva puta sa po 20 ml smješe etil-acetat/heksan (4:1 v/v). Smješa se centrifugira i dekantuje kroz stakleni filter papir i upari do suva pomoću rotacionog vakum uparivača (Rotavapor R-124; Buchi, Swicerland). Suvi ostatak se rastvori u 50 μL trietilamina i 450 μL etil-acetata. Pripremljeni ekstrakti se čuvaju u zamrzivaču na -20°C do GC-MS analize.

#### 4.2.4 Validacija GC-MS metode za određivanje akrilamida u namirnicama

##### a) Priprema rastvora standarda za procjenu linearnosti

Pripremljen je osnovni rastvor standardne supstance akrilamida u koncentraciji od 1mg/ml. Od ovog rastvora pripremljeni su rastvori standarda akrilamida sledećih koncentracija: 5µg/L, 20 µg/L, 40 µg/L, 60 µg/L i 80 µg/L. Pripremljeni rastvori injektiraju se po tri puta u prethodno podešen hromatografski sistem. Na osnovu dobijenih rezultata, metodom najmanjih kvadrata, konstruiše se kalibraciona kriva.

#### **b) Priprema rastvora standarda za procjenu tačnosti**

Od osnovnog rastvora standarda akrilamida koncentracije 1mg/mL, pripremljeni su rastvori koncentracija 10 µg/L, 20 µg/L, 40 µg/L. Tačnost metode je procenjena na taj način što je uzorak kukuruznog hleba koji je sadržao 29,5 µg/kg akrilamida opterećen sa 10 µg/kg, 20 µg/kg, 40 µg/kg akrilamida. Vrijednosti dobijene iz šest paralelno urađenih ekstrakcija kvantitativno su analizirane GC-MS postupkom.

#### **c) Priprema rastvora standarda za određivanje limita kvantifikacije (LoQ) i limita detekcije (LoD)**

Pripremljen je rastvor radnog standarda tj. vještački uzorak koji sadrži 5 µg/kg akrilamida. Vrijednosti dobijene iz šest paralelno urađenih ekstrakcija prikazane su u Tabeli 12.

#### **4.2.5 Postupak GC – MS analize**

Nakon stabilizovanja GC-MS sistema, pristupa se postupku kalibracije. Svi potrebni parametri (vremenske funkcije, izbor metode izračunavanja, atenuacije i dr.) unesu se softverskom metodom koja omogućava praćenje razdvajanja akrilamida. Hromatografski uslovi su navedeni u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Uslovi hromatografskog postupka

Mobilna faza	He, 99,999 % (1,6 mL/min)
Temperaturni program	50 °C – 240 °C (5° C/min); 8 min.
Temperatura injektora	200° C splitles mod

#### 4.2.6 Statistička analiza

Za statističku obradu podataka korišćeni su programi Microsoft Office Excel i Statistica. Primijenjene su regresiona i korelaciona analiza. Regresiona i korelaciona analiza su statističke metodologije koje ispitiuju vezu između dvije ili više statističkih promenljivih.

Regresiona analiza govori u kakvom odnosu stoji jedna promenljiva prema drugoj. Ona se izražava jednačinom u kojoj se poznata vrijednost jedne ili više promenljivih koristi za izračunavanje nepoznatih vrijednosti ostalih promenljivih [87].

Najjednostavniji postupak regresione analize naziva se metoda najmanjih kvadrata. Regresiona analiza najčešće obuhvata dvije promenljive, a ako je u pitanju više promenljivih ta tehnika se naziva multiplom regresijom. Korelaciona analiza pokazuje stepen zavisnosti između promenljivih, pa se njome najčešće određuje da li ima smisla izračunavati jednu promenljivu na osnovu druge.

Regresiona analiza se izvodi putem regresione jednačine:

$$y = ax + b$$

gdje je  $b$  odsječak na ordinati,  $a$  je nagib regresione linije.  $y$  je nepoznata promenljiva koja se izračunava na osnovu vrijednosti poznate promenljive  $x$ .

Odnos promenljive  $y$  prema promenljivoj  $x$  može da bude različit. Ako se vrijednost  $y$  povećava za svaku uvećanu vrednost  $x$ , onda je  $y$  direktno zavisna veličina u odnosu na  $x$ . U ovom slučaju je nagib regresione linije pozitivan, tako da je  $m > 0$ . Suprotno ovome, nagib regresione linije može da bude negativan, kada je  $m < 0$ . U tom slučaju se vrijednost  $y$  smanjuje za svaku uvećanu vrednost  $x$ . Ukoliko promenljiva  $y$  ne zavisi od promenljive  $x$ , regresiona linija je paralelna sa  $x$ -osom.

Odstupanje zbira kvadrata pojedinačnih vrednosti  $x$  i  $y$  od srednje vrednosti definiše se preko veličina  $S_{xx}$ ,  $S_{yy}$  i  $S_{xy}$ :

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$$

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x}, y_i - \bar{y})^2 = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N}$$

gde su  $x_i, y_i$  pojedinačni parovi vrijednosti za  $x$  i  $y$ ,  $N$  je broj parova koji se upotrebljavaju za izradu regresione linije, a  $\bar{x}$  i  $\bar{y}$  su srednje vrednosti promenljivih  $x$  i  $y$ .

Iz veličina  $S_{xx}$ ,  $S_{yy}$  i  $S_{xy}$  proizilazi: nagib pravca  $a$ , odsečak na ordinati  $b$ , standardna greška odstupanja od regresione linije, standardna greška nagiba, standardna greška odsečka na ordinati, standardna greška odstupanja rezultata dobijenih iz regresione linije [87].

Dakle, regresionom analizom se dobija jednačina pomoću koje se jedna promenljiva izračunava iz druge promenljive, a korelaciona analiza pokazuje stepen zavisnosti između ove dvije promjenljive. Stepem zavisnosti između promjenljivih određuje veličina odstupanja podataka oko regresione linije, a izražava se korelacionim koeficijentom  $r$ , a može biti izražena i koeficijentom determinacije  $R$ .

### **4.3 Priprema uzoraka i kvantifikacija akrilamida metodom gasne hromatografije sa fosforim detektorom (NPD)**

#### **4.3.1 Aparatura i reagensi**

Za određivanje sadržaja akrilamida korišćen je gasni hromatograf Agilent 6890A opremljen sa azot - fosforim detektorom i kapilarnom kolonom DB-WAX (0,32 mm i.d. x 30 m x 0,25 µm debljina filma, J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Obrada podataka i kontrola GC sistema vršena je pomoću softvera Agilent Technologies 6890N Gas Chromatography chemstation softver (Hewlett-Packard, CA, USA). Kao standard korišćen je rastvor akrilamida (čistoća > 99,8%) proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Organski rastvarači (etil-acetat, metanol, aceton i metilen-hlorid) takođe su od proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

#### **4.3.2 Priprema rastvora**

Osnovni rastvor standarda akrilamida koncentracije 1 mg/mL (1000 ppm) pripremljen je rastvaranjem u etil-acetatu.

Radni rastvor pripremljen je rastvaranjem osnovnog rastvora standarda u opsegu koncentracija od 0 do 10 mg/L u etil-acetatu. Svi rastvori standarda čuvani su na temperaturi od 4°C do ispitivanja, a prije ispitivanja temperirani su do sobne temperature.

#### **4.3.3 Postupak pripreme uzoraka**

Uzorci krompira nakon termičkih tretmana pripremani su tečno-tečnom ekstrakcijom [86 i 91]. Izmjeri se 20 g dobro homogenizovanog uzorka i ostavi da bubri upijajući 200 mL dejonizovane vode (70° C ± 1° C) u trajanju od 60 minuta. Smješa se ponovo homogenizuje i dobijeni supernatant odvoji i profiltrira kroz stakleni filter pora 0,45 µm (Witeg Labortechnik GmbH, Germany). Dobijeni filtrat zasiti se kristalnim NaCl i u smešu doda 100 mL etil-acetata. Nastala suspenzija se miješa 1 sat. Dobijeni rastvor prenese se u lijevak za odvajanje zapremine od 500 mL i izdvoji se sloj etil-acetata. Zaostala voda odvoji se filtriranjem kroz filter papir sa

anhidrovanim natrijum-sulfatom. Filtrat se upari na zapreminu manju od 10 mL zagrijavanjem na 60° C pomoću rotacionog vakuum uparivača (Rotavapor R-124; Buchi, Swicerland), i dopuni do 10 mL etilacetatom. Jedan mikrolitar finalnog ekstrakta se injektuje u prethodno pripremljen hromatografski sistem [88].

#### **4.3.4 Validacija GC-NPD metode za određivanje akrilamida u namirnicama**

##### **a) Priprema rastvora standarda za procjenu linearnosti**

Pripremljen je osnovni rastvor standardne supstance akrilamida u koncentraciji od 1mg/ml. Od ovog rastvora pripremljeni su rastvori standarda akrilamida sledećih koncentracija: 0, 1, 2, 5 i 10 mg/L. Pripremljeni rastvori injektirani su po tri puta u predhodno podešen hromatografski sistem. Na osnovu dobijenih rezultata, metodom najmanjih kvadrata, konstruisana je kalibraciona kriva.

##### **b) Priprema rastvora standarda za procjenu tačnosti**

Od osnovnog rastvora standarda akrilamida koncentracije 1mg/mL, pripremljeni su rastvori koncentracija 1,0; 2,0 i 5,0 mg/L. Tačnost metode procijenjena je na taj način što je uzorak krompira koji je sadržao 1,4 mg/kg akrilamida opterećen sa po 1,0; 2,0 i 5,0 mg/kg akrilamida i dobijene vrijednosti su prikazane u Tabeli 18. Vrijednosti dobijene iz šest paralelno urađenih ekstrakcija kvantitativno su obrađene GC – NPD postupkom.

##### **c) Priprema rastvora standarda za određivanje limita kvantifikacije (LoQ) i limita detekcije (LoD)**

Za verifikaciju LOD i LOQ pripremljen je radni standard (veštački uzorak) koji sadrži 0,2 mg/kg akrilamida. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 17.

#### **4.3.5 Postupak GC-NPD analize**

Nakon stabilizovanja GC-NPD sistema uradi se kalibracija. Svi potrebni parametri (vremenske funkcije, izbor metode izračunavanja, atenuacije i dr.) unesu se softverskom metodom koja omogućava praćenje razdvajanja akrilamida. Hromatografski uslovi su navedeni u Tabeli 10.



**Tabela 10.** Hromatografski uslovi za određivanje sadržaja akrilamida sa GC-NPD

Mobilna faza	He, 99,999 % (27 mL/min)
Temperaturni program	50 <sup>0</sup> C – 180 <sup>0</sup> C (20 <sup>0</sup> C/min); 8 min.
Temperatura injektora	250 <sup>0</sup> C splitles mod
Temperatura detektora	280 <sup>0</sup> C

Za statističku obradu podataka korišćeni su programi MS Excel i Statistica. Primijenjene su regresiona i korelaciona analiza koje su opisane u poglavlju 4.2.5.

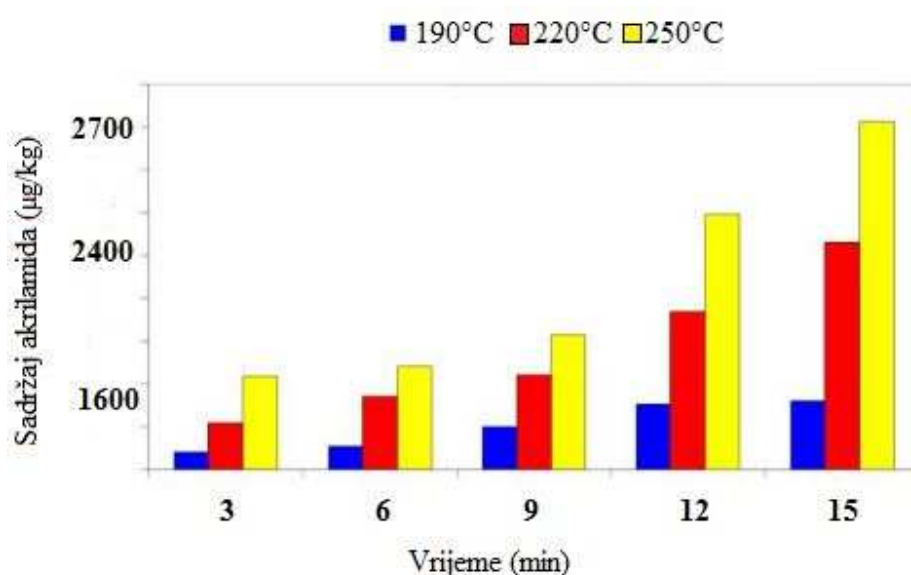
## **5 Rezultati i diskusija**

## 5.1 Kvantifikacija akrilamida metodom gasne hromatografije u tandemu sa masenom spektrometrijom (GC-MS)

Akrilamid je kvantifikovan kao derivat 2-brompropen amida (2-BPA) po metodi Pittet i sar. [84] i Young i sar. [59] uz određene modifikacije koje su urađene u cilju unapređenja metode.

Prvo unapređenje jeste smanjena zapremina bromne vode u fazi bromovanja. Drugo unapređenje sastoji se u upotrebi SPE ekstrakcije umesto rastvora *Carrez* I i II kako je to bilo u predhodno publikovanoj metodi [84].

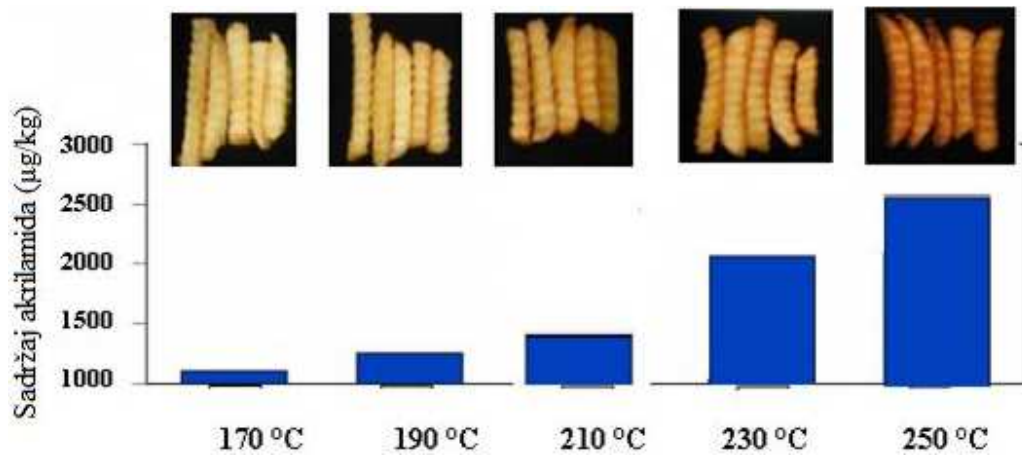
Značajan porast koncentracije akrilamida sa porastom temperature između 190° C i 250° C, u trajanju tretmana prženjem u ulju između 3 i 15 minuta najbolje ilustruje Slika 17.



**Slika 17.** Uticaj temperature ulja i vremena na sadržaj akrilamida u pomfritu

Visoka temperatura i duže vrijeme prženja pogoduju sintezi veće količine akrilamida, ali porast temperature ima izraženiji efekat na sintezu akrilamida u gotovom proizvodu nego povećanje vremena termičkog tretmana na konstantnoj temperaturi. Imajući u vidu ove činjenice, u laboratorijskim uslovima pripremljeno je pet uzoraka pomfrita na temperaturama 170° C, 190° C, 210° C, 230° C i 250° C i došlo se do zaključka da temperatura ulja za pripremu namirnica ne

bi trebalo da prelazi 170° C do 175° C, da bi se izbjegle visoke vrijednosti sadržaja akrilamida. Međutim, organoleptička svojstva gotovog proizvoda nijesu prihvatljiva za konzumaciju, što ilustruje Slika 18.



**Slika 18.** Uticaj temperature prženja na koncentraciju akrilamida i organoleptička svojstva pomfrita

Ovu tvrdnju potvrđuje i eksperiment koji su izveli i publikovali Matthäus i saradnici [89] na termički tretiranim pljeskavicama od krompira pripremljenim pečenjem u retni i prženjem u fritezi.

U literaturi su prikazani efekti prženja krompira u različitim vrstama ulja na nastajanje akrilamida u slatkom krompiru [90], koji je sadržao 4,17g/kg glukoze, 5,05 g/kg fruktoze i 1,63 g/kg slobodnog asparagina. Sladak krompir pržen u palminom ulju sadržao je nižu koncentraciju akrilamida (1443 mg/kg) u poređenju sa slatkim krompirom prženom u sojinom ulju koji je sadržao (2019 mg/kg) akrilamida.

Takođe, Yuan i saradnici [91] su prikazali vrijednosti za koncentracije akrilamida u krompirovim kriškama nakon potapanja u različitim rastvorima i izlaganja mikrotalasnom tretmanu, a nakon toga prženju u laboratorijskim uslovima. Njihovi rezultati prikazuju da nakon potapanja krompirovih kriški u vodi, mikrotalasnog tretmana i prženja u ulju dolazi do redukcije sadržaja akrilamida od 8% – 40%. Potapanje kriški krompira u rastvor NaCl koncentracije 0,5 g/dm<sup>3</sup>, a zatim u rastvor CaCl<sub>2</sub> koncentracije 2 g/L pod istim gore navedenim uslovima, autori su dobili vrijednosti koje su za 56% smanjila koncentraciju akrilamida u gotovom proizvodu.

Potapanje kriški krompira u rastvor limunske kisjeline koncentracije 1 g/dm<sup>3</sup>, vrijednosti sadržaja akrilamida bile su niže za 58%. Autori su zaključili da bi optimalni tretman limunskom kisjelinom koncentracije 1 g/L mogao redukovati sadržaj akrilamida, dok bi se zadržala organoleptička svojstva gotovog proizvoda.

Za određivanje sadržaja akrilamida u termički tretiranim uzorcima proizvedenim na bazi kukuruznog brašna primijenjena je GC-MS metoda. Kao što je navedeno u uvodu, cilj je bio da se razvije metoda koja će biti brža i ekonomičnija od uobičajenih metoda i koja će zahtijevati manju količinu broma za fazu derivatizacije akrilamida. Iz tog razloga, urađena je optimizacija bromovanja prema proceduri opisanoj u Eksperimentalnom dijelu a korišćene zapremine bromne vode, kao i dobijeni rezultati za *Recovery* vrijednosti prikazane su u Tabeli 11<sup>1</sup>.

#### **Postupak određivanja najmanje količine broma**

U ovoj fazi istraživanja optimizirana je potrebna količina broma za pripremu uzoraka. U cilju određivanja optimalne zapremine broma, vršeno je opterećivanje uzorka kukuruznog hleba koji je sadržao 29,5 µg/kg akrilamida sa 40 µg akrilamida koji je pripremljen sa 5 različitih zapremina bromne vode (1, 2, 5, 10 i 15 mL). Kao odgovor, praćen je prinos ekstrakcije izražen kao *Recovery* vrijednost [92]. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 11.

Na osnovu rezultata zaključeno je sledeće, srednja *Recovery* vrijednost za 1 mL bromne vode bila je 70,6% što je dosta nisko, dok je *Recovery* vrijednost za zapreminu bromne vode od 2 mL, bio prihvatljivih 89,2 %.

---

<sup>1</sup> [Hem. Ind., 2015, On Line-First 5-10].

**Tabela 11.** *Recovery* vrednost za akrilamid u uzorku pripremljenom sa 5 različitih zapremina bromne vode

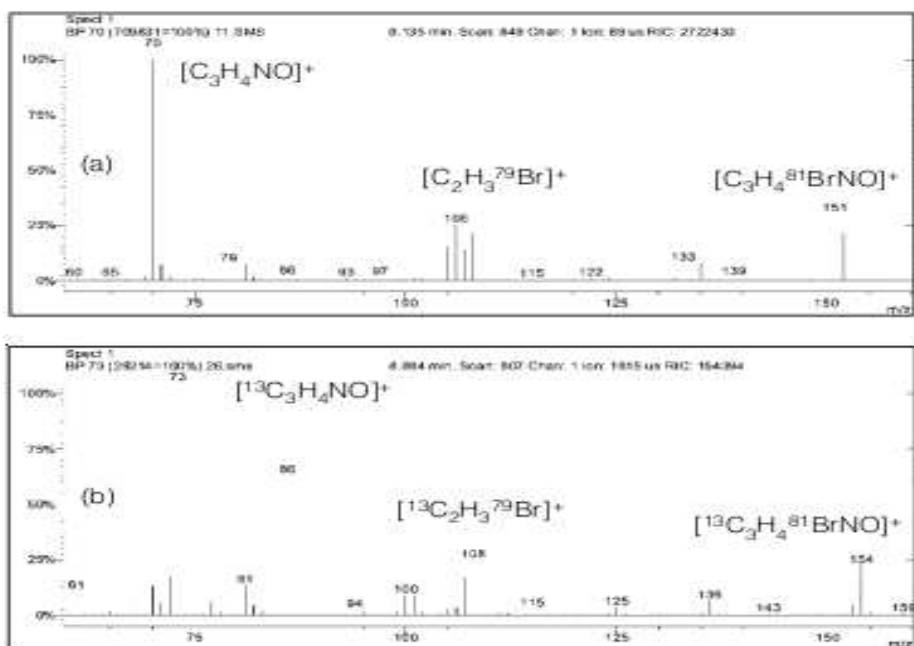
Zapremina bromne vode (mL)	Opseg <i>Recovery</i> vrijednosti (%)	Srednja vrijednost za <i>Recovery</i> (%) $\pm$ SD
15	103,8 – 105,7	105,3 $\pm$ 1,42
10	99,1-104,1	101,6 $\pm$ 1,70
5	93,1 – 106,3	98,1 $\pm$ 4,90
2	83,5 – 99,1	89,2 $\pm$ 6,19
1	53,1 – 92,5	70,6 $\pm$ 13,7

Izvođenje ekstrakcije akrilamida iz različitih vrsta namirnica, od drugih istraživača koji su za njegovu derivatizaciju koristili po 15 mL bromne vode, opisano je u literaturi [3, 85, 90, 92, 93, 95].

Pouzdanost metode je testirana kvantifikacijom akrilamida u 6 ponavljanja, a nakon tog procesa, dalje je vršena validacija metode i određivanje akrilamida u ostalim uzorcima.

### **Validacija metode**

Pod zadatim hromatografskim uslovima snimljeni su maseni spektri za 2-BPA i 2-BP[<sup>13</sup>C<sub>3</sub>] A koji su prikazani na Slici 19.



**Slika 19.** GC-MS spektri za (a) 2-bromopropenamid (2-BPA) i (b) 2-BP[<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]A

Dalje, urađena je verifikacija vrijednosti LoD i LoQ [87, 96]. Za verifikaciju LoD i LoQ pripremljen je radni standard (vještački uzorak) koji sadrži 5 $\mu$ g/ kg akrilamida. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 12.

**Tabela 12.** Verifikacija granice detekcije i granice kvantifikacije

	Koncentracija $\mu\text{g/kg}$
Radni rastvor akrilamida koncentracije 5 $\mu\text{g/kg}$	4,46
	5,54
	5,53
	5,58
	5,54
	4,44
X sr	5,18
RSD	0,56

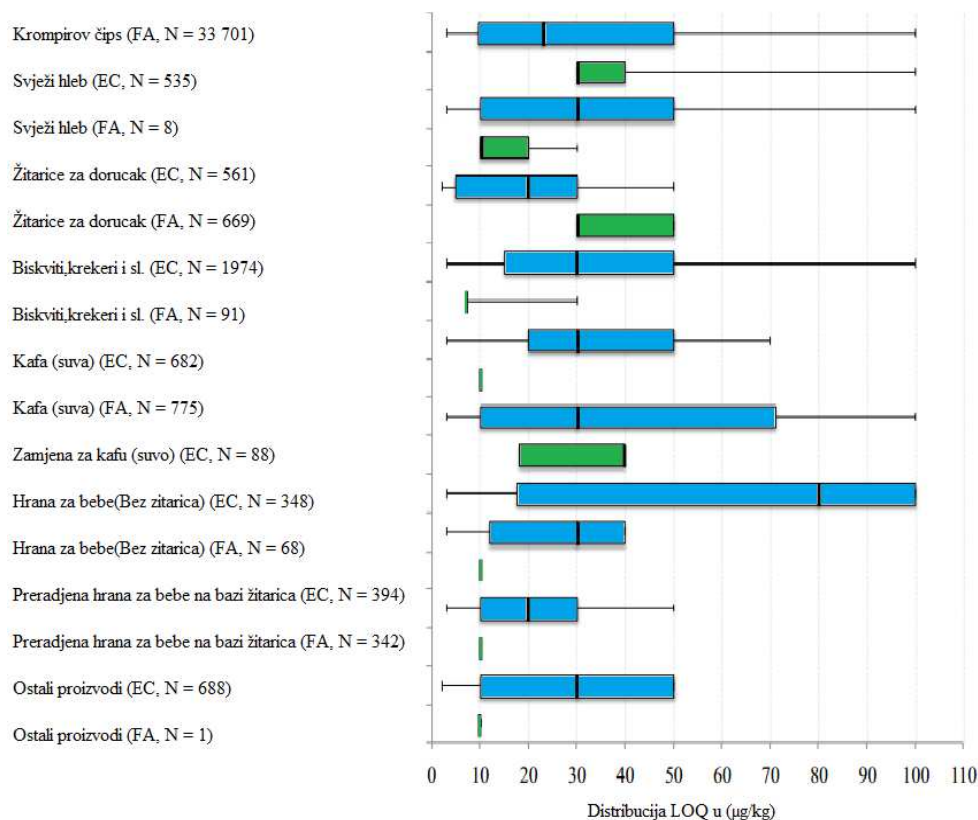
Vrijednosti LoD i LoQ izračunate su primjenom formula (1) i (2):

$$\text{LoD} = X_{\text{sr}} + 3 \text{SD} = 5,18 \mu\text{g/kg} + 3 \times 0,56 = \mathbf{6,86 \mu\text{g/kg}} \quad (1)$$

$$\text{LoQ} = X_{\text{sr}} + 10 \text{SD} = 5,18 \mu\text{g/kg} + 10 \times 0,56 = \mathbf{10,78 \mu\text{g/kg}} \quad (2)$$

U literaturi su prikazani podaci za LoQ [96] sadržaja akrilamida u različitim grupama namirnica koje su dostavile Evropske zemlje (EC) (eng. *European Countries*) i Evropsko udruženje proizvođača hrane (FA) (eng. *Food Associations*) koji su prikazani na Slici 20. Srednja vrijednost za LoQ kod podatka udruženja proizvođača hrane je 10  $\mu\text{g/kg}$  za sve grupe namirnica, osim za proizvode na bazi krompira i kafe za koje je 30 – 40  $\mu\text{g/kg}$ .





**Slika 20.** Distribucija limita kvantifikacije (LoQ) u  $\mu\text{g}/\text{kg}$  za grupe namirnica prema porijeklu podataka: plavo - EC – Evropske zemlje; zeleno - Udruženja proizvođača hrane (FA) [96]

Srednja vrijednost za LoQ kod podataka Evropskih zemalja je u rasponu od 20 – 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  za sve grupe namirnica osim za "zamjenu za kafu" za koju iznosi 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , dječiju hranu i svježi hljeb za koje iznosi 40 – 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Iz predhodnih podataka vidimo da se naše vrijednosti za LoQ veoma bliske literaturnim podacima što nam ukazuje da smo na pravom putu.

U narednoj fazi urađena je procjena linearnosti metode. Zavisnost odnosa površina pikova ( $m/z$  151 /  $m/z$  154) i koncentracije akrilamida ispitana je regresionom analizom i dobijena je linearna kalibraciona kriva sa koeficijentom determinacije  $R^2 > 0,999$ . Kalibracija je vršena u opsegu koncentracija od 5 – 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (5, 20, 40, 60 i 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Tačnost metode procijenjena je na taj način što je uzorak kukuruznog hleba koji je sadržao 29,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  akrilamida opterećen sa 10, 20 i 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  akrilamida i dobijene vrijednosti su

prikazane u tabeli 13. Vrijednosti dobijene iz šest paralelno urađenih ekstrakcija kvantitativno su obrađene GC – MS postupkom.

Vrijednosti za *Recovery* dobijene za tri nivoa koncentracija potvrđuju da je metoda tačna. Dobijeni rezultati za ispitivane parametre validacije potvrđuju pouzdanost metode pa je validirana GC-MS metoda primijenjena za određivanje sadržaja akrilamida u izabranim namirnicama proizvedenim na bazi kukuruznog brašna kao što su kukuruzni hljeb, kornfleks, palenta, projice sa sirom i projice sa sirom i spanaćem.

**Tabela 13.** *Recovery* vrijednost za akrilamid u opterećenim uzorcima kukuruznog hljeba

Početna konc. AA (mg/kg)	Dodata količna AA (mg/kg)	Dobijena konc. AA (mg/kg)	Očekivana konc. AA (mg/kg)	Tačnost ( % )
28,9	10,0	43,1	38,9	110,8
29,0		42,8	39,0	109,7
30,8		44,6	40,8	109,3
29,9		44,2	39,9	110,7
28,7		42,4	38,7	109,8
29,5		43,4	39,5	110,0
<b>Csr = 29,5</b>				
28,9	20,0	50,2	48,9	102,6
29,0		49,7	49,0	101,5
30,8		51,0	50,8	100,4
29,9		50,4	49,9	101,1
28,7		48,2	48,7	98,9
29,5		49,1	49,5	99,3
<b>Csr = 29,5</b>				
28,9	40,0	67,9	68,9	98,5
29,0		67,0	69,0	97,1
30,8		70,3	70,8	99,4
29,9		67,7	69,9	96,9
28,7		65,7	68,7	95,7
29,5		66,1	69,5	95,1
<b>Csr = 29,5</b>				

U ovom radu uzorci su pripremani sa smanjenom zapreminom zasićenog rastvora bromne vode u koraku brominacije i vidimo da metoda ima dobru osjetljivost kao i prihvatljive *Recovery* vrijednosti u odnosu na druge metode opisane u literaturi [94, 95, 97, 98]. U Tabeli 14 prikazana je koncentracija akrilamida u ispitivanim namirnicama. Rezultati ispitivanja pokazuju da je

akrilamid detektovan u svim uzorcima, minimalna vrijednost akrilamida (18,1 µg/kg) detektovana je kod palente, a maksimalna (77,5 µg/kg) kod kornfleksa. Ove vrijednosti su značajno niže nego kod namirnica proizvedenih dominantno od pšeničnog brašna što je posledica smanjenog sadržaja sirovih proteina u kukuruznom brašnu, pa je i mogućnost sinteze akrilamida manja.

**Tabela 14.** Koncentracija akrilamida u ispitivanim namirnicama

	Broj uzoraka	Opseg konc. akrilamida µg/kg	Sradnja vrijednost ± SD	SD (%)
Kukuruzni hljeb	13	26,7 – 31,5	27,0 ± 1,7	1,7
Kornfleks	7	69,0 – 77,5	72,8 ± 4,2	4,2
Palenta	5	18,1 – 23,8	20,4 ± 1,9	1,9
Projice sa sirom i spanaćem	8	29,0 – 35,8	31,6 ± 2,3	2,3
Projice sa sirom	9	27,9 – 35,0	31,1 ± 2,4	2,4

Nakon validacije metoda GC-MS je primijenjena za određivanje sadržaja akrilamida u ostalim uzorcima namirnica (tabela15), koje su prikupljene od strane službe Sanitarne inspekcije u okviru redovnog sanitarnog nadzora nad objektima koji posluju sa hranom na teritoriji Podgorice i crnogorskog primorja.

Evropski komitet za standardizaciju – (*European Committee for Standardization* – CEN) dobio je mandat da razvije standardizovanu analitičku metodu za određivanje akrilamida u namirnicama pod nazivom "Određivanje akrilamida u proizvodima na bazi krompira, proizvodima na bazi žitarica i kafi" Rok za usvajanje tražene metode je 31 Decembar 2016 godine.

**Tabela 15.** Sadržaj akrilamida u ispitivanim namirnicama

Namirnica	Proizvođač-Brend	Opseg konc. akrilamida $\mu\text{g}/\text{kg}$	n
HLJEB –polu bijeli, od brašna T-500	A	31 – 121	5
	B	59 – 119	5
	C	34 – 116	5
	D	56 – 119	5
	E	53 - 96	5
HLJEB – crni, od brašna T-850	F	27 – 93	3
	G	72 – 120	3
	H	86 – 108	3
	I	34 - 98	3
POMFRIT	J	813 – 1331	4
	K	104 – 1230	4
	L	211 - 1290	3
ČIPS	M	761 – 2116	6
	N	497 - 1901	5
	O	761 – 1316	5
	P	479 - 911	5
KREKERI	Q	93, 430	2
	R	337 – 431	4
TOST HLJEB	S	112 – 163	3
	T	127 – 188	4
	U	175 – 201	3
KEKSI	V	261	1
	W	282 – 307	4
TULUMBE	X	241, 4483	2
	Y	528, 690	2
PANIRANI OSLIĆ	Z	49 - 96	3

Na poziv generalne direkcije za zdravlje i zaštitu potrošača *DG SANCO* laboratorija za Sanitarnu hemiju Instituta za Javno zdravlje Crne Gore učestvovala je u međulaboratorijskom ispitivanju sadržaj akrilamida u namirnicama, u skladu sa harmonizovanim protokolom (*The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories*) [99] koje su organizovali FAPAS (*Food Analysis Performance Assessment Scheme*) i JRC (*Joint Research Centre*) [100]. U međulaboratorijskom ispitivanju učestvovala je 31 laboratorija, a koncentracija akrilamida u ispitivanim namirnicama data je u Tabeli 16.

**Tabela 16.** Pregled rezultata PT šeme u organizaciji FAPAS i JRC u kojoj je naša laboratorija učestvovala [100]

Vrsta uzorka	Određena vrednost (µg/kg)	Z - Score
„Hrskav“ hleb I	1213	-0,7
Čips	167	-0,6
Žitarice za doručak I	109	0,0
Kafa	312	-0,4
„Hrskav“ hleb II	707	-0,6
<i>Baby</i> dvopek	711	0,3
Žitarice za doručak II	70	-0,2
Pržena kafa	258	0,0
Kolači na bazi putera	150	-0,8
<b>Srednja vrijednost</b>		<b>-0,3</b>

Kako je srednja vrijednost z-skora za našu laboratoriju -0.3 što naše koncentracije akrilamida čini prihvatljivim.

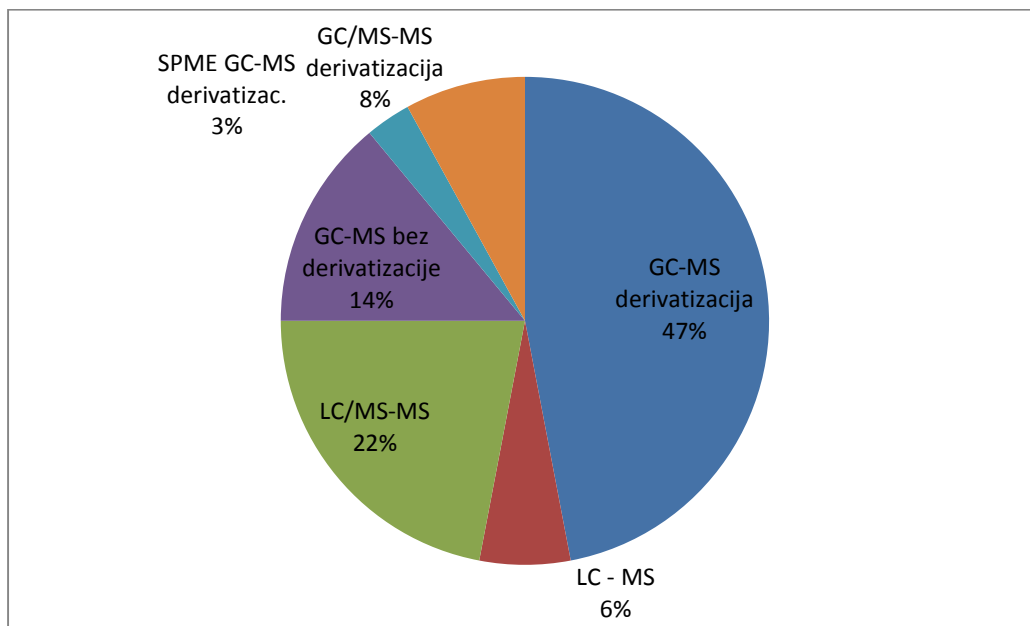
$[z] \leq 2$  prihvatljivo

$2 < [z] < 3$  diskutabilno

$[z] \geq 3$  ne prihvatljivo

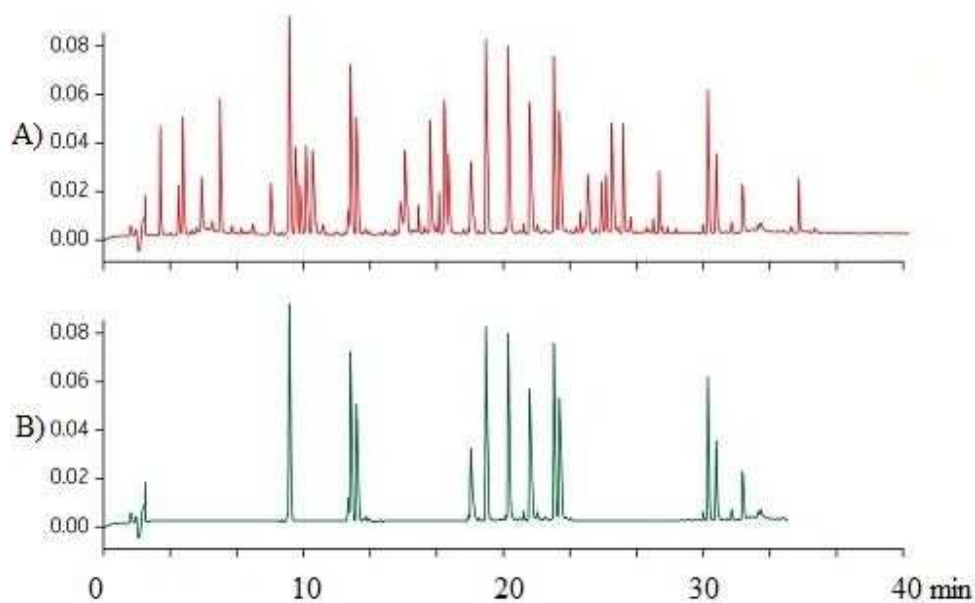
Veći broj učesnika (67% ) dobio je rezultate koji su ocijenjeni kao prihvatljivi (z-skor  $\leq 2$ ) u skladu sa međunarodnim smjernicama. Ovaj procenat prihvatljivih rezultata je relativno mali, 33% laboratorija dobio je neprihvatljive rezultate, što je posljedica vjerovatno sledećih razloga:

- Nedostatak iskustva sa ovom vrstom analiza; neke laboratorije učesnice su izjavile da su samo zakoračile u ovu problematiku;
- Primjena neadekvatnih metoda, mnoge laboratorije učesnice ne primjenjuju unutrašnju standardizaciju ili ne koriste interne standarde sa izotopnom oznakom. Takođe, mnoge laboratorije nijesu primijenile derivatizaciju kod pripreme uzoraka za analizu.



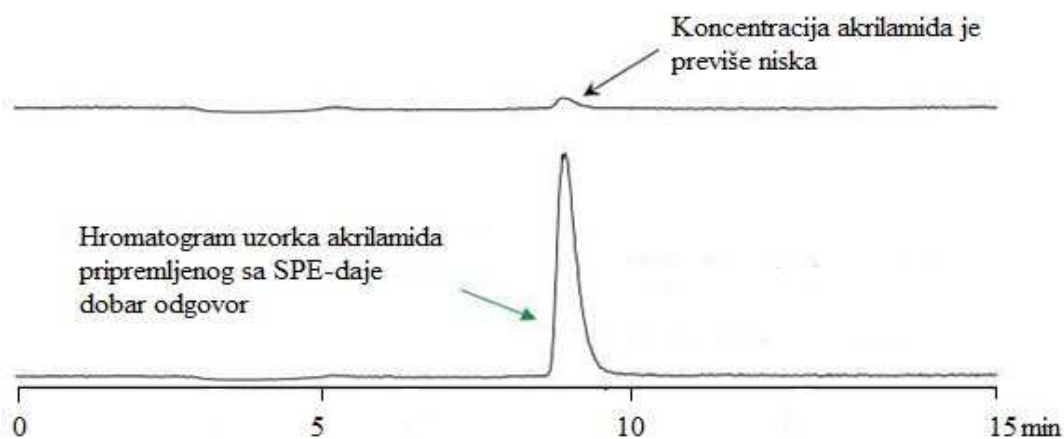
**Slika 20.** Proporcionalna zastupljenost analitičkih metoda primijenjenih od strane laboratorija učesnica [100]

Izbor optimalnih uslova za ekstrakciju akrilamida i naknadnih koraka za prečišćavanje ekstrakta zavise od matriksa namirnice. Iz tih razloga smo se opredijelili da primijenimo SPE ekstrakciju kod kvantifikacije akrilamida metodom GC-MS. Slika 14a. prikazuje hromatogram uzorka pomfrita pripremljenog tečno-tečnom ekstrakcijom, bez ekstrakcije na čvrstoj fazi gdje se dobija hromatogram sa velikim brojem pikova ali upotrebom ekstrakcije na čvrstoj fazi dobijamo hromatogram sa mnogo manje pikova slika 14b.



**Slika 14.** Hromatogram uzorka pomfrita pripremljenog tečno-tečna ekstrakcijom (A) i hromatogram uzorka pomfrita pripremljenog ekstrakcijom na čvrstoj fazi (B)

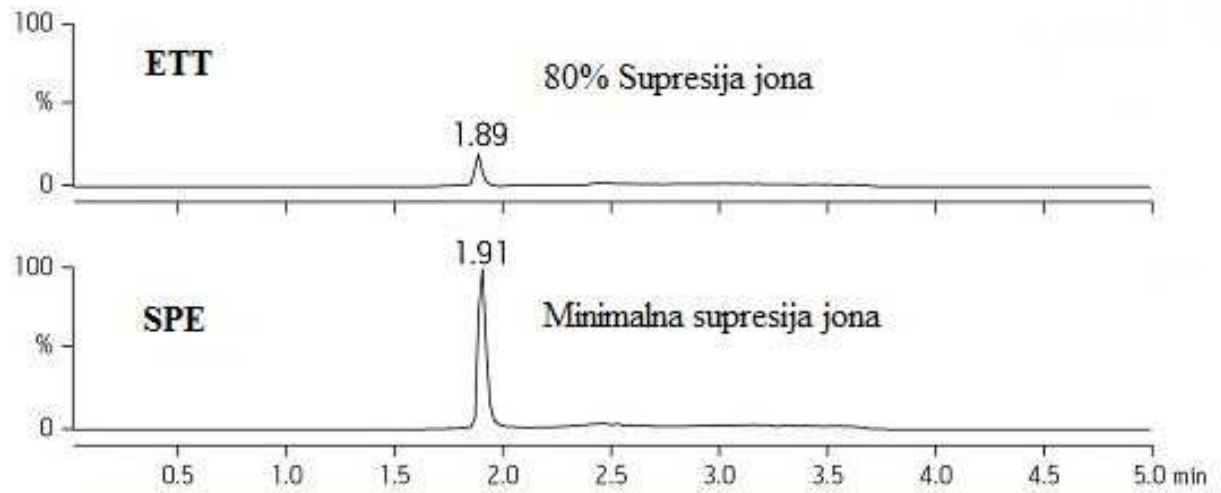
Redukcija supresije jona, čiji efekat najbolje ilustruje Slika 15. Na gornjoj slici je hromatogram gdje imamo 80% supresiju jona, dok je na donjoj slici supresija jona minimalna.



**Slika 15.** Efekat supresije jona. Ekstrakcija tečnost-tečnost (slika gore), SPE ekstrakcija (slika dolje)

Određivanje analita u niskim koncentracijama, tzv. koncentracijama u tragovima ilustruje

Slika 16.



**Slika 16.** Hromatogram uzorka u kojem je akrilamid prisutan u niskim koncentracijama, tzv. koncentracijama u tragovima pripremljen bez SPE (gore) i sa SPE (dolje).



## **5.2 Kvantifikacija akrilamida metodom gasne hromatografije sa azot-sosformim detektorom (GC-NPD)**

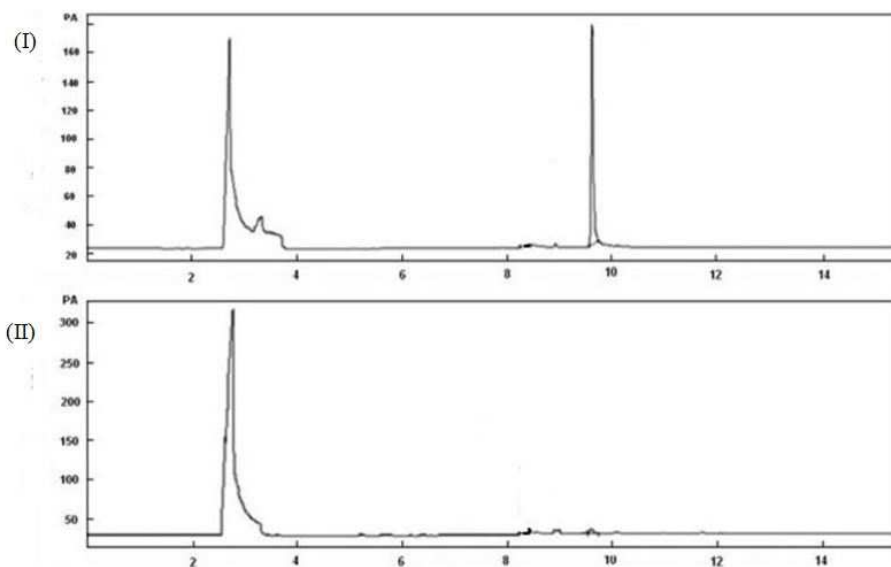
Analizom do sada publikovanih radova zaključeno je da se za detekciju akrilamida zahtijevaju veoma skupi i složeni detektori pri čemu se najčešće zahtijeva spregnuta masena detekcija. Kako ove metode nisu ekonomski opravdane zbog visoke cijene instrumenata a malog broja uzoraka na godišnjem nivou, javila se potreba da se razvije pouzdana, osjetljiva, brza i ekonomična metoda koja može da zamijeni masenu spektrometriju. Pored toga, poželjno je da priprema uzorka kao neophodan korak prije svake instrumentalne metode, bude tako razvijena da se uz minimalan utrošak resursa i vremena dobije uzorak odgovarajuće čistoće.

U ovom dijelu istraživanju prikazana je primjena GC metode sa NPD detektorom, u određivanju sadržaja akrilamida. Kako do sada ima mali broj publikovanih radova u kojima je opisana primjena GC-NPD metode za određivanje akrilamida u termički tretiranim uzorcima namirnica, zaključeno je da će se ovim istraživanjem dati značajan naučni doprinos u analitici akrilamida. Predloženu metodu trebalo bi da karakteriše jednostavnost pripreme uzorka i izvođenja hromatografske analize uz zadržavanje odgovarajućih karakteristika u pogledu osjetljivosti i tačnosti.

Stoga, preliminarna faza istraživanja je podrazumijevala pripremu uzorka krompira različitim termičkim tretmanima, njihovu pripremu za kvantifikaciju akrilamida ekstrakcijom tečnost-tečnost i podešavanje optimalnih uslova GC-NPD metode a nakon tog procesa, dalje je vršena validacija metode.

### **Validacija metode**

Pod optimalnim hromatografskim uslovima injektovan je rastvor standarda akrilamida i rastvor uzorka krompira. Dobijeni hromatogrami prikazani su na Slici 21 i pokazuju da nema interferencija uzorka sa pikom akrilamida.



**Slika 21.** Hromatogram standarda akrilamida 10 mg/L (I) i hromatogram akrilamida 1,4 mg/L detektovan u uzorku krompira (II).

Dalje, urađena je verifikacija vrijednosti limita detekcije (LOD) i limita kvantifikacije (LOQ). Za verifikaciju LOD i LOQ pripremljen je radni standard (veštački uzorak) koji sadrži 0,2 mg/kg akrilamida [97, 98]. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 17

Vrijednosti LOD i LOQ izračunate su primjenom formula (1) i (2):

$$\text{LOD} = X_{\text{s}} + 3 \text{SD} = 0,203 \text{ mg/kg} + 3 \times 0,018 \text{ mg/kg} = \mathbf{0,26 \text{ mg/kg}} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = X_{\text{s}} + 10 \text{SD} = 0,203 \text{ mg/kg} + 10 \times 0,018 \text{ mg/kg} = \mathbf{0,40 \text{ mg/kg}} \quad (2)$$

U narednoj fazi urađena je procjena linearnosti metode. Zavisnost površine hromatografskog pika i koncentracije akrilamida ispitana je regresionom analizom i dobijena je linearna kalibraciona kriva sa koeficijentom determinacije  $R^2 > 0,998$ . Kalibracija je vršena u opsegu koncentracija 0 – 10 mg/kg (0, 1, 2, 5 i 10 mg/kg). Na Slici 22 prikazana je dobijena kalibraciona kriva.

**Tabela 17.** Verifikacija granice detekcije i granice kvantifikacije

	Koncentracija mg/kg
Radni rastvor akrilamida koncentracije 0,2 mg/kg	0,20
	0,18
	0,23
	0,22
	0,19
	0,20
X sr	0,203
RSD	0,018

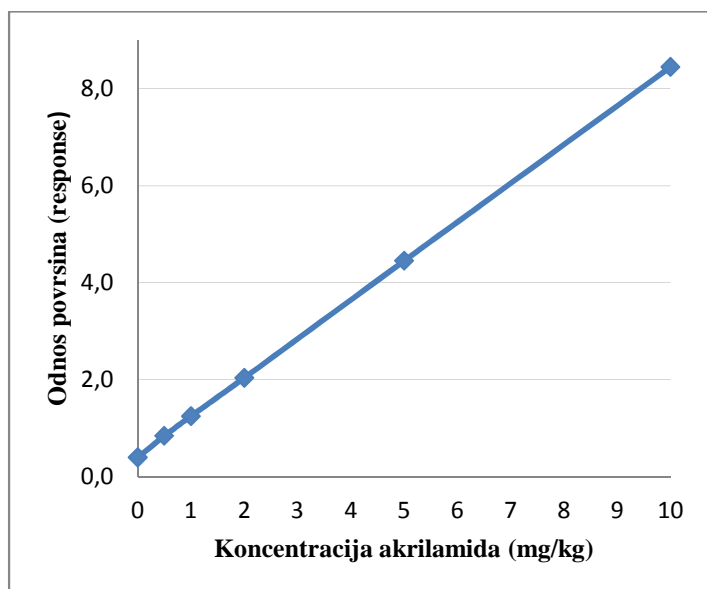
Tačnost metode procijenjena je na taj način što je uzorak krompira koji je sadržao 1,4 mg/kg akrilamida opterećen sa po 1,0; 2,0 i 5,0 mg/kg akrilamida i dobijene vrijednosti su prikazane u tabeli 18. Vrijednosti dobijene iz šest paralelno urađenih ekstrakcija kvantitativno su obrađene GC – NPD postupkom.

Akrilamid je identifikovan na osnovu retencionog vremena (9,68 min), čime je postignuta neophodna specifičnost metode, a linearnost je dobijena u opsegu 0,30 – 10 mg/kg.

**Tabela 18.** Sadržaj akrilamida u krompiru nakon termičkog tretmana

Početna konc. AA (mg/kg)	Dodata količina AA (mg/kg)	Dobijena konc. AA (mg/kg)	Očekivana konc. AA (mg/kg)	Recovery ( % )
1,40	1,0	2,64	2,40	110,0
1,33		2,58	2,33	110,7
1,45		2,68	2,45	109,3
1,37		2,60	2,37	109,7
1,39		2,50	2,39	110,8
1,44		2,68	2,44	109,8
<b>Csr = 1,40</b>				
1,40	2,0	3,48	3,40	102,3
1,33		3,39	3,33	101,8
1,45		3,54	3,45	102,6
1,37		3,42	3,37	101,5
1,9		3,47	3,39	102,3
1,44		3,53	3,44	102,6
<b>Csr = 1,40</b>				
1,40	5,0	6,55	6,40	102,3
1,33		6,45	6,33	101,8
1,45		6,61	6,45	102,4
1,37		6,52	6,37	102,3
1,39		6,50	6,39	101,7
1,44		6,55	6,44	101,7
<b>Csr = 1,40</b>				

Predložena metoda, takođe, ima zadovoljavajuće karakteristike u pogledu osjetljivosti i tačnosti.



**Slika 22.** Kalibraciona kriva za akrilamid u opsegu koncentracija od 0 do 10 mg/kg

Vrijednosti za *Recovery* dobijene za tri nivoa koncentracija kao i validacione vrijednosti prikazane u tabeli 19 potvrđuju da je metoda tačna.

**Tabela 19.** Vrijednosti određenih parametara validnosti za kvantifikaciju akrilamida sa GC-NPD

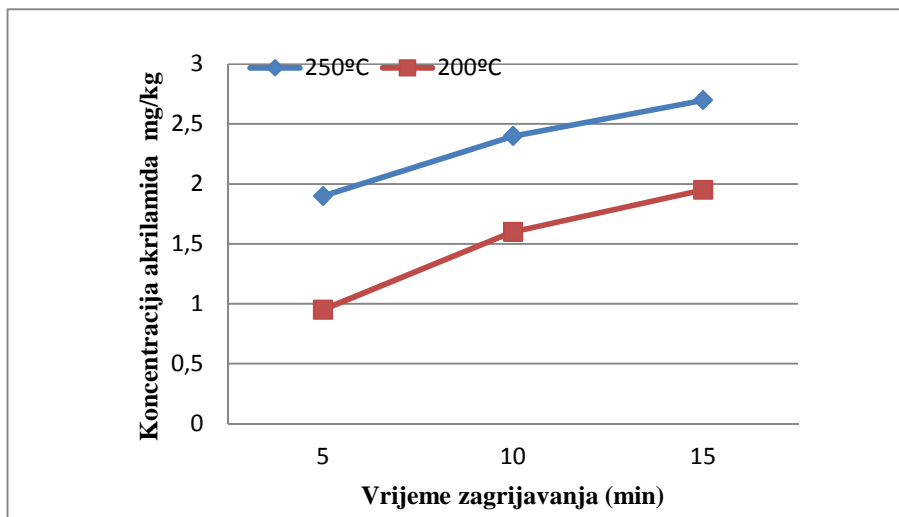
Validacioni faktor	Vrijednost
Koeficijent determinacije ( $R^2$ )	0,998
Odsječak (Intercept)	0,006
Limit detekcije (LoD)	0,26 mg/kg
Limit kvantifikacije (LoQ)	0,40 mg/kg
Recovery	105 %

Dobijeni rezultati za ispitane parametre validacije potvrđuju pouzdanost metode pa je validirana GC-NPD metoda primijenjena za određivanja sadržaja akrilamida u krompiru nakon kuvanja, pečenja i prženja na različitim temperaturama i vremenskim intervalima. U tabeli 20 prikazani su dobijeni rezultati.

**Tabela 20.** Sadržaj akrilamida (mg/kg) u krompiru nakon termičkog tretmana

	Termički tretman (min)		
	5	10	15
Kuvanje u vodi na 110 °C	< LOD	< LOD	< LOD
Pečenje u rerni na 200 °C	0,6	1,4	1,9
Prženje u ulju na 250 °C	1,6	2,4	2,7

Dobijeni rezultati prikazani su i grafički Slika 23. Visoka temperatura i duže vrijeme prženja pogoduju sintezi veće količine akrilamida.



**Slika 23.** Efekat temperature i dužine termičkog tretmana na sintezu akrilamida u krompiru prženom u ulju

Generalno na temperaturi od 250<sup>0</sup> C za 5 minuta pri pripremanju pomfrita dolazi do sinteze akrilamida u koncentraciji od 1,6 mg/kg dok se za 15 minuta zagrijavanja na istoj temperaturi sintetiše akrilamid u koncentraciji od 2,7 mg/kg. Smanjenjem temperature prženja sa 250<sup>0</sup> C na 180<sup>0</sup> C – 200<sup>0</sup> C smanjen je sadržaj akrilamida, ali pomfrit je bio manje hrskav i

mного manje privlačan za konzumaciju. U ovom radu uzorci krompira nakon termičkih tretmana su pripremani tečno-tečnom ekstrakcijom, i dobijene su zadovoljavajuće *Recovery* vrijednosti [87, 97, 98]. Akrilamid je identifikovan na osnovu retencionog vremena (9,68 min), čime je postignuta neophodna specifičnost metode, a linearnost je dobijena u opsegu 0,25 – 10 mg/kg. Pri hromatografskoj analizi uzoraka krompira pripremljenih procedurom ekstrakcije navedenom u ovom radu nije primećeno prisustvo dodatnih pikova koji bi mogli da potiču od interferirajućih supstancija, što ukazuje na selektivnost primijenjenog postupka. Osnovne prednosti predložene metode, u odnosu na metode opisane u literaturi, su jednostavnost pripreme uzoraka i izvođenja hromatografske procedure i ekonomičnost. Predložena metoda, takođe, ima zadovoljavajuće karakteristike u pogledu osjetljivosti i tačnosti. Do sada sadržaj akrilamida u namirnicama po našim zakonskim propisima nije limitiran, niti je limitiran u Evropskoj uniji. Evropska komisija je izdala preporuku broj 2007/331/EC [101] kojom podstiču države članice da prate sadržaj akrilamida u hrani kako bi se dobilo što više relevantnih podataka za procjenu rizika unosa akrilamida putem namirnica.

## **6 Zaključak**



U skladu sa postavljenim ciljevima studije, na osnovu rezultata ispitivanja možemo zaključiti sledeće:

- Akrilamid je mala, bezbojna ili bijela hidrofilna specifičnog mirisa. Rastvorljiv je u brojnim polarnim rastvaračima kao što su aceton, acetonitril, voda i dr. Posjeduje dvije funkcionalne grupe, amidnu grupu i elektron-deficitarnu vinil dvostruku vezu koja omogućava širok spektar reakcija uključujući i nukleofilne reakcije koje su od značaja u biološkim sistemima. Amidna grupa omogućava hidrolizu, dehidrataciju i kondenzaciju sa aldehidima, dok vinilna dvostruka veza reaguje sa amonijakom, alifatičnim aminima, fosforom, hlorom, bromom, bisulfitima, ditiokarbamatima kao i sa proteinima. Akrilamid se nalazi u različitim vrstama prehrambenih proizvoda kao na primjer: proizvodi od žitarica, proizvodi od krompira, kafa i dr. Među proizvodima bogatim skrobom najveći izvor akrilamida su proizvodi od krompira: čips i pomfrit kao i razne vrste peciva i hljeba.
- Akrilamid se sintetiše iz slobodnog asparagina i redukujućih šećera, tokom termičkih tretmana na visokim temperaturama kao što su pečenje i prženje u ulju.
- Za interpretaciju analitičkih rezultata od posebne važnosti je pravilno uzorkovanje i opis vremena, skladištenja i tretman odgovarajućeg prehrambenog proizvoda koji mogu imati značajan uticaj na koncentraciju akrilamida.
- Analitička određivanja akrilamida u prehrambenim proizvodima se najčešće obavljaju pomoću Gasne hromatografije u tandemu sa masenom spektrometrijom u izabranom praćenju jona tzv. SIM modu, ili pomoću visoko performansne tečne hromatografije – HPLC. Kvantifikacija akrilamida u namirnicama GC - MS (eng. *Gas chromatography - Mass Spectrometry*) metodama se može izvoditi sa ili bez derivatizacije. U našim istraživanjima dominantno smo koristili GC-MS metodu uz predhodnu derivatizaciju smanjenom količinom broma. Derivatizacija se najčešće izvodi pomoću bromovanja. Bromovani akrilamid je manje polaran nego početna komponenta i samim tim se bolje rastvara u nepolarnim organskim rastvaračima, a kao efektivan korak prečišćavanja koristili smo ekstrakciju na čvrstoj fazi a može da se koristi i ekstrakcija tečnost – tečnost između vodene i organske faze. Prednost postupka derivatizacije se ogleda u tome da se povećava molekulska masa, što rezultira, osim veće rastvorljivosti i većom selektivnošću. U svakom slučaju, derivatizacija je proces koji zahtijeva

vrijeme, zato što, na primjer, višak broma mora biti odstranjen nakon reakcije. Glavni nedostatak GC – MS metode bez derivatizacije je nedostatak karakterističnih jona zbog male molekulske težine akrilamida. U elektron jonizacionom modu (eng. Electron ionisation mode) glavni fragmenti jona za identifikaciju i kvantifikaciju akrilamida su m/z 71 i 55.

- Upotreba standarda kao i standarda obelježenih izotopima kao što je  $^{13}\text{C}_3$  akrilamid, primjena unutrašnje standardizacije, primjena derivatizacije kod pripreme uzoraka i učešće u međulaboratorijskim ispitivanjima od posebnog su značaja za dobijanje prihvatljivih rezultata ispitivanja.
- Generalno na temperaturi od  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$  dolazi do sinteze akrilamida u većim koncentracijama, smanjenjem temperature prženja sa  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$  na  $170\text{ }^{\circ}\text{C}$  smanjen je sadržaj akrilamida u pomfritu ali on je bio neprivlačnih organoleptičkih osobina (neukusan i manje hrskav) i mnogo manje privlačan za konzumaciju. Visoka temperatura i duže vrijeme prženja pogoduju sintezi veće količine akrilamida, ali porast temperature ima izraženiji efekat na sintezu akrilamida u gotovom proizvodu nego povećanje vremena termičkog tretmana na konstantnoj temperaturi.
- Akrilamid je kvantifikovan kao derivat 2-brompropen amida (2-BPA) uz predhodnu optimizaciju potrebnih količina broma za pripremu uzoraka. U cilju određivanja optimalne zapremine bromne vode, vršeno je opterećivanje uzorka kukuruznog hleba koji je sadržao  $29.5\text{ }\mu\text{g/kg}$  akrilamida sa  $40\text{ }\mu\text{g}$  akrilamida koji je pripremljen sa 5 različitih zapremina bromne vode (1, 2, 5, 10 i 15 ml). Kao odgovor, praćen je prinos ekstrakcije izražen kao “*Recovery*“ vrijednost. Srednja *Recovery* vrijednost za 1 ml bromne vode bila je 70,6 % što je neprihvatljivo, dok je *Recovery* vrijednost za zapreminu bromne vode od 2 ml, bio prihvatljivih 89,2 %. Pouzdanost metode je testirana kvantifikacijom akrilamida u 6 ponavljanja, a nakon tog procesa, dalje je vršena validacija metode. Dobijene su vrijednosti za LoD i LoQ koje su iznosile  $6,86\text{ }\mu\text{g/kg}$  i  $10,78\text{ }\mu\text{g/kg}$  su bliske literaturnim vrijednostima. Uradili smo i procjenu linearnosti metode kao zavisnost odnosa površina pikova (m/z 151 / m/z 154) i koncentracije akrilamida a ispitana je regresionom analizom i dobijena je linearna kalibraciona kriva sa koeficijentom determinacije  $R^2 > 0,999$ , i jednačinom prave  $Y = 0.069x + 0.038$ , u opsegu koncentracija od 5 – 80  $\mu\text{g/kg}$ . Tačnost metode procijenjena je na taj način što je uzorak kukuruznog hleba koji je sadržao  $29,5\text{ }\mu\text{g/kg}$  akrilamida opterećen sa 10, 20 i 40  $\mu\text{g/kg}$  akrilamida. Vrijednosti za *Recovery* dobijene za tri nivoa koncentracija potvrđuju da je metoda tačna. Dobijeni rezultati za ispitivane

parametre validacije potvrđuju pouzdanost metode pa je validirana GC-MS metoda primijenjena u međulaboratorijskom ispitivanju devet uzoraka namirnica na sadržaj akrilamida u njima koje su organizovali FAPAS i JRC, gdje smo dobili srednju vrijednost z-skora -0.3 koja je prihvatljiva.

- U ovom radu predložena je GC-NPD metoda za određivanje sadržaja akrilamida u termički tretiranim uzorcima krompira. Opisana metoda je tačna, jednostavna i ekonomična, pa je zbog toga veoma pogodna za praktičnu primjenu. Pored toga, predstavlja i značajan naučni doprinos analitici akrilamida jer je do sada publikovan veoma mali broj radova u kojima je opisana primjena NPD detektora za određivanje akrilamida. Akrilamid je identifikovan na osnovu retencionog vremena (9,68 min), čime je postignuta neophodna specifičnost metode, a linearnost je dobijena u opsegu 0,30 – 10 mg/kg. Predložena metoda, takođe, ima zadovoljavajuće karakteristike u pogledu osjetljivosti i tačnosti. Osnovne prednosti predložene metode, u odnosu na metode opisane u literaturi, su jednostavnost pripreme uzoraka i izvođenja hromatografske procedure i ekonomičnost.

## **7 Literatura**

1. 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. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health* 27, 219-226.
2. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogen risk to humans [serial on the Internet]. 2011. Available from: [http:// monographs.iarc.fr. /](http://monographs.iarc.fr/)
3. Swedish National Food Administration (SNFA). Information about acrylamide in food Uppsala[serial on the Internet]. Available from: <http://www.slv.se>.
4. Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. & Törnqvist, M. 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4998-5006.
5. Granvogl, M., Wieser, H., Koehler, P., VonTucher, S. & Schieberle, P. 2007. Influence of Sulfur Fertilization on the Amounts of Free Amino Acids in Wheat. Correlation with Baking Properties as well as with 3-Aminopropionamide and Acrylamide Generation during Baking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4271-4277
6. Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. & Törnqvist, M. 2000. Acrylamide: A cooking carcinogen? *Chemical Research in Toxicology* 13, 517-522.
7. FAO/WHO (Food and Agricultural Organisation/World Health Organization). Summary and conclusions report of the seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) 1-16, 2010, Available from [http://www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa\\_output\\_en.Asp](http://www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa_output_en.Asp).
8. Čobanov D., Kocev N., 1971, Hromatografija, Nauka i izkustvo, Sofija
9. Gross J. H., 2004, Mass Spectrometry, A Textbook, Springer,

10. Budde W. L., 2001 Analytical Mass Spectrometry, ACS and Oxford University Press, Washington, D. C. and Oxford
11. E. Alison Ashcroft, 2010 “An Introduction to Mass Spectrometry”, The University of Leeds
12. E. de Hoffmann, V. Stroobant, J. Charette, 2007 “Mass Spectrometry Principles and Applications”, John Wiley&Sons Ltd, Chichester
13. Anon 1991. Acrylamide Health and Safety Guide; IPCS International Programme on Chemical Safety In Health and Safety Guide No. 45: WHO.
14. Friedman, M. 2003. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 4504-4526.
15. Girma, K.B., Lorenz, V., Blaurock, S. & Edelmann, F.T. 2005. Coordination chemistry of acrylamide. Coordination Chemistry Reviews 249, 1283-1293.
16. Bologna, L.S., Andrawes, F.F., Barvenik, F.W., Lentz, R.D. & Sojka, R.E. 1999. Analysis of residual acrylamide in field crops. Journal of Chromatographic Science 37, 240-244.
17. Smith, E.A., Prues, S.L. & Oehme, F.W. 1996. Environmental degradation of polyacrylamides. 1. Effects of artificial environmental conditions: Temperature, light, and pH. Ecotoxicology and Environmental Safety 35, 121-135.
18. Adams A, Hamdani S, Van Lancker F, Mejri S and De Kimpe N, 2010. Stability of acrylamide in model systems and its reactivity with selected nucleophiles. Food Research International, 43, 1517–1522.

19. EFSA (European Food Safety Authority), 2012a. Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA Journal* 2012;10(10):2938, 38 pp. doi:10.2903/j.efsa.2012.2938
20. Fohgelberg, P., Rosén, J., Hellenäs, K.E. & Abramsson-Zetterberg, L. 2005. The acrylamide intake via some common baby food for children in Sweden during their first year of life--an improved method for analysis of acrylamide. *Food and Chemical Toxicology* 43, 951-959.
21. Hilbig, A., Freidank, N., Kersting, M., Wilhelm, M. & Wittsiepe, J. 2004. Estimation of the dietary intake of acrylamide by German infants, children and adolescents as calculated from dietary records and available data on acrylamide levels in food groups. *International Journal Hygiene Environmental Health* 207, 463-71.
22. Hellenäs, K.-E. 2008 Percent contribution of acrylamide from some food products. Unpublished data.
23. FAO/WHO (2007). Proposed Draft Code of Practice for the Reduction of Acrylamide in Food. CX/CF 01/1/15. URL: [http://www.fao.org/codex/cccf2/cf02\\_07e.pdf](http://www.fao.org/codex/cccf2/cf02_07e.pdf)
24. Törnqvist, M. 2005. Acrylamide in food: The discovery and its implications. *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food* 561, 1-19.
25. Abramsson-Zetterberg, L. 2003. The dose-response relationship at very low doses of acrylamide is linear in the flow cytometer-based mouse micronucleus assay. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 535, 215-222.
26. Bergmark, E. 1997. Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. *Chemical Research in Toxicology* 10, 78-84.

27. Jägerstad, M. & Skog, K. 2005. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 574, 156-172.
28. WHO 2003. Acrylamide in drinking water. Source: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/acrylamide.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/acrylamide.pdf)
29. Stadler, R. H.; Blank, I.; Varga, N.; Robert, F.; Hau, J.; Guy, J. A.; Robert; M.C.; Riediker, S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 2002, 419, 449.
30. Mottram, D. S.; Wedzicha, B. L., Dodson, A. T. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 2002, 419, 448.
31. Becalski, A.; Lau, B. P.-Y.; Lewis, D.; Seaman, S. W. Acrylamide in Foods: Occurrence, Sources, and Modeling. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 802-808.
32. Yaylayan, V. A.; Wnorowski, A.; Locas, C. P. Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 1753-1757.
33. Zyzak, D. A.; 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. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 4782-4787.
34. Granvogl, M.; Schieberle, P. Thermally Generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 5933-5938.
35. Yashura, A.; Tanaka, Y.; Hengel, M.; Shibamoto, T. Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 3999-4003.



36. Biedermann, M.; Noti, A.; Biedermann-Brem, S.; Mozzetti, V.; Grob, K. Experiments on acrylamide formation and possibilities to decrease the potential of acrylamide formation in potatoes. *Mitt. Lebensm. Hyg.* 2002, 93, 668-687.
37. Pollien, P.; Lindinger, C.; Yeretjian, C.; Blank, I. Proton transfer reaction mass spectrometry, a tool for on-line monitoring of acrylamide formation in the headspace of Maillard reaction systems and processed foods. *Anal. Chem.* 2003, 75, 5488-5494.
38. Tareke, E. 2003. Identification and origin of potential background carcinogens: Endogenous isoprene and oxiranes, dietary acrylamide. PhD Thesis. Department of Environmental Chemistry. Stockholm University.
39. Mestdagh, F. J.; de Meulenaer, B.; van Poucke, C.; Detavernier, C.; Cromphout, C.; van Peteghem, C. Influence of oil type on the amounts of acrylamide generated in a model system and in french fries. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 6170-6174
40. Tareke, E.; Rydberg, P.; Karlsson, P., Eriksson, S.; Törnqvist, M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4998-5006.
41. Elmore, J. S.; Koutsidis, G.; Dodson, A. T.; Mottram, D. S.; Wedzicha, B. L. Measurement of acrylamide and its precursors in potato, wheat, and rye model systems. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1286-1293.
42. Mestdagh, F.; de Meulenaer, B.; Cucu, T.; van Peteghem, C. Role of water upon the formation of acrylamide in a potato model system. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 9092-9098.
43. Pedreschi F, Salome Mariotti M and Granby K, 2014. Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 9–20.

44. Xu Y, Cui B, Ran R, Liu Y, Chen H, Kai G and Shi J, 2014. Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: Current status and future prospects. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 1–12.
45. Stadler R and Scholz G, 2004. Acrylamide: An update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation, and potential strategies of control. *Nutrition Reviews*, 62, 449–467.
46. Vinci RM, Mestdagh F and De Meulenaer B, 2012. Acrylamide formation in fried potato products - Present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food Chemistry*, 133, 1138–1154.
47. Bethke PC and Bussan AJ, 2013. Acrylamide in Processed Potato Products. *American Journal of Potato Research*, 90, 403–424
48. Biedermann-Brem S, Noti A, Grob K, Imhof D, Bazzocco D and Pfefferle A, 2013. How much reducing sugar may potatoes contain to avoid excessive acrylamide formation during roasting and baking? *European Food Research and Technology*, 217, 369–373.
49. Noti A, Biedermann-Brem S, Biedermann M, Grob K, Albisser P, and Realini P, 2003. Storage of potatoes at low temperatures should be avoided to prevent increased acrylamide formation during frying or roasting. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 94, 167–180.
50. Powers SJ, Mottram DS, Curtis A and Halford NG, 2013. Acrylamide concentrations in potato crisps in Europe from 2002 to 2011. *Food Additives and Contaminants-Part A*, 30, 1493–1500.
51. Kumar D, Singh BP and Kumar P, 2004. An overview of the factors affecting sugar content of potatoes. *Annals of Applied Biology*, 145, 247–256.

52. Halford NG, Muttucumaru N, Powers SJ, Gillatt PN, Hartley L, Elmore JS and Mottram DS, 2012b. Concentrations of Free Amino Acids and Sugars in Nine Potato Varieties: Effects of Storage and Relationship with Acrylamide Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12044–12055.
53. Halford NG, Curtis TY, Muttucumaru N, Postles J, Elmore JS and Mottram DS, 2012a. The acrylamide problem: a plant and agronomic science issue. *Journal of Experimental Botany*, 63, 2841–2851.
54. Muttucumaru N, Powers SJ, Elmore JS, Mottram DS, Halford NG, 2013. Effects of nitrogen and sulfur fertilization on free amino acids, sugars, and acrylamide-forming potential in potato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 6734–6742.
55. Fiselier K, Bazzocco D, Gama-Baumgartner F and Grob K, 2006. Influence of the frying temperature on acrylamide formation in French fries. *European Food Research and Technology*, 222, 414–419.
56. Truong VD, Pascua YT, Reynolds R, Thompson RL, Palazoğlu TK, Atac Mogol B, Gökmen V, 2014. Processing Treatments for Mitigating Acrylamide Formation in Sweetpotato French Fries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 310–316.
57. Hendriksen HV, Kornbrust BA, Østergaard PR and Stringer MA, 2009. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4168–4176.
58. Biedermann-Brem S, Noti A, Grob K, Imhof D, Bazzocco D and Pfefferle A, 2013. How much reducing sugar may potatoes contain to avoid excessive acrylamide

formation during roasting and baking. *European Food Research and Technology*, 217, 369–373.

59. Young M. S., Jenkins K. S., Mallet C. R., 2004. Solid –phase extraction and cleanup procedures for determination of acrylamide in fried potato products by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC International* B 87, 961-964.
60. [http://www.slv.se/upload/heatox/documents/d59 guidelines to authorities and consumer organisations on home cooking and consumption.pdf](http://www.slv.se/upload/heatox/documents/d59_guidelines_to_authorities_and_consumer_organisations_on_home_cooking_and_consumption.pdf)
61. <http://heatox.org/>
62. <http://processing-contaminants-prometheus.com/index.php>
63. Jackson LS and Al-Taher F, 2005. Effects of consumer food preparation on acrylamide formation. In: *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*. Eds Friedman M and Mottram D, Springer - Business Media Inc., 447–465.
64. Alves RC, Soares C, Casal S, Fernandes JO and Oliveira BPP, 2010. Acrylamide in espresso coffee: influence of species, roast degree and brew length. *Food Chemistry*, 119, 929–934.
65. Arvanitoyannis IS and Dionisopoulou N, 2014. Acrylamide: formation, occurrence in food products, detection methods, and legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 708–733.
66. Zhang Y, Zhang G and Zhang Y, 2005. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods. Review and recent developments. *Journal of Chromatography A*, 1075, 1–21.

67. Tekkeli SEK, Önal C and Önal, A, 2012. A review of current methods for the determination of acrylamide in food products. *Food Analytical Methods*, 5, 29–39.
68. Arvanitoyannis IS and Dionisopoulou N, 2014. Acrylamide: formation, occurrence in food products, detection methods, and legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 708–733.
69. Elbashir AA, Omar MMA, Ibrahim WAW, Schmitz OJ and Aboul-Enein HY, 2014. Acrylamide analysis in food by liquid chromatographic and gas chromatographic methods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 44, 107–141.
70. Michalak J, Gujska E and Kunczewicz A, 2013. RP-HPLC-DAD studies on acrylamide in cereal-based baby foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 32, 68–73.
71. Can NO and Arli G, 2014. Analysis of acrylamide in traditional and nontraditional foods in Turkey using HPLC-DAD with SPE cleanup. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 37, 850–863.
72. Oracz J, Nebesny E and Żyżelewicz D, 2011. New trends in quantification of acrylamide in food products. *Talanta*, 86, 23–34.
73. Tekkeli SEK, Önal C and Önal, A, 2012. A review of current methods for the determination of acrylamide in food products. *Food Analytical Methods*, 5, 29–39.
74. Fohgelberg P, Rosen J, Hellenas KE and Abramsson-Zetterberg L, 2005. The acrylamide intake via some common baby food for children in Sweden during their first year of life – an improved method for analysis of acrylamide. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 951–959.
75. <http://www.sigmaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf> , 2012.
76. Introduction to Solid Phase Extraction, 2012, [http:// www.charltonsci.co.uk / spe](http://www.charltonsci.co.uk/spe)

introduction.pdf

77. [http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course\\_info/2302548/Wk5.pdf](http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302548/Wk5.pdf) , 2012.
78. Council Regulation (EEC) No 315/93 of 8 February 1993 laying down Community procedures for contaminants in food. OJ L 37, 13.2.1993, p. 1–5.
79. Commission Recommendation 2010/307/EU of 2 June 2010 on the monitoring of acrylamide in food, OJ L 137, 3.6.2010, p. 4–10.
80. Commission Recommendation of 8 November 2013 on investigation into the levels of acrylamide in food, OJ L 301, 12.11.2013, p. 15–17.
81. Council Directive 98/83 of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. OJ L 330, 5.12.98, p. 32–54.
82. Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. OJ L 12, 15.1.2011, 1–89.
83. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. OJ L 342, 22.12.2009, p. 59–209.
84. Pittet A, Périsset A, Oberson J. M, 2004. Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1035, 123–130.
85. Castle L., 1993. Determination of acrylamide monomer in mushrooms grown on polyacrylamide gel. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1261-1263.

86. Dunovska L., Cajka T., Hajslova J., Holadova K., 2006. Direct determination of acrylamide in food by gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* **578** 234-240.
87. Bremser W., The fitness for purpose of analytical method: A laboratory guide to method validation and related topic. EURACHEM Guide 1<sup>s</sup> English edition. [serial on the Internet].2010, Available from:[http:// www.eurachem.ul.pt](http://www.eurachem.ul.pt)
88. Kim S. H., Hwang V, K. Lee G., 2011. Analysis of acrylamide using gas chromatography – nitrogen phosphorus detector (GC-NPD), *Food. Sci. Biotechnol.* 20 835-839.
89. Matthäus, 2002. BAGKF, Bundesanstalt für Getreide- Kartoffel und Fettforschung. Available at:[http://www.bfr.bund.de/cm/343/acrylamidgehalte\\_von\\_im\\_backofen\\_zubereiteten\\_pommes\\_frites\\_und\\_von\\_reibekuchen.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/acrylamidgehalte_von_im_backofen_zubereiteten_pommes_frites_und_von_reibekuchen.pdf)
90. Lim PK, Jinap S, Sanny M, Tan Cp and Khatib A, 2014. The influence of deep frying using various vegetable oils in acrylamide formation sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam) chips. *Journal of Food Science*, 79, 115–121
91. Yuan Y, Zhang H, Miao Y and Zhuang H, 2014. Study on the methods for reducing the acrylamide content in potato slices after microwaving and frying processes. *RSC Advances*, 4, 1004–1009.
92. 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 Addit. Contam. Part A.* 19, 1116 - 1124.
93. Young M. S., Jenkins K. S., Mallet C. R., 2004. Solid –phase extraction and cleanup procedures for determination of acrylamide in fried potato products by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC International* B 87, 961-964.

94. Gokmen V, Senyuva H.Z, Acar J, Sarioglu K, 2005. Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1088 193-199.
95. Marchettini N., Focardi S., Guarnieri M., Guerranti C., Perra G., 2013. Determination of acrylamide in local and commercial cultivar of potatoes from biological farm, *Food. Chem.* 136, 1426–1428.
96. EFSA Journal 2015;13(6):4104, 35- 36
97. Scientific Committee on food. Opinion of the SCF on new findings regarding the presence of acrylamide in food [serial on the Internet]. 2010, Available from: <http://www.europa.eu>.
98. International Conference on Harmonization, 1997. Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology; Availability, Federal Register 62, 27463–27467.
99. Thompson M, Ellison S.L.R, Wood R., *Pure Appl. Chem.*, 2006, 78, 145-196.
100. FAPAS® Proficiency Test 3015, Acrylamide, Report, CSL, Sand Hutton, York, UK
101. Commission Recommendation 2007/331/EC of 3 May 2007 on the monitoring of acrylamide in food. *OJ L* 123, 12.5.2007, p. 33–40.



## **Biografija**

Veselin Delević rođen je u Beranama, gde je završio osnovnu i srednju školu. Prirodno-matematički fakultet, odsek za hemiju Univerziteta Svetozar Marković u Kragujevcu upisao je školske 1982/1983 godine gde je i diplomirao 1991 godine.

Od Oktobra 1991. godine zaposlen je sa punim radnim vremenom u tadašnjem Zavodu za zdravstvenu zaštitu, današnjem Institutu za javno zdravlje u Podgorici, kao sanitarni hemičar u laboratoriji Sanitarne hemije i ekotoksikologije. Juna 1992. godine položio je stručni ispit u Ministarstvu zdravlja Republike Crne Gore.

Školske 1996/1997 upisao je specijalističke studije iz Sanitarne hemije na Katedri za Bromatologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, gde je oktobra 1999. godine odbranio specijalistički rad pod nazivom: „Polihlorovani bifenili i njihovo određivanje u vodi za piće metodom gasne hromatografije“. Od oktobra 1999. godine obavljao je poslove specijaliste sanitarne hemije koji su obuhvatali ispitivanja zdravstvene ispravnosti životnih namirnica, davanje stručnog mišljenja o kvalitetu i bezbednosti životnih namirnica i predmeta opšte upotrebe, transfer i validaciju analitičkih metoda, uvođenje novih laboratorijskih postupaka i poboljšavanje postojećih sistema kvaliteta (ISO 9001, 14001 i 17025). Juna 2002. raspoređen je na mesto načelnika odjeljenja Sanitarne hemije u Institutu za javno zdravlje Podgorica. Januara 2004. Nastavno - naučno veće Farmaceutskog fakulteta u Beogradu imenovalo ga je za rukovodioca specijalističkog staža u Institutu za javno zdravlje u Podgorici.

Član je nacionalnog saveta za procenu rizika bezbednosti hrane i u tom svojstvu je učestvovao na više seminara u organizaciji Evropskog autoriteta za bezbednost hrane (EFSA).

Učestvovao je na više stručnih skupova iz oblasti akreditacije laboratorija i ispitivanja kontrole kvaliteta lekova u zemlji i inostranstvu.

Školske 2006/2007 upisao je doktorske akademske studije iz Bromatologije.

Govori engleski jezik i služi se ruskim jezikom.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани: Веселин Делевић

број индекса 65/06

### Изјављујем

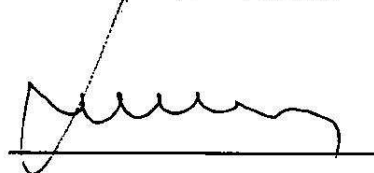
да је докторска дисертација под насловом

«Испитивање утицаја термичког третмана на настајање акриламида у намирницама са високим садржајем скроба применом унапређене методе гасне хроматографије»

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 20.10.2015

Потпис докторанда

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of connected loops and curves, positioned above a horizontal line.

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Веселин Делевић

Број индекса 65/06

Студијски програм Докторске академске студије – модул Броматологија

Наслов рада: „Испитивање утицаја термичког третмана на настајање акриламида у намирницама са високим садржајем скроба применом унапређене методе гасне хроматографије“

Ментор : Проф. др. сци. Иван Станковић

Потписани: Веселин Делевић

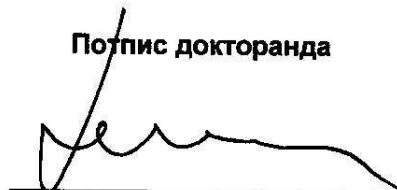
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 20.10.2015

Потпис докторанда



**Прилог 3.**

**Изјава о коришћењу**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Испитивање утицаја термичког третмана на настајање акриламида у намирницама са високим садржајем скроба применом унапређене методе гасне хроматографије“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду: 20.10.2015

**Потпис докторанда**

